



Imagen de portada,

Visto en el subte de Bs As,

Emiliano Bellini

El presente manuscrito y sus respectivos resultados fueron desarrollados dentro del programa de Carrera de Doctorado en Ciencias Naturales de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo de la Universidad Nacional de La Plata con el proyecto titulado “Asimetría fluctuante y modularidad en poblaciones mestizas Latinoamericanas: uso del mapeo de mestizaje para la identificación de su base genética”, con fecha de aprobación 14-12-2012, resolución número 30/13, expediente 1000-010935/12, teniendo como lugar de trabajo en Grupo de Investigación en Biología Evolutiva Humana adscrito al Instituto Patagónico de Ciencias Sociales y Humanas en el Centro Nacional Patagónico.

a mi hija,
Regina

ésta es una apología a mi ausencia

Índice

i	Indice
iv	Financiamiento
v	Agradecimientos
vii	Abreviaturas
viii	Resumen/ <i>Abstract</i>
1	Capítulo I: Introducción
2	Fundamento teórico
2	La cara humana como fenotipo complejo
3	Estructura, desarrollo, crecimiento y función faciales
7	Algunos aspectos evolutivos de las estructuras faciales
10	La cara simétrica como marcador de selección sexual: una apuesta evolucionista
14	El rostro como carácter cuantitativo
14	La simetría – asimetría: dialéctica de los sistemas del desarrollo
16	Asimetría como indicador de perturbaciones en el desarrollo
19	La asimetría en poblaciones humanas y su relación con diversas covariables
20	Planteo del problema
25	Justificación
26	Objetivos e hipótesis
27	Capítulo II: Antecedentes
28	Contexto histórico del estudio de la asimetría
32	Morfometría geométrica aplicada al estudio de la variación fenotípica craneofacial
32	Conceptos: <i>shape</i> , <i>form</i> y <i>size</i>
33	Espacios morfométricos
34	El proyecto CANDELA
36	Mestizaje en Latinoamérica
39	Capítulo III: Sujetos, materiales y método
40	Muestra
40	Criterios empleados en la fotografía facial
42	Criterios de fotogrametría en la reconstrucción facial 3D
45	Corrección de las posibles aberraciones en las fotografías faciales CANDELA
49	Protocolo de <i>landmarks</i> digitalizados y los diferentes módulos propuestos en el análisis
51	Diseño experimental
51	Criterios generales de inclusión exclusión de la muestra
52	Aspectos sobre la estimación genómica de la ancestría
54	Capítulo IV: Reproducibilidad, repetibilidad y error intra-interobservadores
55	Introducción
55	Error de medición (EM), repetibilidad y reproducibilidad en estudios de asimetría
58	Modelo general de error de medición (EM)
59	Repetibilidad y reproducibilidad: conceptos
60	Método
60	Pruebas de reproducibilidad, repetibilidad y EM
60	Reproducibilidad de digitalización de la cara humana: fotogramétrica (PhotoModeler) y directa (MicroScribe)
61	Experimento 1: reproducibilidad de la digitalización de cráneos humanos explorando las diferencias de ajuste de simetría
61	Experimento 2: reproducibilidad de las técnicas de digitalización en caras humanas: modelo abierto
61	Experimento 3: reproducibilidad de las técnicas de digitalización en caras humanas: modelo restringido

62		Experimento 4: correlación de los valores de AF por técnica: modelo abierto y restringido
62		Experimento 5: correlación de las distancias ch-ch directas y estimadas
62		Repetibilidad de la técnica fotogramétrica por landmarks
63		Experimento 6: varianza multidimensional por landmarks
63		Prueba de EM entre observadores e intra observador
63		Experimento 7: el EM inter e intra observadores
67	Resultados	
67		Reproducibilidad de digitalización de la cara humana: fotogramétrica (PhotoModeler) y directa (MicroScribe)
66		Experimento 1: reproducibilidad ajuste <i>object symmetry</i>
67		Reproducibilidad ajuste <i>matching symmetry</i>
68		Experimento 2: reproducibilidad de la técnica de digitalización en caras humanas, modelo real
69		Experimento 3: reproducibilidad de técnicas sobre un modelo fijo de cara humana (maniquí)
72		Experimento 4: correlación de los vAF por técnica modelo real
72		Experimento 5: correlación entre distancias estimadas y directas
72		Repetibilidad de la técnica fotogramétrica por <i>landmarks</i> y módulos
72		Experimento 6: repetibilidad fotogrametría
74		Prueba de error de medición (EM) entre observadores e intra observador
73		Experimento 7: error entre e interobservadores
79	Discusión	
79		Reproducibilidad
82		Repetibilidad
82		Error de medición
84	Capítulo V: Estimación de la ancestría individual	
85	Introducción	
86		Modelo de inferencia de la asimetría individual
90	Sujetos y método	
90		La muestra
90		Caracterización multivariante de la asimetría facial
91	Resultados	
94	Discusiones	
97	Capítulo VI: Asimetría facial y ancestría genética	
98	Introducción	
100	Sujetos y métodos	
100		La muestra
100		Estimación de la ancestría genética
101		Correlación y regresión de los valores de asimetría fluctuante facial (vAF) sobre covariables
101	Resultados	
101		Correlación y regresión de los valores de asimetría fluctuante faciala (vAF) sobre covariables
103	Discusiones	
107	Capítulo VII: Asimetría facial y estatus socioeconómico	
108	Introducción	
110	Sujetos y método	
110		La muestra
110		Construcción de los indicadores SES: un acercamiento multivariado
112		Análisis de regresión multivariante entre las variables SES y la asimetría facial
113	Resultados	
117	Discusión	
117		Contraste de los vAF y el modelo SES

122	Capítulo VIII: Asimetría facial, modularidad e integración morfológica	
123	Introducción	
123		La cara como fenotipo modular e integrado
126		La asimetría fluctuante como vía para el estudio de la integración del desarrollo
128	Sujetos y Método	
128		Modularidad: hipótesis y tratamiento estadístico
131		Contraste de matrices de covariación
132		Integración morfológica
133	Resultados	
142	Discusión	
142		Modularidad facial
144		Contraste de matrices de covariación
147		Integración morfológica facial
150	Capítulo IX: Asimetría facial y su distribución geoespacial	
151	Introducción	
154	Sujetos y método	
154		Análisis de distribución espacial de la AF
156		Relación de la AF con la perturbación del ambiente
156	Resultados	
164	Discusión	
164		Sobre el patrón geoespacial de la AF
165		Sobre la relación de la modificación del ambiente y la AF
169	Capítulo X: Discusión general	
170	Análisis integrador	
170	La fuente de error	
171	Genética, AI e ID	
181	AF en una dimensión socioeconómica	
187	Modularidad, integración morfológica y asimetría	
190	Asimetría en su dimensión geoespacial	
191	Modelo de análisis hiperdimensional de la asimetría	
194	Capítulo XI: Conclusiones	
196	Capítulo XII: Bibliografía	
a	Anexo 1: encuesta socioeconómica realizada por el proyecto CANDELA	
h	Anexo 2: ejemplos de consentimiento informado e información sobre el proyecto CANDELA	
j	Anexo 3: protocolo de extracción de DNA en el proyecto CANDELA	
l	Anexo 4: estimación de la asociación de genoma completo y caracteres cuantitativos	
n	Anexo 5: Procrustes ANOVA por módulos faciales	
o	Anexo 6: publicaciones asociadas a la tesis	
az	Anexo 7: resultados sobre la dependendencia lineal entre la ingesta de hormonas y la asimetría fluctuante facial	
ba	Anexo 8: detalle de los antropobiotomas o <i>anthropomes</i>	

La iniciativa CANDELA recibió presupuesto de Leverhulme Trust (F/07 134/DF) y BBSRC (BB/I021213/1), ambos asignados al Dr. Andrés Ruiz-Linares adscrito a la University College of London. Además, la siguiente tesis doctoral y sus respectivas publicaciones fueron financiadas por el Programa de Becas Latinoamericanas del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) otorgadas al autor, número registro 41488, dirigido por el Dr. Rolando González-José y codirigido por Dr. Ivan Perez.

Agradecimientos

Rolo, gracias porque además de director, eres un amigo entrañable. Te agradezco la confianza para este trotsko, por ser determinante cuando se necesito, permisible con mi necesidad de estar en México y por enculturizarme en la vida patagónica. Espero esta tesis represente el nivel de tus trabajos.

Iván, gracias, aún sin conocerme te sumaste al proyecto de codirigirme. Eres una pieza fundamental en mi formación. Mis estancias en La Plata fueron muy cómodas trabajando a la par y con todo el equipo del Lab. Nada más complicado que tu silencio ante los resultados. También, gracias por el apoyo en la presentación de todos los documentos y tantos favores realizados a la distancia.

Antonio, gracias, pues eres el responsable directo de mi entrada en estos campos de la antropología biológica. Hemos sido muy afortunados los alumnos de las generaciones que tomamos clases contigo. Tu peculiar forma de transmitir la evolución, tus buenos consejos, además de tu amistad han determinado mucho de mi camino académico y personal.

Jorge, amigo cuasi hermano, gracias. Que bueno que no somos capitalistas, porque la monetarización de todo lo que has hecho por mi, ya tiene dimensiones de la deuda externa mexicana. Espero regresar un poco de lo mucho que me has brindado hermano. Muchos de los rumbos que tome en mi vida académica te los debo al 100%.

Neus, la segunda al mando de la morfometría en mi carrera. A la distancia siempre has escuchado mis consultas y siempre serás mi referente. Espero construir trabajos futuros.

Al Dr. Carlos Serrano Sánchez, gracias doctor, su apoyo como contraparte en México de la beca argentina fue determinante. Sin su ayuda no hubiera resultado la misma salida. Estoy en deuda con usted.

A la Dra. Paula González por su apoyo en la realización de la estancia misma que determinó el pronto término de mis objetivos académicos en la UNLP.

A los integrantes del Proyecto CANDELA, Andres Ruiz Linares, Kaustubh Adhikari, Samuel Canizalez, Victor Acuña, Carla Gallo, Giovanni Poletti, Cátira Bortolini, Tábita Hünemeier, Gabriel Bedoya, Samuel Canizales, Macarena Fuentes, Paola Everardo, Francisco de Ávila, Javier Rosique, Lavinia Schuler, Claudia Jaramillo y William Arias.

Al CENPAT, a todo el personal, amigos y compañeros. No hay nada mejor que trabajar con gente con tan buena onda, de muchos me he llevado historias y detalles únicos. Gracias. En especial a Julio Lanceloti, Javier Ciancio, Lucas Cheme, Gastón Martínez, Agustina Gomez Leinch, Nadia Haidir, Marlene Bar, Mary Viglino, Pablo Teta, Anahí Formoso, Lali Parolin, Felipe Busker, Dario Podestá, Pato Dell'Arciprete, Alexa Sapoznikow, Ariadna Svoboda y Julio Torres.

A todo el personal del CEPA Argentina: Madryn, Trelew y Bs As; que me permitieron colaborar en las tareas de capacitación y atención prehospitalaria. En especial a Miguel, Gonza, Sandra, Sebas, Ana, Ceci, Marlene, David de Madryn; a Gaby, Luis, Luis, Miguel, Vane, Ana, Pato, Mauro, Johe, Flor, Melina, Vane de Trelew, Cecilia, Esteban, Ino, Tibu de Bs. As.

A los amigos del muro de escalada, Santi, Juli, Beto, Javi, Gonzalo, Cristian, Romi y Marce. Chida banda de escaladores. A Kevin Zaouali, super Kev, geniales las experiencias escalando y fotografiando, aprendí muchísimo de tus imágenes.

A los amigos del Laboratorio de Evolución Morfológica del FCNyM-UNLP: Fede, Leandro, Lucas, Naty, Ludmi y Guido. Gracias Fede y Magda por darme asilo político durante mi estancia en la Plata. Además, Nehuen Defosse por tu buena onda de recibirme en alguna estancia en la Plata. Gracias al buen Alex Serna por la buena onda en los cursos, así todo fue menos tedioso. A Virginia Lynch por el reencuentro después de tantos años.

A Lucia Castelló, gracias Lu! por la buena onda durante mi estancia en Córdoba, aunque faltó una escalada siempre fueron agradables los encuentros por CBA.

A Milena, porque me enseñó que hay personas que no les da miedo vivir intensamente a pesar de que todo haya caído apenas unos instantes atrás. Gracias Mile, que suerte haberte conocido por estas latitudes.

A Silvina, Luchi, Jero, Vicky, Sofy y Lola, gracias por la compañía, los mates y las risas durante mi estancia en Madryn, pero sobre todo por adoptarme como parte de los suyos: ¡Son mi familia!

A Ino, millones de gracias, siempre diste asilo político a este rojo trotsko por Bs As. Lindas charlas y comidas que nos armamos. Estoy en deuda contigo, mis estancias por allá no pudieron ser mejores, bueno solo la comida del Sr. Souto.

Al vecindario cenpatiano,, gracias: Vero, Marina, Ana y Andrés (Itatí), Cristian, Gustavo, Jesi y Mario. Muy en especial Mili y Andrea con quienes más compartí en el vecindario.

A Noela, gracias por tu amistad. Aprendí mucho de ti, tengo muchos recuerdos de tu cara tratando de entender cada nueva herejía que salía de mi boca. Esperemos que sigamos perpetuando el ritual del sushi (que por cierto nunca fue equitativo).

Al Dr. Emiliano Bellini, teacher, sensei, maestro, Gracias Emiliano, por la buena onda de no putear ante mis "obras" de arte y tratar de verle el lado bueno a mis incipientes trazos de niño de kínder, por la amistad y por abrirse a éste mexicano trotsko. A Nahuel y Hora, a los "enanos" Joaquín y Pablo, y a la pequeña Francisca. A Cari Ambrosio y su familia por su recibimiento, a los peques Salvador y Luka. A Luli y Capocha.

A mi núcleo: Celia, Virginia, Marina, Carolina, Sol, Caio y Vero. Altos amigos y asesores directos post-apocalípticos de la biología humana. Gracias por soportar mi loquera, por tantos momentos compartidos, por lo aprendido a su lado, pero sobre todo por la amistad de cada uno de ustedes. Celia, gracias por ser mi pythoniza y estrellita a la vez, te quiero y te admiro muchísimo. Virginia, este pebete ha terminado su tesis, voy a extrañar tus comentarios tan geniales, ¡eres una genia!. Marina, gracias por toda tu enculturización, por tus consejos, amistad y por siempre apoyarme en todo. Eres una amiga entrañable, extrañaré los mates y las platicas interminables y tu buena onda de siempre, gracias por regalarme la intensidad de tu forma de vida. Carito, te debo mucho por todo tu apoyo, a pesar de que no te daba de cenar en México, tu si me alimentabas, extrañare todas tus ocurrencias e imitaciones a personajes diversos. Solchis, gracias por internar ayudarme en los locos análisis que se me ocurrían, no me olvidaré de que le hablabas a las impresoras y de tus caras al tratar de entenderme. Caio, mi estimado amigo, gracias por la convivencia en casa, por las largas charlas de mexicano-portuñol, no pudo ser mejor mi última estancia en Madryn. A Verito, gracias por la amistad y por jugártela a realizar trabajos conjuntos, aun te debo uno. Gracias amigos, los quiero mucho.

A los amigos mexicanos que a la distancia estuvieron acompañándome en el proceso: Mauro y Martha, Lowy, Pablo, Adrián, Erika, Ana Serrano, Silvionel, Tina, Ere, Roska, Ana Gutiérrez, Arturo y Aracely. Gracias por estar cerca de alguna manera durante mi estancia fuera del "obligo del mundo".

A los que se quedaron en el camino y de quienes no pude despedirme por estar lejos: a mi abuelo Eutimio y, a mi maestra y amiga, Elena García.

A Arodi. Gracias Aro, fuiste el detonante o catalizador de por lo menos la mitad de mi estancia en Madryn, desde meterme en este tema de las asimetrías hasta viajar con Gina a Patagonia. Me regalaste el pleno significado de la palabra irreversibilidad.

Kame, gracias hermano, me secundaste siempre en mis decisiones y estuviste muy cerca cuidando a Regina y soportando mi ausencia. Se que estas feliz y que vas por más en la vida, te apoyo en todas tus decisiones. Aun tienes el reto de dejarme en cero en el básquet, sigue entrenando chavo.

A Violeta, gracias Vio, como excelente tía también arropaste a mi Gina con mucho cariño. Es genial tenerte en nuestra familia.

A mi familia materna, especialmente a mis tías Lucelia y Paula por todo su cariño. A mis primos, especialmente a Ar. A mi abuelita Magdalena, que siempre será un ejemplo y pilar de mi vida, gracias Abue, aún con la ausencia de mi Abue sigues siendo un Roble.

Alicia, gracias Ma, tu apoyo ha sido determinante siempre. Tu esfuerzo, preocupaciones, alegrías y amor, me han permitido llegar a concretar mi formación académica. ¿alguna vez pensaste que esa masa de pelos que pariste llegaría a ser un *dotor* en ciencia?

Regina, a ti bichito por sobre todo. Cada letra, cada trazo, cada idea es mi apología a tu frase "no te vayas papá" que me dijiste aquel diciembre del 2011 antes de partir a Patagonia, y que cada noche fue una afrenta para mi. No hubo cosa más difícil en mi proyecto que estar lejos de ti, sortear la ausencia de tu alegría, lo reconfortante de tu dulce mirada y del sonido de tu risa traviesa. Pero estas letras significan también un objetivo cumplido y la búsqueda de nuevos horizontes juntos. Gracias por tanto amor y perdóname por tan poco a tu lado en éste tiempo, por la ausencia. Aunque te negaron el mar, la montaña y el viento, mi regreso a ti nos permitirá caminar juntos para continuar cumpliendo nuestros sueños.

Gracias a todos por tanto...

Puerto Madryn-Coyoacán, agosto2015- febrero2016

Abreviaturas

AI=asimetría individual
AF=asimetría fluctuante
AD=asimetría direccional
AA=antiasimetría

CAS=completa aleatoriedad espacial
CS=*centroid size*

ED= estabilidad en el desarrollo

GWAS= *genome-wide association study*- estudio de asociación de genoma completo

He=heterocigosidad
HMF=hipótesis de modularidad funcional
HMCSI=hipótesis de modularidad de cara superior e inferior
HMLM=hipótesis de modularidad de la línea media
HMNC=hipótesis de modularidad neurocráneo-cara

ID=inestabilidad en el desarrollo
IF=integración fenotípica
IM=integración morfológica

MD= modularidad del desarrollo
ME=modularidad evolutiva
MF modularidad funcional
MGe= modularidad genética
MG-F=mapa genotipo-fenotipo
MS= *mean squares*
NRD= norma de reacción del desarrollo

PE=psicología evolucionista

QTLs=*quantitative trait locus*- locus de un carácter cuantitativo.

RD=ruido del desarrollo
RMSE=*root mean squares error*

SES= estatus socioeconómico
SS= *sum of squares*
SVE=varianza escalada de los eigenvalores

Veevt=Varianza de los eigenvalores escalada por la varianza total
Veevtnv= Varianza de los eigenvalores escalada por la varianza total y numero de variables.

Resumen/Abstract

La inestabilidad del desarrollo ha sido evaluada por medio de múltiples indicadores cuantitativos, siendo la asimetría fluctuante facial uno de los más utilizados a tal fin. La idea detrás de este planteamiento es que un solo genoma controla la expresión de ambos lados del rostro por lo que toda variación asimétrica observable, si no hay mutaciones presentes, debería ser parte del proceso epigenético. En este planteamiento yace una visión idealista de la conformación de mapa fenotipo-genotipo, donde existe un *bauplan* en que un individuo sin perturbaciones ambientales endógenas y exógenas debería exhibir asimetría individual cero. Sin embargo los procesos estocásticos de división y crecimiento celular predicen un patrón en tensión y la presencia de niveles de asimetría de base en diversas estructuras. En la presente tesis es explorada la pertinencia de la asimetría fluctuante como indicador de inestabilidad en el desarrollo mediante el análisis de la muestra colectada por el proyecto CANDELA en cinco ciudades latinoamericanas, en un análisis que integra desde una perspectiva bioantropológica, cuatro niveles de análisis: la genética, la biología, el estatus socioeconómico y la distribución geoespacial.

Por medio del un protocolo fotogramétrico fue reconstruida la forma facial en 3D con el uso de 34 loci anatómicos o *landmarks*, mismos que fueron posteriormente analizados utilizando los métodos de morfometría geométrica. Concretamente, fue utilizado el análisis de Procrustes ANOVA con el fin de caracterizar la asimetría individual respecto de covariables como el tamaño, la edad, el sexo, la ancestría, etc.

Todos los individuos incluidos en el presente modelo de análisis presentaron algún grado de asimetría facial. Se verificó que la asimetría direccional es la principal fuente de variación asimétrica facial en mestizos latinoamericanos, y que existe una diferencia entre los extremos de los parentales europeo y amerindio respecto de la asimetría direccional. Además, es observada una tendencia a presentar menor cantidad de asimetría fluctuante cuanto más heterocigoto es el individuo. La asimetría fluctuante es influenciada por el sexo, el BMI, la edad y la ancestría genética. Se ha podido comprobar además, que los patrones de integración morfológica y modularidad son diferentes entre los morfoespacios simétrico y asimétrico. Además, existen patrones de integración común para el pabellón auditivo y ojos, y una disrupción de integración para nariz y boca. Finalmente, y contrario a lo predicho por otros autores, no se encontraron dependencias lineales entre la asimetría fluctuante y los indicadores socioeconómicos, los ambientes perturbados y la geografía.

Contrario a lo predicho por publicaciones anteriores, no se encontró evidencia suficiente para alentar la aceptación de la relación lineal entre la asimetría y la inestabilidad en el desarrollo, por el contrario parece ser que dicho indicador universal no es general a la especie humana.

Facial asymmetries are commonly viewed as indirect indicators of development instability. The idea behind this approach is that a single genome controls the expression of both sides of the face, thus all observable asymmetric variation, in absence of mutations, would be the result of non-genetic factors. Such idea is based on an idealistic vision of the genotype-phenotype map, where a *bauplan*, in an individual without endogenous and exogenous environmental disturbances, should exhibit perfect symmetry (or asymmetry equal zero). However stochastic processes of cell division and growth predict a different scenario including the presence of basal asymmetry levels as part of the natural variation. Here I explore the relevance of fluctuating asymmetry as an indicator of development instability by analyzing a large sample collected by the CANDELA initiative in five Latin American cities. The analyses presented here are aimed to integrate, under a bio-anthropological perspective, four levels of analysis: genetics, biology, socioeconomic, and geography.

Using a photogrammetric protocol, 3D facial shape was reconstructed using 34 anatomical landmarks. These landmark configurations were subsequently analyzed using geometric morphometric methods such as Procrustes ANOVA, in order to characterize the association among fluctuating and directional asymmetries and several covariates such as size, age, sex, ancestry, etc.

All individuals displayed some degree of facial asymmetry, and directional asymmetry was the main source of asymmetric facial variation in Latin American mestizos. Also, the European and Amerindian genetic extremes of variation displayed a differential asymmetry pattern, whereas heterozygous individuals tend to exhibit smaller fluctuating asymmetry levels. These relationships are conserved after removing the effect of significant covariates such as sex, BMI, and age.

The analyses focused on morphological integration and modularity indicated that symmetric and asymmetric morphospaces differ in terms of integration patterns. Furthermore, there are common patterns of integration on the pinna and eyes, and a disruption of integration in the nose and mouth. Finally, and contrary to predictions made by other authors, I find no linear dependency between fluctuating asymmetry and socioeconomic indicators, disturbed environments and geospatial distribution.

A diferencia de los teóricos del determinismo biológico, que tienen una visión simple, o incluso simplista, de los fundamentos y de las formas de la existencia humana, no pretendemos saber lo que es una descripción correcta de todas las sociedades humanas, como tampoco podemos explicar todo comportamiento criminal, las guerras, la organización familiar y las relaciones de propiedad como manifestaciones de un mecanismo único. Nuestra opinión es, más bien, que la relación entre el gen, el medio ambiente, el organismo y la sociedad es de tal modo compleja que el simple argumento determinista no ha logrado abarcarla. Pero no concluimos nuestro análisis cruzándonos sencillamente de brazos y excusándonos alegando que todo es demasiado complicado para ser analizado. Por el contrario, deseamos proponer una visión alternativa del mundo. Esta visión proporciona un marco para el análisis de sistemas complejos que no mata para diseccionar, sino que mantiene toda la riqueza de la interacción inherente al sistema de relaciones. Antes de que podamos iniciar la tarea de construcción debemos, no obstante, volver brevemente a nuestro viejo negativismo y dejar bien claro nuevamente aquello que no proponemos.

Lewontin, Rose y Kamin, 1984, *Not in our genes*.

Introducción

Fundamento teórico

La comprensión de los sistemas complejos representa uno de los más grandes desafíos para la biología moderna. El mapeo genoma-fenotipo es un claro ejemplo de ello. La evidencia actual sugiere que la complejidad de la integración del fenotipo es radicalmente diferente de la tradicional idea *un gen, un fenotipo* (e.g. Mezey et al., 2000; Wagner y Zhang, 2011; Hill y Zhang, 2012; Gjuvsland et al., 2013). El entendimiento de las posibles rutas genéticas y sus interacciones están lejos de ser entendidas en su totalidad. Realizar acercamientos no deterministas es una tarea complicada ya que las herramientas desarrolladas, si bien dan un panorama o permiten ver tendencias, no suelen estar epistemológicamente diseñadas para propender a un total entendimiento de éste proceso. No hay que olvidar que la ciencia es sólo el perfectible intento humano por conocer la verdad (Césarman, 1997).

La cara humana como fenotipo complejo

Los sistemas complejos existen en los diferentes niveles de organización desde el rango subatómico hasta los individuos u organismos, incluso en las poblaciones y entre ellas. Por ejemplo, el cerebro humano es un sistema complejo y no lineal que desafía todos los intentos reduccionistas y deterministas para entenderlo (Singer, 2007). De igual manera, si aumentamos el nivel de complejidad al cuerpo humano, el mismo fenómeno se repite (reiteración de la complejidad). Lo necesario entonces es un nuevo enfoque para el estudio de estos sistemas; y la teoría de la complejidad puede proporcionar nuevas herramientas conceptuales que inevitablemente cuestiona muchos de los supuestos de la ciencia newtoniana o tradicional (Van Regenmortel, 2004; Mazzocchi, 2008). Basta recordar la visión determinista de Francis Crick sobre el movimiento moderno de la biología "*el objetivo final en la biología es explicar toda la biología en términos de la física y la química*" (Crick, 1966). No obstante, este esquema reduccionista demostró ser una metodología analítica extremadamente potente y que permitió a los científicos analizar muchos procesos moleculares y celulares básicos (Mazzocchi, 2008). En la actualidad, el polifacético paradigma de la complejidad consiste más bien una forma unificada de pensar en lugar de un cuerpo acabado del conocimiento. De esta forma, más allá de una formulación matemática directa tomamos a la teoría de la complejidad, general de sistemas, no linealidad y estructuras disipativas como eje de respuesta de los modelos construidos. En este sentido, los planteamientos y modelos presentados en esta tesis cumplen con principios de conectividad, interdependencia, diversidad, adaptabilidad, vía/ruta dependientes (canalización) y emergencia (Mazzocchi, 2008).

Para algunos autores, el desarrollo craneofacial es un proceso complejo que refleja las fuerzas evolutivas que controlan la morfogénesis. Una de las causas de la complejidad de la cabeza de los vertebrados, y en especial la de los mamíferos, es el gran desarrollo del encéfalo y los órganos de los sentidos. Además de que en la cabeza se encuentran las porciones iniciales del tubo digestivo y del tracto respiratorio (Velayos, 1998). La región craneofacial en vertebrados protege el cerebro y aloja los órganos sensoriales y las estructuras relacionadas con la

alimentación. Por ende, la supervivencia de diversas especies de vertebrados depende justamente de la habilidad para percibir y devorar a sus presas (Parada, 2009). Las variaciones en anatomía y función del complejo craneofacial son una de las mejores evidencias de adaptación evolutiva (tesis adaptacionista). Por lo tanto, el mayor de los retos al estudiar la evolución, desarrollo y función de la cabeza humana es su gran complejidad (Lieberman, 2011). La perspectiva aquí defendida a diferencia de los marcos reduccionistas tradicionales, da un intento integrativo, ya que en ciencia, bajo esta estrategia se vislumbra una mejor y promisoría respuesta a los fenómenos en estudio (ver revisión en Gatherer, 2010).

El proceso de desarrollo que genera una morfología compleja como la cara, puede ser dividido en tres niveles jerarquizados: patrón, morfogénesis y crecimiento. Para reiterar, el patrón genera unidades básicas de la cabeza, cada uno con su propia posición e identidad; la morfogénesis crea tejidos y órganos de la cabeza; y estas unidades luego maduran a través del crecimiento subsiguiente, el cambio de forma y tamaño en respuesta a una combinación de influencias intrínsecas y extrínsecas (ver Lieberman, 2011).

Van Der Klaauw, (1945) citaba que el cráneo consiste de un número de partes funcionales relativamente separadas, que difieren en tamaño, posición y agrupamiento. Éste autor propuso componentes funcionales como el cerebral, ocular, olfatorio y oral. Más tarde se ha postulado que dichos componentes están en una independencia funcional relativa (Pucciarelli, 2008). Este concepto era el preámbulo de la formulación de la integración morfológica desarrollada por Olson y Miller, (1958), donde cada componente o módulo del organismo debería estar formado de tal manera que su participación en estructura y función del todo del organismo, se exprese con respecto a todas las otras partes. Lo anterior prueba que el cráneo es una estructura tanto modular como integrada, otra característica que suma aún más a su complejidad.

Estructura, desarrollo, crecimiento y función faciales

Desde la fecundación y durante todo el proceso de embriogénesis, una compleja red de mecanismos moleculares integran el embrión humano (Figura 1.1), con una sucesión de interacciones a nivel bioquímico, celular, orgánico y sistémico en los diferentes estados del desarrollo (Sperber, 2006). Este complejo espacio multidimensional tienen una interacción con el ambiente en diferentes niveles y básicamente se compone por la integración dialéctica de la genética, la expresión génica, los mecanismos receptores, las señales de transducción y la diferenciación de las células madre totipotenciales en diferentes tipos de células que forman tejidos, órganos y sistemas (Sperber, 2001).

La cara puede ser descrita anatómicamente mediante la descripción ósea o de tejido blando. Para el primer caso se puede referir que la cara está conformada por el esplanocráneo (Rouvière y Delmas, 2005), que al ser parte del cráneo representa una estructura compleja y de prioritaria importancia ya que involucra rasgos claves para la estimación del sexo y la edad (White, 2000). El esqueleto facial se halla situado en la parte anterior e inferior de la cabeza, está dividido en dos porciones esqueleto facial o viscerocráneo y mandíbula (Latarjet y Ruiz Liard,

2008). De esta manera, la cara está representada por doce huesos mayores, el maxilar, nasal, zigomático, lacrimal, palatino, concha nasal y vómer; con la mandíbula el número llega a trece; de igual manera, algunos autores incluyen al hueso hioides como parte de la cráneo por su derivación embrional (Schwartz, 1995).

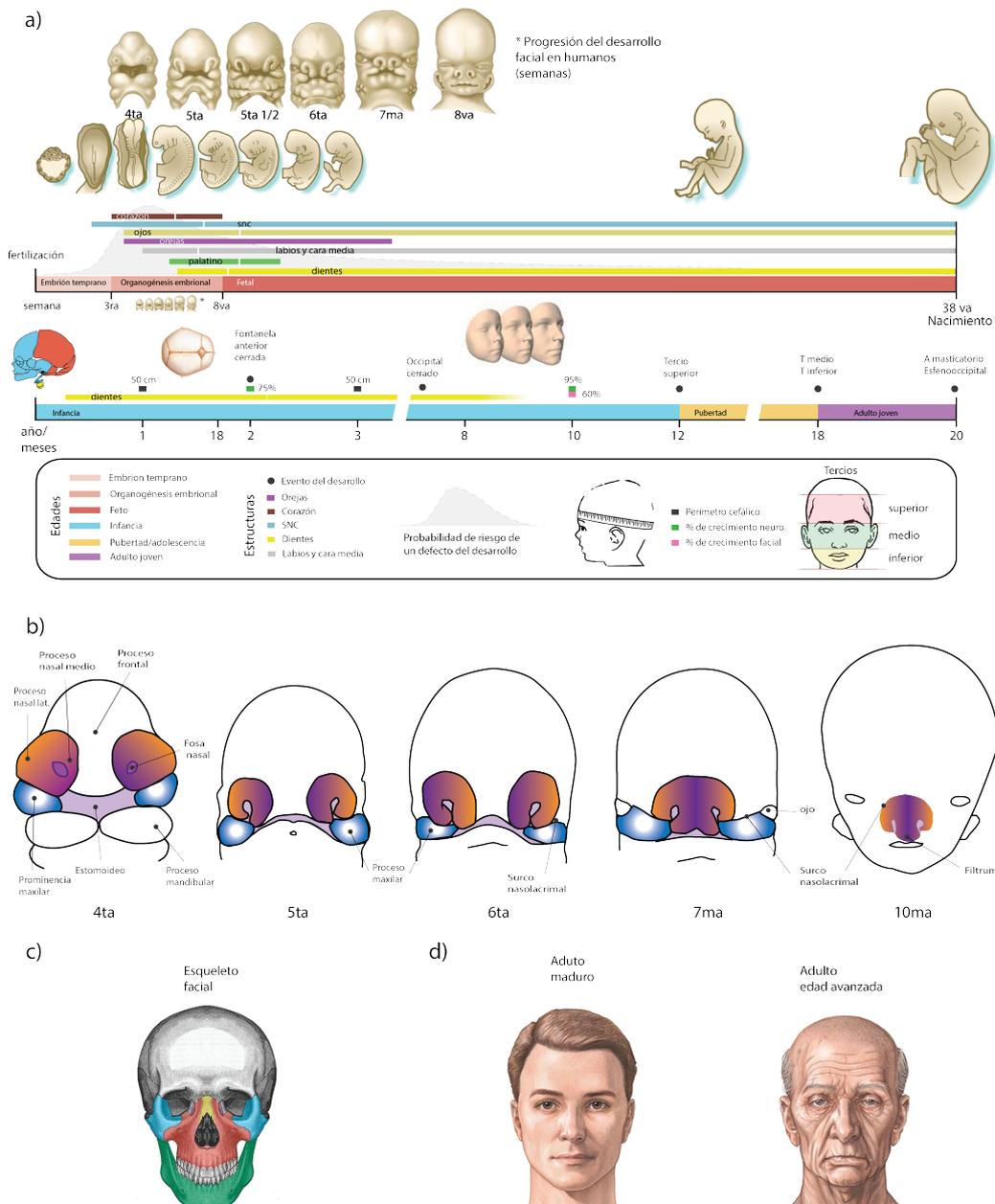


Figura 1.1. Estructura, desarrollo y crecimiento facial. a) desarrollo y crecimiento con énfasis en la cara. Se puede observar el proceso de formación de cada estructura facial: ojos, orejas, palatino, dientes, labios y cara media, respecto del corazón y el sistema nervioso central. También se puede ver la curva de probabilidad de riesgo de defectos en el desarrollo. Asimismo se relaciona los diversos cambios asociados al desarrollo y crecimiento craneofacial por medio del perímetro facial y cierre de suturas. El recuadro es la clave de las señalizaciones de esa sección. b) Detalle del proceso de desarrollo embrionario de las estructuras faciales de la semana cuatro a la diez. c) Aspecto del cráneo con énfasis en los huesos de la cara, esta imagen se usa como referencia de las estructuras óseas que intervienen en la configuración de la cara. d) Aspecto fenotípico externo de una cara adulta y de una cara con visible envejecimiento, se observan los cambios asociados a la edad: prolapsos de tejidos por pérdida de plasticidad o crecimiento de orejas.

En cuanto al tejido blando, se ha dividido en tercios (superior, medio e inferior), en estructuras (ojos, orejas, boca, nariz, mejillas, frente) y otros autores lo han diferenciado en dos secciones (superior e inferior)(Rouvière y Delmas, 2005). La parte superior incluye cuatro regiones principales: dos medias, la región de la nariz y la región de las cavidades nasales y dos laterales, las regiones orbitarias. En la parte inferior o bucofaríngea de la cara se incluye un gran número de regiones dispuestas alrededor de la cavidad oral y de la faringe (Rouvière y Delmas, 2005). Éstas son: región mentoniana, de la mejilla, masetérica, infratemporal, palatina, ionsilar, retrofaríngea, laterofaríngea (subdividida en retroestíleo y preestíleo) y suelo de la boca (lingual, sublingual y suprahoidea).

Enlow, (1990) cita que las variaciones comunes u ordinarias de la cara se deben a tres factores generales: 1) diferentes tipos faciales definidos en la manera como se relacionan con los cambios de forma y el aspecto global de toda la cabeza (morfología tipologista), 2) variaciones faciales entre varones y mujeres (dimorfismo sexual), 3) diferencias entre las caras de niños y adultos (ontogenia).

Alrededor la cuarta y quinta semana del desarrollo y a través de un origen embrionario común las regiones de la cabeza y del cuello se desarrollan a partir de las estructuras que componen el aparato faríngeo (Rouvière y Delmas, 2005). Éste aparato está conformado por: arcos faríngeos, bolsas faríngeas, hendiduras faríngeas y las membranas faríngeas. La cara se conforma mayoritariamente de los arcos faríngeos, mediante su transformación en estructuras adultas. El resto de estructuras, bolsas, hendiduras o membranas faríngeas, desaparecen durante el desarrollo embrionario o permanecen generando órganos de la región craneofacial (Rouvière y Delmas, 2005). Los arcos faríngeos se conforman de núcleo mesenquemático, ectodermis y endodermis, comúnmente llamadas capas u hojas blastodérmicas. Después del inicio de su desarrollo las células de la cresta neural migran hacia ellas para constituir la fuente principal de tejido conjuntivo (cartílago, hueso, ligamentos) de la región bucal y facial. Al final de esta etapa cada arco cuenta con una arteria, un cilindro de cartílago, un nervio y un componente muscular. El desarrollo de las estructuras de la cabeza y cuello (*e.g.* lengua, labios, mentón, paladar, etc.), depende de la desaparición de algún componente del aparato faríngeo (*e.g.* las bolsas faríngeas) o su transformación en estructuras adultas.

Específicamente, el desarrollo facial se inicia en la cuarta semana a partir de la aparición de algunas prominencias derivadas del primer par de arcos faríngeos, alrededor del estomodeo primitivo. La prominencia frontonasal forma la frente y la punta y dorso de la nariz. Los procesos nasales laterales que forman las alas de la nariz, los procesos nasales mediales, el tabique nasal y el surco subnasal del labio superior (*philtrum*). El par de prominencias maxilares, constituyen posteriormente las regiones superiores de la mejilla y la mayor parte del labio superior. El par de prominencias mandibulares forman el mentón, el labio inferior y las regiones inferiores de la mejilla.

El desarrollo de la cara es similar en todos los mamíferos. En conjunto con la región mandibular ocurre un fenómeno tridimensional que implica la formación, crecimiento, fusión y moldeado de una gran variedad de tejidos. El prosencéfalo actúa como soporte mecánico y como centro emisor de señales para el desarrollo facial primitivo, mientras que el estomodeo

funciona como punto morfológico de referencia. La región maxilar y mandibular de la cara derivan del primer arco faríngeo, donde parte del mesénquima facial proviene de células de la cresta neural (Meruane et al., 2012).

Según Moss y Salentijn, (1969) durante el crecimiento y desarrollo funcional craneofacial se involucran dos tipos básicos de matrices funcionales: la perióstica y capsular. La matriz perióstica incluye músculos y dientes, mientras que las matrices capsulares se conciben como volúmenes cerrados y protegidos como los son las cápsulas neurocraneal y orofacial. En el cráneo neural la matriz capsular es la masa neuronal. En el cráneo facial esta matriz es el espacio de funcionamiento de la cavidad oronasofaríngea. La matriz perióstica actúa sobre las unidades esqueléticas de una manera directa, en los procesos de deposición ósea y la resorción (o de la multiplicación tejido cartilaginoso o fibroso) (Moss y Salentijn, 1969). Su efecto neto es alterar la forma (tamaño y forma) de sus respectivas unidades esqueléticas. La matriz capsular actúa sobre matrices de componentes craneales funcionales en su conjunto de una manera secundaria e indirecta, alterando el volumen de las cápsulas dentro de las cuales se incrustan los componentes funcionales craneales. El efecto de tales cambios en el crecimiento es causar una traducción pasiva de estos componentes en el espacio craneal, y el crecimiento craneal es una combinación de la actividad morfogenética primaria de ambos tipos de matriz. El crecimiento se lleva a cabo por la traducción y las cargas en forma espacial (Moss y Salentijn, 1969).

Desde el comienzo de su desarrollo en el día 37 (Figura 1.1), hasta el momento del nacimiento la cara ha pasado por una serie de procesos continuos que le han conferido funciones vitales como la respiración, alimentación, visión, etc. (Sadler, 2012). Al momento del nacimiento los huesos craneales están separados uno de otro por suturas estrechas de tejido conectivo, que también se derivan de las células de la cresta neural (sutura sagital) y mesodermo paraxial (sutura coronal). Aquellos puntos de unión entre más de dos huesos, las suturas son amplias y se denominan fontanelas (Sadler, 2012). Aunque un niño de cinco a siete años de edad cuenta con casi la totalidad de su capacidad craneal, algunas sincodrosis permanecerán sin “cerrar” hasta la edad adulta (e.g. la esfenobasilar que cierra hasta los 22-28 años) (Sadler, 2012). En la mayoría de los casos, la fontanela posterior cierra a los dos meses, la anterior se cierra a los tres meses, la posterolateral a los dos años al igual que la anterior (Scheuer y Black, 2004) y la sutura medial queda obliterada entre los seis y ocho años. Durante el desarrollo la relación de volumen de la cara respecto del neurocráneo difiere al nacimiento la proporción es 1:8, 1:6 al segundo año, 1:4 a los 5 años y de 1:2 para la edad adulta (Scheuer y Black, 2004).

En cuanto al crecimiento, al nacimiento el cráneo ha crecido un 25% de su volumen total, a los seis meses ya ha alcanzado el 50%, a los dos años el 75% y a los diez años el 95% de su crecimiento. Para esta misma edad, la cara solo tendrá un 65% de su crecimiento, lo que claramente refleja una diferente tasa de crecimiento en dichas estructuras. De igual manera se ha reportado que el tercio superior de la cara crece a una tasa más rápida, logrando su crecimiento total a los 12 años. El tercio medio e inferior logran su desarrollo durante la adolescencia. Finalmente, el aparato masticatorio es el último en dejar de crecer y lo hace entre

los 18 y 25 años (Scheuer y Black, 2004). Resta señalar que el crecimiento facial humano está íntimamente relacionado con el crecimiento de otras partes del cuerpo, por ejemplo, el inicio del crecimiento puberal de la altura, tamaño facial y la longitud mandibular se produce en las niñas en 9.3 , 9.8 , y 9.5 años , respectivamente. En los niños estos eventos ocurren a los 11.9 , 12.0 y 11.9 años, respectivamente. En las niñas, el pico de la aceleración del crecimiento en altura, el tamaño de la cara y la longitud mandibular se produce a los 10,9 , 11,5 y 11,5 años y en niños a 14.0, 14.4 y 14.3 años (Mellion et al., 2013). Lo anterior representa la cúspide de los cambios corporales por crecimiento y la antesala de la maduración y donde las más claras evidencias de dimorfismo sexual de la cara y cráneo emergen. Se considera que la edad óptima para observar la diferenciación sexual es 18 años, cuando se ha terminado el desarrollo de las características que aparecen durante la pubertad (Krogman y Iscan, 1986).

La cara alcanzaría su un aspecto adulto después entre los 18-20 años (Figura 1.2), existiendo rangos diferentes, ya sea prematuros o tardíos (Mellion et al., 2013). Es decir, después del pico de crecimiento puberal, las estructuras faciales están en su maduración y comienzan el proceso de envejecimiento.

La aparición del envejecimiento facial es causada por el desgaste de volumen de tejido blando y pérdida de apoyo. Además, existe una deficiencia de proyección del hueso maxilar, con la depresión del lagrimal y el párpado, que ya está presente en la edad adulta y que se desenmascara con la edad (Levine et al., 2003). El proceso de envejecimiento es un constante crecimiento y remodelación de los huesos de la cara , lo que da lugar a cambios en la morfología facial (Som y Naidich, 2014). En la edad adulta tardía, la mandíbula y maxilar muestran cambios armónicos, sobre todo en el aumento tanto en la piel como en la superficie ósea (Farkas et al., 2004). El envejecimiento facial es un proceso dinámico que implica el envejecimiento de las estructuras de tejido y óseas blandas. La forma en la cara pierde volumen a medida que aumenta la edad. El adelgazamiento epidérmico y la disminución en el colágeno causa que la piel pierda su elasticidad. La pérdida de grasa, junto con la gravedad y la tracción muscular, conduce a la formación de arrugas y la formación de líneas de celulitis (Kahn y Shaw, 2010). El proceso de envejecimiento también se ha demostrado que afecta a los huesos faciales. Por ejemplo, se sugiere que el envejecimiento óseo de la órbita y del tercio medio facial es un proceso principalmente de la contracción y sustitución ósea (Kahn y Shaw, 2010).

Algunos aspectos evolutivos de las estructuras faciales

Reconstruir el proceso de evolución del cráneo en humanos es una tarea difícil. En primera instancia se tiene que precisar que las variaciones en la forma craneofacial entre los humanos reflejan los efectos de la deriva y otros cambios evolutivos estocásticos, no selectivos (Roseman, 2004; Roseman y Weaver, 2004, 2007). En este sentido, no se debe olvidar que más de un 85 % de la variación genética de nuestra especie se concentra dentro de cualquier población (Lewontin, 1972). Del mismo modo, alrededor de 80 a 90 por ciento de la variación craneométrica también está presente dentro de las poblaciones (Relethford, 1994; González-

José et al., 2004; Roseman y Weaver, 2004), lo que sugiere que los procesos estocásticos tienen un rol importante en la partición de la varianza craneofacial.

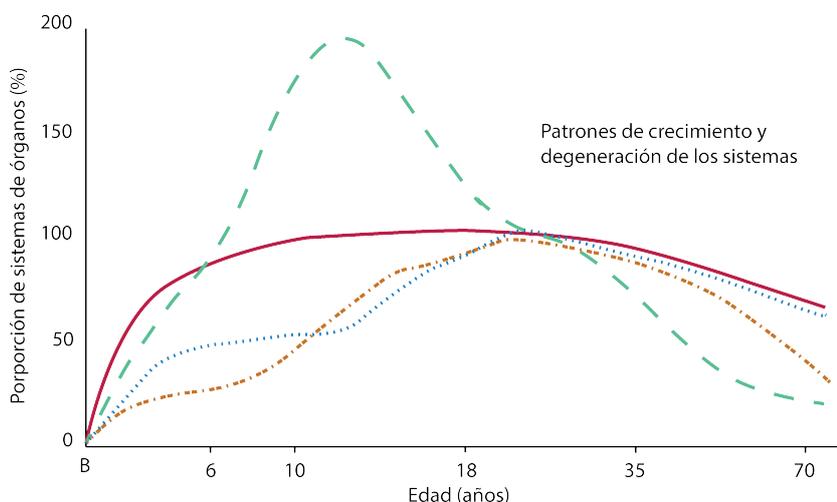


Figura 1.2. Representación gráfica de la variación proporcional de varios órganos y sistemas en la vida posnatal, donde el 100% representa el tamaño de los órganos en la fase de maduración adulta joven: sistema linfático, línea discontinua verde; sistema nervioso central, línea roja continua; dentición línea, discontinua naranja; cuerpo en general, línea azul discontinua. (modificado de Scammon, 1930).

Se sabe que *H. sapiens* se originó en África hace unos 200.000 años, evidenciándose una tendencia hacia cerebros más grandes, cráneos más esféricos y las caras más retraídas en relación a otros miembros del linaje homínido anteriores y contemporáneos (Bräuer, 2008), ya que el registro fósil es impreciso. En éste sentido, desde esos primeros *H. sapiens* los seres humanos tienden a ser menos robustos y menos variables desde el final de la Edad de Hielo (Howells, 1989, 1995; Lahr, 1996; Lahr y Wright, 1996).

H. sapiens tiene una bóveda craneal muy esférica (globular), alta, ancha y corta. La esfericidad neurocraneal implica un conjunto integrado de características derivadas de la bóveda craneal, incluyendo: parietales largos, anchos y muy curvados, tanto en el plano sagital y coronal; una región occipital larga y que no se proyecta posteriormente; y un frontal que se eleva abruptamente por encima de las órbitas (González-José et al., 2008; Lieberman, 2011). La expansión cerebral humana se asocia con una flexión de la base craneal (Lieberman et al., 2000). Como compensación, la posición de los bulbos olfatorios se modificó tomando ubicación más horizontal y disminuyendo su tamaño. El aumento del tamaño de los lóbulos temporales y frontales cerebrales también repercutió en la configuración general del rostro del humano moderno (Lieberman, 2011). Por ejemplo, la modificación en el lóbulo frontal, causó el desplazamiento del hueso frontal hacia arriba y hacia afuera (frente). El crecimiento de los lóbulos temporales produjo que las órbitas rotaran hacia la línea media. Se observa una rotación que reduce el espacio interorbitario y que repercute en la disminución del grado de protrusión bucomaxilar y de la base estructural del hueso nasal, cuando es comparado con otros mamíferos. Así, los bulbos olfatorios cambian de posición, ya que estos se encuentran en relación directa con la alineación y dirección del crecimiento del área nasal. Ante estos cambios

de la región facial media, el plano oclusal se modifica al plano horizontal, orientando los maxilares en una postura funcional (Lieberman, 2011).

La segunda diferencia importante y distintiva es que la cara *H. sapiens* se retrae en su mayoría por debajo de la fosa craneal anterior, en gran parte porque la cara es más pequeña (especialmente anteroposteriormente más corta) y la base del cráneo es más flexionada. (González-José et al., 2008; Lieberman, 2011). La región media de la cara humana moderna incluyendo el área por debajo de la nariz se retrae con respecto a la cara superior cuando se comparan los homínidos fósiles y los humanos modernos (González-José et al., 2008; Lieberman, 2011). Esta condición, conocida como ortognatismo, que es una característica auto-pomórfica de los humanos modernos (González-José et al., 2008). La retracción facial conduce a una serie de características compensatorias: un *torus* supraorbital incipiente, una fosa canina diferenciada, un espacio corto de la orofaringe entre la parte posterior del paladar y el foramen *magnum*; y las cavidades orbitales rectangulares (más anchas que altas). Otra característica derivada única importante es la aparición una barbilla mandibular (Lam et al., 1996; Schwartz y Tattersall, 2000).

Aunque el cráneo humano moderno tiene una gran gama de características derivadas ampliamente reconocidas, también se acepta que existe una alta variabilidad en esos rasgos, y que es probable que algunos especímenes caigan fuera del rango de variación del 95%, por lo que pueden ser clasificados como alguna otra especie de *Homo* (Lieberman, 2011). Al respecto existe disenso acerca de dónde trazar una línea divisoria entre *H. sapiens* y otras especies de *Homo*, sobre todo en lo referente a los diversos grados de robustez. El término robustez puede tener significados diversos pero generalmente describe un cráneo que es, en general, grande y de paredes gruesas, con superestructuras craneales marcadas. Lahr, (1996) describe que las características craneales robustas suelen incluir un *torus* supra-orbital grueso (supraciliar y del triángulo), tuberosidades zigomaxilares, fuertes líneas nucales mediales y un *torus* occipital.

Las características adicionales de la robustez del cráneo incluyen una barbilla pronunciada, el redondeo del margen inferolateral de la órbita, quilla mediosagital del frontal o de los huesos parietales, arcos cigomáticos gruesos, apófisis mastoides grandes y crestas adicionales posteriores y superiores a las apófisis mastoides. Si bien la causa de la robustez craneofacial no se conoce del todo, en general, la robustez de los cráneos humanos se ha reducido en más de un 10 por ciento en los últimos 10.000-12.000 años (Kidder et al., 1992; Lieberman, 1998). Empero, una proporción de cráneos son significativamente más robustos que el resto (Lahr y Wright, 1996) y difieren en el tamaño de los dientes, el tamaño de la mandíbula, y el tamaño de la parte superior del rostro.

La descripción anterior establece que la evolución del *H. sapiens* puede ser inferida, al menos en parte, mediante el estudio de los caracteres craneales cuantitativos. De la misma manera que a nivel especie (macroevolución), los procesos de microevolución tienen una correlación con éstos últimos. Además, contextualizar el proceso histórico-evolutivo es de necesidad ya que existe una gran afinidad a la explicación pan-seleccionista en el marco del estudio de las asimetrías humanas. Entender que el proceso de evolución no es el estudio de una variable, ayudará a aplicar el modelo desarrollado en esta disertación.

La cara simétrica como marcador de selección sexual: una apuesta evolucionista

La selección sexual es uno de los aspectos más controversiales en el estudio de la variación biológica. Desde que la idea evolutiva de Darwin acerca de la preferencia de las hembras por ornamentos en los machos se postuló, una gran atención se ha referido a dicho fenómeno. Existen numerosos trabajos sobre selección sexual y elección de pareja en muchos animales, mismos que dejan claro que aun en los sistemas más simples, la complejidad del proceso de selección sexual es grande. Existe un programa de investigación que asegura que los caracteres faciales son una clara y concisa prueba de selección sexual y elección de pareja en humanos. La idea de esta corriente, retomando a Darwin, es que la visión de que la belleza física en referencia a su función biológica es una idea equivocada (Thornhill y Gangestad, 1993). Ya que el rostro humano y sus numerosos músculos permiten expresar y comunicar toda clase de emociones, siendo un elemento esencial de la identidad del individuo, y considerándolo un factor significativo en la socialización, la psicología evolucionista propone que se habrían fijado en él características que dentro de la elección de pareja juegan un papel importante de señalización de la calidad del individuo (Thornhill y Gangestad, 1999; Fink y Penton-Voak, 2002; Luxen y Van De Vijver, 2006). El discurso de la psicología evolucionista es científicista. Así por ejemplo, la editorial de uno de sus periódicos más preponderantes refiere la autodefinición:

“primarily a scientific journal” y se describen como *“an interdisciplinary journal, presenting research reports and theory in which evolutionary perspectives are brought to bear on the study of human behavior”*. La psicología evolucionista se define como *“an approach to psychology, in which knowledge and principles from evolutionary biology are put to use in research on the structure of the human mind”* (sensu Sell et al., 2008).

El inicio de éste discurso evolucionista (se retoma éste término, diferenciándolo de evolutivo, ya que no se aplican pruebas o metodologías formales, sino simples interpretaciones teóricas), yace en las ideas de Darwin vertidas en *On The Origin of Species* (1859) y su posterior desarrollo en *The Descent of Man, and Selection in Relation to Sex* (1871) y *The expression of the emotions in man and animals* (1872) sobre la psicología, raciología, etc.

En Darwin (1871) se pueden leer líneas como:

“At some future point, not distant as measured by centuries, the civilised races of man will almost certainly exterminate and replace the savage races throughout the world [...] The break will then be rendered wider, for it will intervene between man in a more civilised state, as we may hope, than the Caucasian, and some ape as low as a baboon, instead of as at present between the negro or Australian and the gorilla”.

Este tipo de citas ha fundamentado una de las más grandes y arraigadas tradiciones asociadas al pensamiento evolucionista, *“la supervivencia del más apto”* que se refiere con la cita de Spencer (1864):

“Survival of the fittest, which I have here sought to express in mechanical terms, is that which Mr. Darwin has called ‘natural selection’, or the preservation of favoured races in the struggle for life”.

Las ideas plasmadas por Darwin (1859, 1871, 1872) deben ser leídas en el contexto de la época ya que procedían de la integración de diversas teorías circundantes de autores como Lewis Morgan, William James, Thomas Malthus y los aportes de Erasmus Darwin, Robert Grant, Charles Lyell, Joseph Dalton Hooker y tantos otros. La visión plasmada refleja una visión morganiana, la cual convergía en posiciones racistas y funcionalistas de la época. Sin embargo, Darwin tenía evidencias para virar en contra de esas visiones, pero no fue así. En Darwin (1971) se puede ver el gran dominio de ideas racistas y de *scala naturae*. Basta con mirar el título del primer capítulo "*The Evidence of the Descent of Man from some Lower Form*", que denota el arraigo a ideas de inferioridad-superioridad en el libro. Pero ¿pudo Darwin tener una posición diferente? Probablemente no, las ideas de la época no permitirían una visión diferente. Dentro del texto frases como:

"rigurosas luchas por la vida [...] variaciones ventajosas del cuerpo y del espíritu, y la consiguiente eliminación de las que son perjudiciales"(p.7), *"en las razas humanas más civilizadas"* (p.11), *"El hombre difiere de la mujer por su talla, su fuerza muscular, su vellosidad, etc., como también por su inteligencia, como sucede entre los dos sexos de muchos mamíferos"* (p. 9) o *"Es, pues, muy probable que las facultades intelectuales del género humano se han perfeccionado gradualmente por selección natural"* (p. 121).

Tienen una gran congruencia con la filosofía de corte evolucionista sobre la psicología evolucionista, aunque también con la eugenesia y el racismo. Lo curioso es que, como veremos a continuación, estas ideas, inscritas en un discurso modernizado y científicista, se publican actualmente incluso en revistas de alto impacto.

Los trabajos de investigación realizados por estas disciplinas han encontrado algunas características que pueden ser consideradas universales en el momento de elegir a los individuos que son más atractivos. Algunas de estas características son: la juventud por el hecho de que resultará en una mayor eficacia biológica (Buss, 1993, 1996), la tasa cintura/cadera de aproximadamente 0.70, que podría tener una función reproductiva, rasgos marcadamente femeninos (rasgos neoténicos) o masculinos (Scheib et al., 1999; DeBruine et al., 2006) como las facciones muy marcadas, mandíbula cuadrada, ojos pequeños, el denominado comportamiento masculino, etc. En lo referente al rostro, se ha encontrado que aquellos con características promedio (*averaged face*) o características familiares, son percibidos como más atractivos que los que no lo son (Langlois y Roggman, 1990; Cunningham, 1991; Langlois et al., 1994).

Otro rasgo considerado como un marcador "universal" es la simetría. Algunos autores han propuesto que si bien la simetría perfecta se considera "rara" o anormal en un rostro, aquellos rostros calificados como atractivos es porque poseen algún grado de simetría, la cual se encuentra dentro de los valores normales de la población (Swaddle y Cuthill, 1995; Rhodes et al., 1998, 1999; Scheib et al., 1999; Zaidel y Cohen, 2005; Zaidel y Deblieck, 2007). En el estudio de Rhodes et al., (1998) se encontró que las personas son sensibles a evaluar los diferentes niveles de simetría en el rostro. Aunque Scheib et al., (1999) refutaron esta idea encontrando resultados contrarios, las mujeres no pudieron calificar de forma precisa los niveles de simetría. Una gran

cantidad de estudios han encontrado relación de la simetría con un sinnúmero de variables. Por ejemplo, Reis y Zaidel, (2001), Reis y Zaidel, (2001), encontraron que las personas que califican la percepción de la salud en rostros manipulados digitalmente, tendían a calificar los rostros de mujeres con dos lados der.-der. como significativamente más saludables que aquellas composiciones izq.-izq. Rhodes et al., (2001) y Jones et al., (2001) encontraron que la relación entre simetría y atractivo estaba mediada por la relación entre la salud aparente y la simetría facial. Algunos pasajes son muy singulares, por ejemplo, Boothroyd y Perrett, (2000) en un estudio sobre las consecuencias de la ausencia del padre en las hijas en edades tempranas o el tipo de relaciones de los padres, encontraron una asociación entre la ausencia del padre en edades tempranas y la aparente masculinización facial, reducción del atractivo y en la salud aparente de las hijas. Estos estudios defienden la idea de que la simetría es un carácter indicativo de la salud y “buenos genes” de las personas.

Pero las evidencias presentadas por la psicología evolucionista han tenido mayor desarrollo al intentar responder los patrones del comportamiento humano a través de explicaciones evolucionistas. Por ejemplo, considerando nuevamente la simetría facial como información, Fink et al., (2005) reportaron que había una asociación significativa entre la simetría facial y la personalidad autodefinida como extrovertida. Posteriormente Pound et al., (2007), replicó el mismo estudio encontrando la misma asociación. Furlow et al., (1998) estimó que entre los hombres, la asimetría correlacionó negativamente y significativamente con el número de peleas y la propensión a la violencia física en los participantes.

Además, la atracción medida en rasgos faciales ha sido propuesta como un carácter beneficioso en el contexto bio-social, determinando el principio de “lo que es bello es bueno” y relacionándolo con la teoría de los buenos genes. Algunos trabajos han relacionado la preferencia de mujeres sobre hombres dependiendo del ciclo menstrual en la que se encuentren, prefiriendo rostros más masculinos en la fase de alto riesgo de concepción (fase folicular) y más femeninos en la fase de bajo riesgo (fase lútea) (Perrett et al., 1999). Igualmente, Little et al., (2001) encontraron que las mujeres que se veían a sí mismas como atractivas preferían los rostros de hombres más masculinos y simétricos y viceversa. También se ha encontrado que las mujeres cuyas parejas tienen altos niveles de inestabilidad en el desarrollo (ID¹) tenían mayor atracción hacia hombres diferentes de sus parejas y menos atracción a sus parejas en su etapa fértil (Gangestad et al., 2005). Explorando más esta línea, Little et al., (2002) encontraron que las preferencias por rostros masculinizados se incrementaban cuando la mujer ya contaba con una pareja o estaba considerando una relación de corto tiempo. Éste mismo estudio encontró que las mujeres usando anticonceptivos orales no mostraban estos efectos, por lo que los autores sugieren que los métodos anticonceptivos interrumpen los posibles beneficios evolutivos de una elección femenina. En contra de esta idea, se encontró que la correlación entre el atractivo y la masculinidad y el atractivo y la simetría, no difieren significativamente entre las

¹El concepto de ID se retoma como un equivalente directo de la asimetría fluctuante (AF), es decir como sinónimos, ya que la psicología evolucionista reconoce como dogma central que la AF es un verdadero indicador de la ID. Entonces, cuando en el texto se habla de ID en alguna cita de psicología evolucionista se debe tomar desde esta perspectiva.

entrevistas realizadas en la fase de alto riesgo de concepción o en la de bajo riesgo (Peters et al., 2009). Así muchos estudios más relacionan la simetría-asimetría con atractivo difiriendo en patrones entre mujeres y hombres (Gangestad et al., 1994; Schaefer et al., 2006).

Algunos estudios adicionales han relacionado la asimetría fluctuante (AF) con la cantidad de orgasmos femeninos (Thornhill et al., 1995), encontrando que las mujeres con parejas con poca AF, reportaron significativamente más orgasmos copulatorios femeninos que aquellas mujeres con parejas con gran cantidad de AF. De esta forma proponen que los orgasmos femeninos están adaptados para asegurar que algunas de sus parejas sexuales, más que otras, sean padres de sus hijos (Jones, 1996). Complementando el esquema, Brown y Moore, (2003), encontraron asociación entre la AF y los celos románticos, en donde los individuos más asimétricos son significativamente más celosos en contextos de pareja que en contextos no románticos.

Todos estos estudios se caracterizan por la imperativa explicación pan-adaptacionista en sus explicaciones. Un caso representativo de ello es la relación entre la AF en hombres y la tasa metabólica en reposo (Manning et al., 1997). Los autores defienden que la selección sexual de cuerpos grandes (competición intrasexual, hombre-hombre) y la baja AF (consecuencia de la elección de pareja) da como resultado un estrés de las provisiones de energía para el crecimiento y el mantenimiento de la simetría. Esto lleva a los autores a equiparar a la selección sexual con perturbaciones como la sobrepoblación, donde los hombres de “alta calidad” serían más capaces de resistir el estrés causado por la selección sexual, teniendo genotipos ahorradores de energía que serían capaces de distribuir más energía al crecimiento y a la reducción de la asimetría. Si bien se desarrollan grandes explicaciones para explicar el patrón de relación encontrado, no se presentan pruebas formales de la presencia del carácter selectivo de los caracteres en cuestión. Consideran como universal que los niveles de asimetrías son una adaptación producto de la selección natural (Mayr, 2006) y no como resultado del efecto combinado de los sistemas del desarrollo. Además, la visión de la psicología evolucionista tiene una fuerte visión ortogenética (teleológica) del desarrollo, ya que supone que en la naturaleza existe un esfuerzo intrínseco hacia la perfección (Gould y Lewontin, 1979) y evade la presencia de los fenómenos aleatorios en el proceso no lineal del desarrollo. Se debe recordar que la simple correlación no implica causalidad (Gould, 2003). Además, los valores de correlación obtenidos por éstos análisis no son suficientes para extraer conclusiones sobre la causa, ya que su mejor correlación no es mayor a 0.64, es decir, son moderadas (Rhodes et al., 1998, 1999; Rikowski y Grammer, 1999; Scheib et al., 1999; Jones et al., 2001; Penton-Voak et al., 2001; Little et al., 2007, 2008).

De igual manera, los estudios de selección realizados por la psicología evolucionista en humanos se basan en el análisis univariados en su generalidad, y pocos son multivariados. Ninguno de ellos aborda modelos no lineales o complejos. Por ejemplo, se han analizado caracteres como el bienestar (Henrich et al., 2012), el estatus (Li et al., 2002), la inteligencia (Miller, 2000), fuerza (Puts, 2010), el olor o aroma corporal (Wedekind et al., 1995), la masculinidad o feminidad facial (Perrett et al., 1999; Little et al., 2002), el tono de voz (Puts, 2005), estatura (Kurzban y Weeden, 2005), la forma del cuerpo (Singh, 1993), la amabilidad (Li et

al., 2002), la personalidad (Botwin et al., 2006), entre otros rasgos. De manera general existe una tendencia a estudiar la preferencia como un proceso univariado. La visión de estudiar un solo carácter, es decir, comprendiendo una variable para entender un fenómeno complejo, es un enfoque determinista. La selección sexual y elección de pareja es un proceso que no puede definirse con sólo estudiar el tono de voz o la estatura, y tampoco su interacción.

El rostro como caracter cuantitativo.

Gran cantidad o parte de la variación entre los individuos no da lugar a diferencias obvias en el fenotipo (Falconer y Mackay, 1997), en este contexto son varios los procesos que afectan las frecuencias génicas y genotípicas en el proceso de transmisión de los genes de una generación a otra. Así, podemos inferir cómo estos procesos se afectan por medio de varios métodos: censo de reproductores de la población, diferencias en fecundidad y viabilidad, migración y mutación y sistemas de apareamiento (Debat y David, 2001), todo ello a través de caracteres cuantitativos.

También, Debat y David, (2001) detallan que:

“uno de los avances más importantes logrados a través de la síntesis evolutiva es la consideración de la variación fenotípica como una cantidad de interés, mientras que, según el punto de vista tipológico clásico, se consideraba como ruido”

Teniendo a los fenotipos como cantidad mensurable y de interés es posible analizar los patrones de variación morfológica como evidencia del proceso evolutivo subyacente. De esta manera, se precisa que el polimorfismo es la fuente de variación de los caracteres cuantitativos teniendo varias posibles causas: ventaja del heterocigoto, selección dependiente de la frecuencia, ambiente heterogéneo, transición o mutación neutra (Falconer y Mackay, 1997), no dejando de insistir en que las interacciones entre estas son un modelo no lineal y multivariado. La variación visiblemente discontinua, causada por la segregación genética, se traduce en variación continua medible en los caracteres cuantitativos por medio de la segregación simultánea de muchos genes con efecto sobre el carácter y por la superposición de una variación realmente continua producida por causas no genéticas. Todo ello, sin olvidar que el ambiente tiene un papel determinante e integrador, porque la selección favorece rasgos funcionales asociados que evolucionaran como una unidad coordinada (Cheverud, 1995).

La simetría – asimetría: dialéctica de los sistemas del desarrollo

La invariancia geométrica conocida como simetría es un aspecto prominente de la morfología del desarrollo durante la embriogénesis (Levin, 2005), donde existen muchos patrones o planos corporales de simetría: esférica (volvox), radial (anemonas), quirales (ciliados), bilateral (planarias) y pseudo-bilaterales (humanos). Según Levin, (2005), la simetría es considerada un fenómeno primario debido a que es invariante entre los lados izquierdo y derecho, por este motivo, considera el autor, las asimetrías embrionarias se consideran como

secundarias. En la postura anterior, subyace una visión idealista de la morfología (Dressino y Lamas, 2003), ya que se construye una visión fijista en la que el fenotipo resulta de un *bauplan* sobresaliente e inalterable por factores externos; una suerte de determinismo duro sobre la expresión de los caracteres fenotípicos.

La parte antagonica, la asimetría, es catalogada como una desviación (Levin, 2005) y no como un proceso normal dentro del desarrollo de un individuo o estructura. En los vertebrados con un plan de simetría bilateral, la simetría es rota o alterada constantemente por el posicionamiento de varios órganos internos como el corazón, el hígado, páncreas o por el desarrollo asimétrico de órganos bilaterales como los pulmones o el cerebro (Levin, 2005). Hasta éste punto una redefinición es necesaria.

El modelo general que explica la aparición de la asimetría fluctuante (en la próxima sección se detalla sobre este rubro) es que esta es resultado de la acumulación de perturbaciones no genéticas de origen azaroso en el individuo denominadas ruido del desarrollo (*developmental noise*, RD), ante las cuales el individuo es incapaz de permanecer en la trayectoria determinada por el *bauplan*. De manera más específica, la estabilidad del desarrollo (*developmental stability*, ED) se refiere a la habilidad del organismo de amortiguar los efectos del ruido (Richtsmeier et al., 2005; Willmore et al., 2005; DeLeon y Richtsmeier, 2009). La acumulación de estas perturbaciones azarosas o ruido y la habilidad homeostática individual deficiente provocarán una respuesta fenotípica en el organismo, a lo que se le denomina inestabilidad del desarrollo (*developmental instability*, ID). Es decir que la inhabilidad de los individuos de llevar un desarrollo simétrico en ambos lados de algún rasgo, dado que el desarrollo de dicho rasgo debería ser idéntico por tener un mismo componente genético y estar expuesto a un mismo ambiente, da como resultado distintos niveles de asimetría fluctuante (Farrera, 2011).

En tensión con esta idea, se ha propuesto que aún en condiciones ideales en donde el componente genético del individuo fuese el más adaptado a su ambiente, y el ambiente fuese estable, perturbaciones azarosas y microscópicas de los procesos biológicos producirían una desviación del fenotipo óptimo simétrico (Møller y Swaddle, 1997). Desde esta óptica, las asimetrías no son parte de una variación secundaria, menos adaptadas, errores, desviaciones, etc., sino un fenómeno dialéctico. Bajo esta óptica, un patrón morfológico con algún tipo de simetría, contendrá obligadamente algún tipo de asimetría. En éste contexto, las asimetrías comienzan a ser consideradas como variación cuantificable y reconocible dentro del marco de la variación fenotípica. La caracterización de niveles de asimetría base en poblaciones naturales es una objetivo cada vez más importante (Debat y David, 2001; Farrera et al., 2014; Quinto-Sánchez et al., 2015) ya que siempre se ha considerado que los niveles basales deberían ser cero como fenotipo perfecto u óptimo, bajo un supuesto de correlación con el *fitness* (Debat y David, 2001). Empero, algunas evidencias recalcan que la relación de la AF y el *fitness* no parece ser tan precisa (ver Clarke, 1998). En el estudio realizado por Kellner y Alford, (2003) se evaluó la AF en aves domésticas y se encontraron niveles significativos de asimetría en todos los caracteres medidos, pero no hubo asociación entre cambios en los estresores (cantidad de alimento y grado de hacinamiento) y los grados de asimetría. DeLeon y Richtsmeier, (2009) intentaron

determinar si la craneosinostosis sagital prematura se encuentra asociada a la inestabilidad en el cráneo, analizando los niveles de AF. Utilizando el método de *Euclidean Distance Matrix Analysis*, encontraron que en contraste con lo esperado, los individuos con craneosinostosis no mostraron un incremento estadísticamente significativo de los niveles totales de asimetría, en comparación con el grupo control. Sin embargo sí pudieron distinguir de manera estadísticamente significativa, AF en la región del pterion y el proceso clinoides anterior ($\alpha = 0.05$). Los autores concluyen que no existe evidencia que relacione la inestabilidad en la etiología de la craneosinostosis sagital nosindrómica y que la evidencia de AF en el proceso clinoides anterior en el grupo con craneosinostosis, sugiere una asociación con la duramadre.

Las investigaciones llevadas a cabo en modelos experimentales (*Lucilia cuprina*) de genotipos conocidos, con variables controladas de las condiciones y perturbaciones del desarrollo han aportado evidencia sobre este debate. En efecto, los patrones y valores de asimetrías en la mosca *L. cuprina* proveen estimaciones sobre las perturbaciones ambientales (McKenzie y Yen, 1995; McKenzie, 1997). Sin embargo, el mismo autor reconoce que ante el desconocimiento de los datos genéticos y del componente ambiental del fenotipo, de información de la población y del desarrollo del organismo de estudio, cualquier generalización concerniente a la relación asimetría-estabilidad y *fitness* relativo debería ser interpretada con precaución. De acuerdo con esta afirmación, dado que la mayoría de las investigaciones únicamente relacionan fenotipo-ambiente (sin considerar el componente genético), sus resultados deben ser tomados con reserva (Clarke, 1998).

Bajo este esquema general, se retoma el concepto de norma de reacción del desarrollo (Schlichting y Pigliucci, 1998) como marco para facilitar las conexiones entre las diversas teorías sobre la evolución de fenotipos. Concretamente, la norma de reacción del desarrollo es el conjunto de ontogenias que pueden ser producidas por un genotipo simple cuando es expuesto a variación ambiental interna o externa (Schlichting y Pigliucci, 1998). Éste marco teórico permite la elucidación de los programas del desarrollo que intervienen en la transición epigenética del genotipo a fenotipo, o también llamada mapa genotipo-fenotipo (MG-F, Figura 1.3). Dicho concepto es un engranaje para la definición de nuevas respuestas en el marco del estudio de la asimetría individual facial.

Pigliucci, (2001) identifica varios modelos y/o hipótesis sobre la relación fenotipo-genotipo, por ejemplo: a) sistema mendeliano simple, b) modelo genético cuantitativo (incluida la pleiotropía), c) modelo que incluye la plasticidad fenotípica en donde un genotipo produce diferentes respuestas en dos ambientes diferentes y d) modelo más integrador, que muestra que la interacción genotipo-ambiente esta mediada indirectamente por los efectos epigenéticos durante el desarrollo. El modelo que seguimos en esta tesis es una integración de éstos, ya que puede ser el caso que los caracteres estudiados manifiesten una sola de las propiedades antes descritas, dos o efectos combinados (Figura 1.3).

La asimetría como indicador de perturbaciones en el desarrollo

Ya se ha descrito que la simetría interna es invariablemente alterada (Levin, 2005), aunque la simetría externa parece ser más conservativa. Su estudio detallado revela que no es

así, porque pequeñas alteraciones de forma siempre son una constante. A toda simetría corresponde un patrón asimétrico, sea interno o extremo. De ello ya se han presentado ejemplos en los órganos internos, únicos y bilaterales.

La versión más aceptada del modelo de origen de las asimetrías plantea la hipótesis de que la asimetría izquierda-derecha se inicia por el movimiento de los cilios en el nodo maduro (hacia el final de la gastrulación). Algunos recientes experimentos demostraron que el flujo artificial alrededor del nodo en embriones de roedores cultivados, es capaz de afectar a la simetría (McGrath et al., 2003). El movimiento hacia la izquierda de líquido en el nodo ventral, llamado flujo nodal, es el proceso central en la ruptura de la simetría en el eje izquierda-derecha (Hirokawa et al., 2006). La evidencia reciente sugiere que el movimiento hacia la izquierda de partículas de la membrana, llamadas paquetes vesiculares nodales, pueden resultar en la activación de la vía de señalización *Hedgehog* no canónica, una elevación asimétrica del Ca intracelular (2+) y cambios en la expresión génica (Hirokawa et al., 2006; Schlueter y Brand, 2007; Takao et al., 2013). De esta manera, se puede especular que la AF podría estar detonada por procesos de compensación del desarrollo y no únicamente por inducción de efectos ambientales; o en su defecto maximizada su expresión por éstos. Los errores en el patrón a lo largo del eje izquierda-derecha que ocurren en aproximadamente 1 de cada 10.000 nacimientos humanos, pueden causar morbilidad y mortalidad significativas (Hackett, 2002), hablando de los casos tempranos en el desarrollo que tienen mayor probabilidad de ser fatales (Figura 1.1).

La idea principal de los estudios de AF es que las partes correspondientes en los lados derecho e izquierdo de un organismo con simetría bilateral son réplicas separadas de la misma estructura, comparten el mismo genoma y, en un ambiente homogéneo, los mismo efectos externos en el desarrollo afectan por igual ambos lados del cuerpo (Klingenberg y McIntyre, 1998; Klingenberg et al., 2002; Klingenberg y Polak, 2003). Esta idea, al igual que considerar la simetría como carácter primario de la variación morfológica, se basa en un modelo determinístico, donde los lados deberían ser partes especulares. Los organismos en desarrollo real, sin embargo, no son sistemas cerrados. Incluso en un entorno homogéneo, pequeñas perturbaciones aleatorias de procesos celulares, como ya se mencionó, producen desviaciones del desarrollo real de un organismo, de lo que cabría esperar dado su genotipo y el ambiente (desarrollo óptimo).

Estas perturbaciones o alteraciones se denominan ruido del desarrollo (RD) y son una consecuencia de la naturaleza estocástica de procesos celulares (McAdams y Arkin, 1999), que resultan en características pseudoaleatorias y desviaciones estocásticas menores o AF. Debido a que la mayoría de estos procesos actúan a nivel local, una perturbación dada, por lo general sólo tendrá un efecto en una parte pequeña de un lado del cuerpo (a excepción de los procesos tempranos en el desarrollo embrionario), y los efectos de las perturbaciones se acumularán en los órganos en desarrollo en las partes izquierda y derecha por separado. Entonces, si no existieran mecanismos de compensación, el desarrollo de los lados izquierdo y derecho del cuerpo, se desviarían uno del otro. Por éste motivo se considera que la asimetría izquierda-derecha de las estructuras morfológicas es la expresión visible del RD que se ha acumulado a lo largo del desarrollo.

Así, el RD (Figura 1.3) ejerce sus efectos a medida que avanza el desarrollo ontogenético del individuo. Dado que el desarrollo es un sistema de procesos altamente interactivos (Coen, 1999; Gilbert, 2005), las perturbaciones que ocurren en un tiempo pueden tener efectos significativos sobre eventos de desarrollo posteriores, y por lo tanto los efectos del ruido en diferentes etapas de desarrollo puede no ser independientes. Además, diferentes partes pueden afectar mutuamente el desarrollo de otra, a través de interacciones inductivas. En consecuencia, las perturbaciones no solamente se acumulan con el tiempo o en el espacio, retomando la idea de no linealidad del desarrollo, sino que también interactúan en procesos tales como circuitos de retroalimentación, de regulación o la naturaleza multiplicativa del crecimiento del tejido mismo, por lo que se pueden amortiguar o amplificar sus efectos. Este planteo se generaliza en el llamado “modelo de palimpsesto” (Hallgrímsson et al., 2009). De este modo, la sensibilidad al RD es una propiedad importante de los sistemas del desarrollo. Dicha sensibilidad, la tendencia a producir un cambio morfológico en respuesta a una pequeña perturbación del desarrollo, se ha interpretado como ID del organismo (Klingenberg y Nijhout, 1999). Aunque la relación entre RD, como ya se ha explicado, no necesariamente tiene que tener un origen de inestabilidad.

Su contraparte dialéctica, la capacidad del sistema para absorber las perturbaciones del desarrollo, sin provocar una respuesta morfológica, se denominada estabilidad de desarrollo (ED); es una propiedad de los sistemas de desarrollo que caracteriza a su capacidad de amortiguación o robustez, y está estrechamente relacionado con el concepto de canalización (Waddington, 1942; Wilkins, 1997; Eshel y Matessi, 1998; Gibson y Wagner, 2000). La ED e ID que tradicionalmente se han distinguido como conceptos diferentes en la literatura sobre la AF, más bien pueden ser consideradas como las dos caras de la misma moneda, dialécticos, ya que representan aspectos complementarios en tensión de un sistema del desarrollo respondiendo a un ambiente determinado, bajo una norma de reacción.

Luego entonces, la AF que expresa una estructura morfológica, en este punto de vista, es el resultado de RD que produce efectos en el contexto de ID de un sistema en particular. El RD promueve las diferencias entre los lados del cuerpo, y la ID las expresa como asimetría morfológica en el organismo. Los factores extrínsecos, como el estrés, por lo tanto puede influir en AF tanto a través de los cambios en la cantidad de ruido y mediante cambios de ID.

Debido a la naturaleza aleatoria de esta variación, una correlación entre las asimetrías de rasgos puede ser usada para inferir las interacciones entre los procesos de desarrollo que las producen. Si el desarrollo de dos rasgos es independiente, entonces una desviación aleatoria en uno de ellos no será consistentemente asociada con una desviación en el otro rasgo. Para un individuo en particular, si el primer rasgo tiene una dirección dada de la asimetría, por ejemplo, ser más grande en el lado izquierdo que en el lado derecho, la asimetría del otro rasgo puede ser igual o tener la dirección opuesta. En una muestra de individuos, por lo tanto, las asimetrías de dos rasgos en desarrollo independientemente no estarán correlacionadas. En contraste, si hay una conexión de desarrollo entre los rasgos, entonces los efectos de las perturbaciones pueden transmitirse directamente entre los rasgos, produciendo una relación estadística entre las direcciones de las asimetrías de los rasgos (Van Dongen et al., 1999). La conexión entre los rasgos del desarrollo se manifiesta en datos morfológicos como covarianza entre sus asimetrías.

En otras palabras, las covarianzas entre asimetrías de rasgos resultan de sus conexiones de desarrollo (Klingenberg, 2005), pero no de la variación de vías en paralelo independientes.

Para finalizar, se debe tener en cuenta que algunos puntos importantes deben ser considerados antes de establecer hipótesis con el objetivo de relacionar la AF y la ED. Por ejemplo: 1) un cierto grado de asimetría facial no es poco común en individuos sanos normales, más bien, puede ser visto como una regla (Ercan et al., 2008; Farrera et al., 2014) y 2) la utilidad de la AF como un indicador de la ED individual es pobre a menos que la varianza de la ED sea extremadamente grande (Houle, 2000).

La asimetría en poblaciones humanas y su relación con diversas covariables.

No existe un patrón definido sobre la relación de la asimetría facial y el sexo, más bien se trata de evidencia contrapuesta, que muy probablemente este relacionada con una población dependencia y/o ancestría. Por ejemplo, existen publicaciones que encuentran que los hombres tienen mayor cantidad de asimetría que las mujeres (Farkas y Cheung, 1981; Ferrario et al., 1995; Trivers et al., 1999; Koehler et al., 2004; Özener y Ertuğrul, 2010; Claes et al., 2012) Ferrario et al., (1995), Koehler et al., (2004) Özener, (2010a) Claes et al., (2012) (Farkas y Cheung, 1981, otros con valores mayores para mujeres (Ercan et al., 2008; Bigoni et al., 2013, Quinto-Sánchez et al., 2015) y algunos y otras nula o una leve asociación con el sexo (Ferrario et al., 2001; Little et al., 2008).

La asociación con el BMI se basa en la idea de “mayor asimetría, mayor valor de BMI” ya que el BMI es considerado un indicador de salud (Milne et al., 2003). A este respecto, solo existe un reporte que identifica mayor cantidad de asimetría en hombres con mayor BMI (Milne et al., 2003) y un reporte que evaluó la relación de la AF y la tasa de desarrollo fetal, la tasa de desarrollo infantil temprano (relación del peso y la talla al nacer) y la tasa total de desarrollo post-natal (relación del peso y la talla a los 6 meses); sus resultados no mostraron asociación entre la AF y el crecimiento fetal, no obstante encontraron que los niños obesos a los 6 meses mostraron mayor cantidad de AF que los no obesos (Wells et al., 2006).

Sobre la edad, se ha especulado que durante el proceso de crecimiento infantil no existen relación alguna entre el la edad y la asimetría, pensando en una correlación positiva. A este respecto, Wells et al., (2006) no encontraron asociación entre AF y crecimiento fetal. Pero si se ha especulado sobre una posible correlación positiva en poblaciones mexicanas (Farrera et al., 2014) Sin embargo, se sabe que el prolapso normal de los tejidos faciales, sucede en después de los 40 años (Coleman y Grover, 2006) e implica principalmente la pérdida de grasa en los tejidos faciales (Donofrio, 2000), además de la pérdida de la turgencia de la piel y el remodelamiento óseo (para más detalles ver Coleman y Grover, 2006).

Planteo del problema

La descripción de los patrones de variación asimétrica han sido abordados desde un sinfín de perspectivas, muchas de ellas sobre supuestos encontrados en medios naturales o producidas por experimentos o simulaciones (Leamy, 1984; Swaddle et al., 1994; Møller y Swaddle, 1997; Vøllestad y Hindar, 1997; Klingenberg et al., 1998, 2002; Lens et al., 2002; Palmer y Strobeck, 2003; Willmore et al., 2005; Lens y Van Dongen, 2008; Gonzalez et al., 2011). Concretamente, en humanos existen descripciones de las tendencias asimétricas de la cara y del cuerpo (DeLeon, 2007; Ercan et al., 2008; Özener, 2010a; b, 2011; Bigoni et al., 2013; Farrera et al., 2014). Todo un programa de investigación plantea que la variación encontrada responde a un patrón de respuesta al estrés durante el desarrollo; sin embargo una serie de publicaciones alternativas demuestran, y ciertamente contradicen, que la propuesta de la relación lineal entre la inestabilidad en el desarrollo y la asimetría fluctuante está lejos de ser establecida (Decker, 1974; Emlen et al., 1993; Graham et al., 1993; Palmer, 1999, 2000; Lens et al., 2002; Van Dongen et al., 2009). Bajo este esquema general, sobre el significado de la asimetría en rostros humanos, se asumen una serie de premisas base que representan la delimitación del problema de estudio.

- 1) Existe la hipótesis de que, en un ambiente sin perturbaciones la asimetría fluctuante estaría ausente ($AF=0$), ya que en un desarrollo uniforme o sin “ruido”, ninguno de los procesos de compensación del desarrollo, con miras a amortiguar la ruta (*pathway*) del fenotipo, se activaría. La evidencia indica que, en poblaciones naturales, el fenómeno nunca sucede así. Por el contrario, aun en poblaciones sin un estrés aparentemente cuantificable o reportado, se observan niveles de asimetría que pueden llegar a ser equiparables con aquellos valores observados en poblaciones “perturbadas” (Debat y David, 2001). Por este motivo, se asume que la asimetría no es la excepción, sino la regla (Ercan et al., 2008; Farrera et al., 2014). Desde esta óptica, todos los organismos deberán manifestar algún grado de AI que es producto de la sumatoria de la AF, asimetría direccional (AD) y el efecto del error. Así, el primer axioma del planteamiento de la tesis es: una población tenderá a manifestar algún grado de AI ($AI \neq 0$).

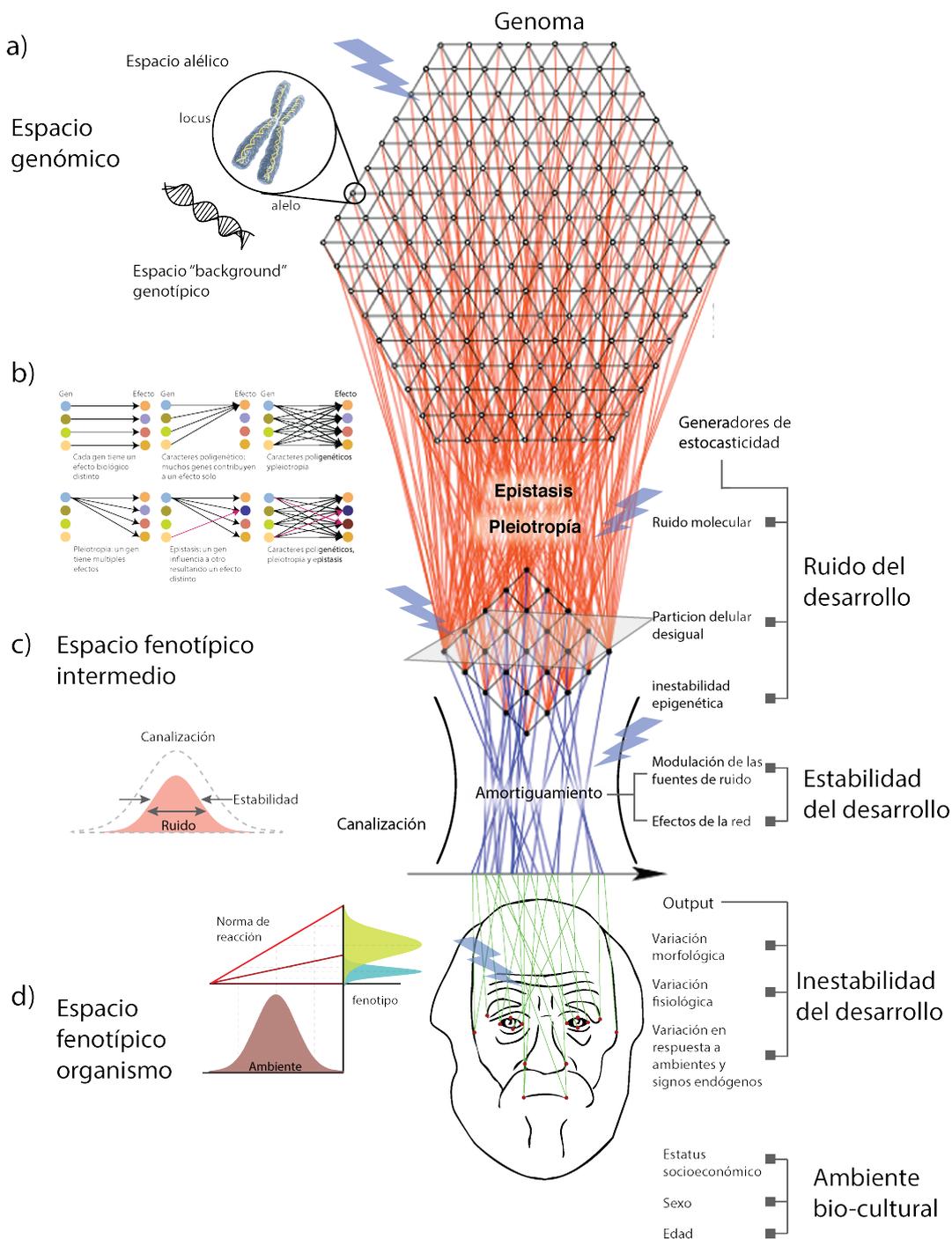


Figura 1.3. Modelo integral del mapa genotipo fenotipo. La imagen sigue una direccionalidad temporal del desarrollo de superior-inferior. Se integran todos los espacios y mecanismos que podrían tener una influencia en el proceso del desarrollo. a) Espacio genómico, que incluye espacios alélicos y de *background* genotípico, puede ser alterado por mutaciones. La configuración genética más los procesos de dominancia recesividad serán determinantes en la configuración del individuo. B) Efectos generadores de estocasticidad, pleiotropicos y epistáticos. En éste punto el genotipo se contrasta por procesos como el ruido celular, epistasia y pleiotropía (imagen izquierda) c) espacio fenotípico intermedio, la partición celular desigual y la epigénesis continúan como principales fuerzas de ruido en el desarrollo en contraste con la estabilidad detonada por la canalización, amortiguamiento, modulación y efectos de la red del desarrollo y d) espacio fenotípico del organismo, donde se tiene la interacción con el ambiente y los posibles resultados fenotípicos por medio de la norma de reacción (imagen izquierda). Mediante el análisis de fenotipos es posible medir la inestabilidad en el desarrollo. Este fenotipo tendrá otro nivel más de expresión en el ambiente sociocultural.

- 2) La disrupción a la norma $AI=0$ sucede indistintamente, incluso en un escenario de no perturbación; ya que por simple estocasticidad del crecimiento celular, el patrón de crecimiento entre los lados derecho e izquierdo no podría ser igual, salvo en un modelo computacional invariante (Graham et al., 1993). Por éste motivo se plantea que los patrones de variación asimétrica observados en poblaciones humanas pueden ser explicados como la sumatoria de eventos de crecimiento celular, la diferencia en variación de éstos, la interacción con el ambiente (llamada tradicionalmente respuesta o reacción), el potencial efecto epigenético y las constricciones del desarrollo; todo dentro del marco de un sistema poligenético base. Así, el segundo axioma del planto de la tesis es: el patrón de AI es la sumatoria no lineal de eventos durante el desarrollo y crecimiento morfológico, dependientes o no de eventos ambientales.

- 3) La simetría es considerada como una característica omnipresente en la naturaleza y, epistemológicamente ha estado ligada a la concepción de perfección, visión idealista de la morfología. Un objeto de n -dimesiones presenta simetría de espejo o la bilateralidad si éste es invariante cuando se refleja sobre un hiperplano de dimensiones $(n-1)$ pasando por el centro de masa del objeto (Graham et al 2010). La simetría es reconocida como el carácter primario, y la asimetría como secundario. La literatura reconstruye la asimetría como “*accidentes*” (Graham et al., 1993; Clarke, 1994), “*perturbaciones*” (Møller y Swaddle, 1997), “*errores estocásticos*” (Bradshaw, 1965), “*desviaciones azarasas de la simetría perfecta*” (Palmer y Strobeck, 1992), la “*ruptura de simetría*” (Richtsmeier et al., 2005), entre muchos más. La concepción de la “violación” a una norma es una visión fijista del proceso evolutivo bajo una visión totalitaria-adaptacionista de la evolución fenotípica. Sin embargo, la frecuencia de invariancia en los individuos es rara, más bien teórica. Por el contrario, la dicotomía simetría-asimetría es en realidad una relación dialéctica (lucha de contrarios) donde el común es la interrelación o coexistencia de ambas, en un hiperespacio con n -factores operando para su configuración final (síntesis). De lo anterior se deriva el tercer axioma: la concepción de la simetría como perfecto u omnipresente no tiene evidencia en el mundo natural, dado a que $AI \neq 0$, la teorización de la simetría como el *bauplan* es errónea.

- 4) Se considera que la simetría es un carácter mayor y adaptativo de las formas biológicas, pues se considera que requiere menos cantidad de energía libre que las formas asimétricas. Bajo esta hipótesis, se cree que la simetría es adaptativa, dada su influencia en procesos de eficiencia de locomoción, vuelo, circulación, etc. Sin embargo, existen evidencias en contra y a favor de esta idea (Siikamäki et al.; Jones, 1987; McKenzie y Clarke, 1988; Britten, 1996; Leung y Forbes, 1997; Clarke, 1998; Lens et al., 2002; Hendrickx et al., 2003). Como es constante en la biología, el pan-adaptacionismo vicia las conclusiones de los procesos en estudio, además de que para el humano solo las evidencias de la psicología evolutiva dan idea de la posible validez adaptativa de la simetría (Møller y Pomiankowski, 1993; Barber, 1995; Simmons, 2004; Møller, 2010). El

cuarto axioma entonces es que no existe suficiente evidencia de que la simetría (perfecta u óptima) otorgue un mayor *fitness*, respecto de aquellos individuos con asimetrías.

- 5) En su revisión, Leamy y Klingenberg, (2005) citan: “*debido a que la relación precisa entre la AF y la inestabilidad del desarrollo sigue siendo especulativa, el estado actual de conocimiento de la magnitud de la variación genética aditiva para la ID es aún menor que la de la AF*”. Dos posibles escenarios pueden ser la causa de la falta de resultados, uno es que los datos disponibles explorando las asimetrías faciales sean escasos y otra es que la señal fenotípica buscada esté mal interpretada conceptualmente. Una revisión ha sugerido que existe un sesgo en las publicaciones de AF (Palmer, 1999), sobre todo en los estudios que analizan la relación entre calidad de salud y asimetría; resultando en que la media de las asociaciones entre caracteres es $r^2=0.2$. Ello sugiere que las publicaciones sobreestiman la fuerza de la relación o asociación entre la AF y varios rasgos (Palmer, 1999), incluyendo la relación de la AF y la inteligencia (Banks et al., 2010). Aunque el programa científico defiende que probablemente el sesgo no es importante (ver Møller et al., 2005). Los valores bajos de asociación entre variables con implicación directa en la ID, parecen evidenciar la falta de soporte entre la ID y la AF. El quinto axioma es que existe poca o nula evidencia que sustente la tradicional y lineal relación de la AF y la ID.

- 6) Algunos datos de heredabilidad para AF han sido publicados para caracteres mandibulares de ratones, determinando valores bajos o no significativos (Leamy, 1999). Sin embargo otros autores reportan heredabilidades significativas en varias especies de moscas (Scheiner et al., 1991; Santos, 2002). No se han reportado hasta la fecha valores de heredabilidad de asimetrías en caras humanas. Únicamente, algunos QTL's han sido reportados como intervinientes en la regulación del tamaño de la mandíbula de ratones, acumulando para un 1% del total de la variación causada por asimetría direccional (AD), lo que representa menos del 3-6% de los porcentajes obtenidos previamente sobre caracteres de mandíbulas. No existe un acuerdo sobre las tasas de heredabilidad de la AF, siendo nulos los reportes en humanos. La conclusión general de heredabilidades bajas de AF sugiere que un efecto epistático no aditivo podría ser el principal contribuyente a la varianza genética en ID (Leamy y Klingenberg, 2005). Así, la sexta premisa es que no existe un consenso sobre la heredabilidad de la AF, por lo que es considerada preliminarmente como sujeta a efectos epistáticos no aditivos.

- 7) Existe mucha controversia sobre la relación de la AF y la heterocigosidad (H_e). Algunos autores encuentran correlaciones negativas entre la AF y la H_e (Soulé, 1979; Vrijenhoek y Lerman, 1982; Biémont, 1983; Leary et al., 1984; Livshits y Kobylansky, 1985; Mitton, 1993), aunque esta visión es desafiada por la evidencia de otros estudios que reportan ausencia o mínima correlación (Beacham, 1991; Clarke y Oldroyd, 1996; Vøllestad y Hindar, 1997). En un meta-análisis realizado por Vøllestad y Hindar, (1997), en 118

muestras de animales ecto y endotérmicos, concluyeron que la relación entre la He y la AF es vagamente soportada por los datos disponibles, y que la He explica una parte muy pequeña de la variación de la ID entre individuos y poblaciones. Finalmente, en humanos Livshits y Smouse, (1993) no encontraron relación entre la AF y la He. La séptima premisa es que no existe consenso entre la heterocigosidad y la AF en humanos.

En general, existe una gran incertidumbre en torno a varios aspectos relacionados con la AF. Los argumentos antes descritos representan la problematización básica del estudio de la AF. En humanos, podemos decir que es tradicional y aceptada la visión de la AF como proxy de la ID. En cambio, es evidente la ausencia de consenso, solo real la incertidumbre. La mayoría de evidencia sobre esta relación se observa en animales no humanos y su extrapolación representa un problema serio en la interpretación de resultados en el ámbito bioantropológico.

Bajo estas premisas anteriores es que la presente disertación construye un modelo minucioso de contraste de la AF en un escenario biológico único como lo es el mestizaje latinoamericano, contemplando una serie de covariables que integran una oportunidad única en la exploración de varios niveles de respuesta a los supuestos presentados con anterioridad. La muestra CANDELA (Consortio para el Análisis de la Diversidad de Latinoamérica) permite contrastar gran cantidad de información en un modelo integral que incluye genética, variables socioeconómicas y biológicas, modularidad e integración morfológica, todo ello en un abordaje geográfico o geoespacial (Figura 1.4).

Un punto clave es que en general la genética de las asimetrías faciales es desconocida. Incluso los patrones generales están, aún, en un debate abierto. Por este motivo es que el modelo propuesto en esta tesis intentará dar algunas nuevas evidencias trabajando en la dualidad de la caracterización y asociación genética de las asimetrías craneofaciales.

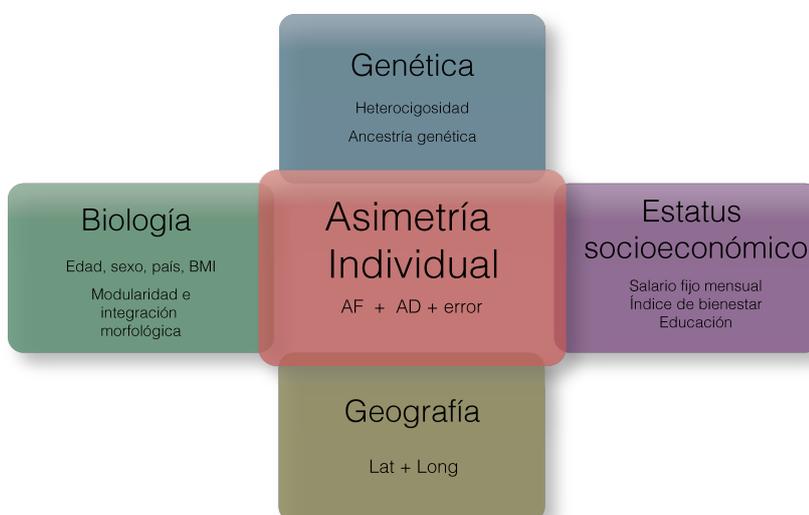


Figura 1.4 Modelo general de análisis de la asimetría individual (AI) planteado en esta tesis. Inclusión de los niveles de análisis: genética, biología, estatus socioeconómico y geografía con sus respectivas variables respuesta.

Los estudios realizados hasta ahora sobre AF en humanos, tienen bajos números muestrales, como por ejemplo 63 (Gray y Marlowe, 2009), 80 (Ferrario et al., 1995), 92 (McIntyre y Mossey, 2002), 120 (Little et al., 2007), 172 (Wells et al., 2015), 194 (Koehler et al., 2004), 304 (Özener, 2010a), 321 (Ercan et al., 2008) y un trabajo anterior llevado adelante por nuestro equipo de investigación, 555 (Farrera et al., 2014) como límite superior.

En cuanto al origen de los individuos muestreados, se reporta que son “blancos caucásicos sanos” (Ferrario et al., 1995), “adultos jóvenes turcos” (Özener, 2010a), “escoceses” (McIntyre y Mossey, 2002), “brasileños” (Wells et al., 2015), “africanos de Tanzania” (hadzas) (Little et al., 2007) y algunos sin reporte (Koehler et al., 2004).

Algunos análisis, también, exploran la relación con posibles variables respuesta relacionadas con el estrés como por ejemplo, la ingesta de alcohol durante el embarazo (Klingenberg et al., 2010), el estatus socioeconómico bajo o pobreza (Özener, 2010a), la craneosinostosis (DeLeon y Richtsmeier, 2010), la estrategia económica de subsistencia (Bigoni et al., 2013), el estrés nutricional (DeLeon, 2007), etc.

Si bien son pocos los ejemplos que caracterizan la AF en humanos, estos no cubren los diversos niveles de análisis que están disponibles en esta disertación. La planeación de muestreo y el diseño de análisis previos permiten la integración de un análisis multifactorial sobre la implicación de la AF en poblaciones humanas. Lo anterior deberá impactar en los axiomas iniciales planteados, ya que muchas de las variables disponibles aquí darán evidencia sobre varios de los ámbitos de la problematización de la AF.

Justificación

La base de datos CANDELA representa una oportunidad única para el contraste de hipótesis sobre el posible origen de la asimetría facial humana. Las características del muestreo realizado permiten incluir una gran cantidad de datos, que como ya se ha caracterizado es uno de los problemas clave. Además, el modelo propuesto (Figura 1.4) vislumbra un enfoque nunca antes descrito en el campo del estudio de la asimetría facial y de la variación normal en humanos. Los diferentes estudios previos sobre AI en poblaciones humanas se limitaban a pocos grupos de variables, y cuando cubrieron su aspecto genético, rara vez (o nunca) abordaron el enfoque socioambiental y viceversa. En este sentido, la ventaja del proyecto CANDELA es tener a la mano información de todos los niveles de variación: genómica, fenotípica, ambiental y geográfica. La determinación de las fuentes de variación genética y/o ambiental de la cara representan un campo de importancia primaria para áreas como la cirugía, ortodoncia, ciencia forense, biología experimental, etc. Muchos trabajos centrados en dismorfologías craneofaciales se basan en algunos indicadores de ID, como es el caso de la AD. Además, uno de los problemas más consistentes dentro del campo de investigación de las asimetrías individuales (AI) es la pobre inferencia desde una perspectiva genético-poblacional. Como ya se ha mencionado, los números muestrales siempre dejan claro que la especulación sobre el significado poblacional de la evidencia en artículos dista mucho de poder ser conclusiva.

Objetivo de la tesis

General

A. Dilucidar los patrones de variación asimétrica individual facial en humanos mestizos latinoamericanos, integrando un modelo analítico hiperdimensional contrastando fuentes de variación genéticas, biológicas, geográficas y socioculturales.

Particulares

- A. Caracterizar la reproducibilidad y repetibilidad de la técnica fotogramétrica y el error intra e interobservadores de la muestra utilizada (Cap IV).
- B. Caracterizar el patrón de distribución de la asimetría fluctuante facial (AF) en poblaciones mestizas de Latinoamérica (Cap V).
- C. Contrastar los valores individuales de AF con modelos de respuesta asociados a la ancestría genética y con variables como sexo, edad, BMI, probablemente relacionadas con la inestabilidad en el desarrollo (ID) y correlacionar los valores de AF respecto de la estimación genómica de mestizaje y heterocigosidad (Cap VI).

Hipótesis: Aquellos individuos con genomas heterocigotas deberán mostrar valores menores de AF menores respecto de aquellos con una configuración homocigota.

- D. Contrastar los posibles efectos del estatus socioeconómico en la AF, como replicación de estudios del programa de investigación de la biología de la pobreza (Cap VII).

Hipótesis: Si la AF es un indicador lineal de la ID, luego entonces, aquellos individuos con un menor estatus socioeconómico deberán tender a valores mayores de AF.

- E. Conocer qué hipótesis de modularidad facial definidas *a priori* se ajusta mejor para los criterios de la prueba de modularidad de Klingenberg. Además, comparar las matrices de covarianza de la variación individual y la AF, para conocer si las vías del desarrollo entre estas fuentes de variación son proporcionales. Y finalmente, caracterizar la integración morfológica (IM) por módulo y ancestría genética y establecer la relación entre la AF y la IM en cada uno de los contextos genéticos (Cap. VIII).

Hipótesis: Aquella hipótesis de modularidad óptima (medida como la mínima covariación entre módulos) será la considerada como verdadera. Además, los patrones de covariación entre los individuos y la AF deben ser proporcionales entre submuestras y módulos.

- F. Caracterizar si AF tiene una distribución geográfica entre los países incluidos en la muestra CANDELA (Cap IX).

Hipótesis: Se espera que la distribución geoespacial de la AF sea por conglomerado. Además aquellos individuos sometidos a un ambiente perturbado deberán mostrar valores de AF altos respecto de aquellos menos perturbados.

Antecedentes

Contexto histórico del estudio de la asimetría

Si bien son varios los trabajos sobre el análisis de la asimetría bilateral, algunos son de interés en la caracterización del debate en torno a la epistemología y filosofía de los conceptos de simetría-asimetría. En éste sentido, realizar una breve revisión de algunos de éstos trabajos es de importancia para entender cómo los conceptos han tenido una evolución en el tiempo. De manera muy sucinta se caracterizan algunos periodos en el contexto del estudio de las asimetrías.

Humphry, (1870) publica "*A case of asymmetry of the two halves of the body*" donde hace un reporte de caso de un paciente con asimetrías corporales utilizando una serie de mediciones antropométricas y citando que el lado derecho del cuerpo era más grande, y que el patrón se extendía a la cara. Por otro lado, Cox, (1875) publica "*On the want of symmetry in the length of opposite sides of persons who have never been the subject of disease or injury to their lower extremities*" donde reporta un caso de asimetrías para extremidades inferiores en humanos. Bateson, (1894) en "*Materials for the study of variation*" discute las implicaciones de la simetría en varias especies de animales, considerando que las partes derechas e izquierdas deberían ser iguales por regla, y reconociendo la asimetría como imperfección:

"the frequency of substantial if imperfect bilateral symmetry in the variations, but the occasional occurrence of asymmetry also"

En el mismo trabajo, esboza el marco de normalidad para los rasgos bilaterales internos, citando que:

"In proportion as an animal is bilaterally symmetrical the right side is an image of the left. Nevertheless in many substantially symmetrical form there is asymmetry in the condition of some one or more organs presents on both sides. (This asymmetry, in the cases to be considered, is of course distinct from that due to asymmetrical disposition of unpaired viscera, such as the heart and liver of vertebrates, etc). In several of these cases there is evidence that both sides may on occasion assume the form normally proper to the one only"

M, Yerkes, (1901) reporta que la variación de las quetas de cangrejos no sigue una simetría perfecta y discute la posible explicación de la lateralidad de las medidas y aunque él estaba trabajando sobre un patrón reconocible de asimetrías, la antiasimetría, no hay un desarrollo formal de los conceptos. Es interesante entonces rescatar que define que las diferencias derecha e izquierda "*no están determinadas por heredabilidad o al menos, no directamente*". Liebreich, (1908) en su "*Die asymmetrie des gesichtes und ihre entstehung*"¹ describe los posibles orígenes de la asimetría comparando diversas "razas humanas". Más tarde, Bush, (1930), publica su trabajo "*Asymmetry and relative growth of parts in the two sexes of the hermit-crab, Eupagurus priedeauxi*" donde determinó el patrón de asimetría en el

¹ La asimetría de la cara y su origen

crecimiento de un cangrejo. En el trabajo se afirma que las asimetrías tienen direccionalidad derecha. De igual manera, Hoadley y Pearson, (1929), estudiando medidas internas del cráneo determinan la tendencia de mayor asimetría en el lado derecho del cerebro.

Woo, (1931) publica "*On the asymmetry of the human skull*" un análisis que puede considerarse el inicio del análisis de las asimetrías craneofaciales modernas. Woo analizando cráneos egipcios mediante una serie de distancias clásicas, concluye que el cráneo humano presenta naturalmente asimetría. De igual manera Greene, (1931), publica "*Asymmetry of the head and face in infants and in children*" donde reconoce que las asimetrías de menor grado son normales y las pronunciadas poco comunes.

Un año después, el zoólogo alemán Ludwig, (1932), expande la brecha del estudio de las asimetrías con su trabajo "*Das rechts-links problem im tierreich und beim menschen*"² considerado el resumen más completo de las asimetrías en los animales y plantas que se haya sido publicado. Además, en 1936 publica "*Bestimmung und vererbung der asymmetrieform (rechts-links-problem)*"³ donde se realiza un intento por describir y profundizar su publicación inicial. Paralelamente publica "*Die körperlichen asymmetrien des menschen und der primaten*"⁴ (Ludwig, 1932) donde caracteriza y resume las tendencias asimétricas del cuerpo, y las considera como variación secundaria. De igual manera, Huxley, (1932) dentro de su libro "*Problems of relative growth*" publica un apartado donde trata el tema del crecimiento (alometría) de los lados.

Estos trabajos demarcan el inicio del estudio de las asimetrías como un estado de ruptura de la simetría, patrón generalmente considerado como anormal. También, aunque solo en un caso aislado pero no por ello menos interesante, se reporta que la asimetría es un patrón normal (Greene, 1931).

La fase del estudio de las asimetrías descrita hasta estas fechas, se puede considerar como formativo-descriptivo (Figura 2.1), y está caracterizada por la descripción de patrones asimétricos, el uso de mediciones tradicionales y la discusión del posible origen de estas. Si bien hay muchos textos donde se habla del carácter asimétrico de la variación morfológica éstos representan una visión tipologista o freneticista, retomando las ideas Lombrosistas estimando que el 42% de los delincuentes eran asimétricos (ver Hoadley y Pearson, 1929). Muchos trabajos más se publicaron respecto de los patrones de asimetría craneofacial (e.g. Wood-Jones, 1931a; b, 1933; Halperin, 1931; Metzenbaum, 1932; Le Gros Clark, 1934; Masten, 1936; Thomas, 1936; Hardman, 1939; Thompson, 1943; Penfield, 1943; Ballard, 1944; Brown y Peterson, 1946; McCurdy, 1949) sobre todo en el ámbito de la descripción del patrón asimétrico por grupo racial, algunos relacionados a enfermedades, otros al crecimiento del cerebro y unos más sobre maloclusiones dentarias.

Luego de 1950 se da comienzo a una nueva fase de estudios sobre las asimetrías que enfatizan la búsqueda de la comprensión de los procesos que demarcan el fenómeno, continúan

² La cuestión derecha -izquierda en el reino animal y en el ser humano

³ La determinación y la herencia de la forma asimetría (tema derecha-izquierda)

⁴ Las asimetrías físicas de los seres humanos y primates

describiendo los patrones observados en diferentes estructuras y organismos, pero con la diferencia de que hay una definición más robusta de los significados de la misma. Esta fase se define como maduración-consolidación (Figura 2.1). Por ejemplo, Van Valen, (1962) publica unos de los artículos más referentes de la definición estadística de los tipos de asimetría observados en la naturaleza, en *"A study of fluctuating asymmetry"*, pero más allá de esto su estudio concluye algo poco citado en la literatura:

"La falta de variación detectable en el componente general de la resistencia al ruido de desarrollo demostrado o sugerido en las tres especies investigadas, es sorprendente, ya que contradice la predicción hecha anteriormente sobre la base de la evidencia se discute a continuación. Parece indicar o bien que no hay variación fenotípica detectable en capacidad de amortiguación de ruido dentro de la población muestreada, o que la capacidad amortiguadora en sí está fragmentado en numerosos segmentos de desarrollo no relacionados"

Parece que en éste punto comienza a madurar el concepto idealista de que las partes derechas e izquierdas deberían ser iguales, concibiendo que el plan corporal mantendrá nulas diferencias entre los lados y adjudicando la respuesta de cualquier alteración de este patrón a estresores diversos o mutaciones. Las asimetrías entonces, siguen siendo reconocidas como un efecto derivado del plan ideal corporal simétrico:

"Filogenéticamente, las asimetrías son de carácter secundario; es decir, se han desarrollado a partir de un original de simetría bilateral" (Lundström, 1961)

Además, se describe que las asimetrías no genéticas pueden ser determinadas por la influencia ejercida por el ambiente externo o que pueden ser debidas a diferencias en el desarrollo aleatorio en el ambiente interno de las dos mitades del cuerpo (Lundström, 1961). Por ejemplo:

"Como otros autores han propuesto la interpretación de asimetría "fluctuante", como consecuencia de accidentes al azar durante el desarrollo. El nivel de asimetría se considera como una indicación de la eficacia de los sistemas de control de desarrollo en amortiguamiento contra estos accidentes" (Soule, 1967).

Muchos son los textos que reproducen este eje teórico y que definen la segunda fase, donde se admite que la asimetría es producto del estrés (Mulick, 1965; Latimer y Lowrance, 1965; Lu, 1966; Letzer y Kronman, 1967; Ness, 1967; Bailit et al., 1970; Chhibber y Singh, 1970; Burke, 1971; Groves y Humphrey, 1973; Decker, 1974; Chaurasia y Goswami, 1975; Siegel y Doyle, 1975a; b; c; Vig y Hewitt, 1975; Woolf y Gianas, 1976, 1977; Perzigian, 1977; Witelson, 1977; Doyle y Johnston, 1977; Norberg, 1978; Shah y Joshi, 1978; Trinkaus, 1978; DiBennardo y Bailit, 1978; Sciulli et al., 1979; Soulé, 1979; Plato et al., 1980; Randles et al., 1980; Harris y Nweeia, 1980).

Posterior a éste punto, comienza una fase en la que se desarrolla un periodo explosivo de la publicación de artículos sobre asimetrías, que podría denominarse fase de diversificación

(Figura 2.1). Las características de esta fase son la determinación de las normas estadísticas básicas para la determinación de los patrones asimétricos y la diferenciación de los niveles de asimetría y evidencias de su base genética. Uno de los trabajos más clásicos de esta fase es el realizado por Palmer y Strobeck, (1986) quienes definen muchas de las pautas protocolarias en los estudios de asimetrías; concretamente sientan las bases de cómo medir, describir y analizar la asimetría. Adicionalmente, se publican el método empleado esta tesis por Klingenberg y McIntyre, (1998) publican el método empleado en esta tesis aplicando morfometría geométrica y también se reportan algunos otros métodos con basados en *Euclidean Distance Matrix Analysis* (DeLeon y Richtsmeier, 2010). Durante éste proceso, algunos análisis retoman fuertemente el uso de la asimetría fluctuante como indicador de estrés o inestabilidad/ruido en el desarrollo, con una diversificación de las áreas de aplicación de la herramienta de análisis, por ejemplo ligado a la selección sexual (Møller, 1990; Møller y Pomiankowski, 1993; Watson y Thornhill, 1994), el atractivo (Grammer y Thornhill, 1994; Swaddle y Cuthill, 1995; Thornhill y Møller, 1997; Perrett et al., 1999; Rikowski y Grammer, 1999; Scheib et al., 1999), la heterocigosidad (Vrijenhoek y Lerman, 1982; Leary et al., 1984; Livshits y Kobylansky, 1985; Patterson y Paton, 1990; Beacham, 1991; Livshits y Smouse, 1993; Clarke, 1994; Hartl et al., 1995; Mitton, 1995; Clarke y Oldroyd, 1996; Vøllestad, 1999; Kark et al., 2001), la búsqueda de QTLs asociados (Leamy et al., 1998), la resistencia a parásitos (Thornhill y Gangestad, 1993), el *fitness* (Clarke, 1995, 1998; Britten, 1996; Leung y Forbes, 1997; Møller, 2010) y muchos temas más.

Asimismo, comienza a ponerse atención sobre muchos sesgos en las publicaciones en el campo de la asimetría (Palmer, 1999; Lens et al., 2002; Møller et al., 2005) e incluso se comienza a explorar la validez de otros indicadores de asimetría como marcadores de ID (Emlen et al., 1993; Graham et al., 1993). Durante esta fase también se complejiza el estudio de la asimetría, si bien la morfometría geométrica ya habían desarrollado el método, éste presenta una adecuación para estructuras con simetría de objeto (Klingenberg et al., 2002); que concretamente es el empleado por esta tesis. La descripción de los patrones clásicos de asimetría son superados, la descripción ha complejizado su patrón de análisis, cálculo y protocolo, permitiendo así un mejor entendimiento de las fuentes de variación en el espacio asimétrico.

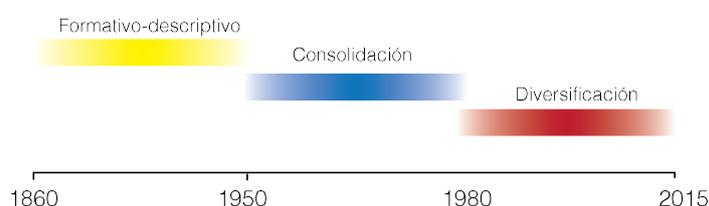


Figura 2.1 Periodos propuestos para el estudio de las asimetrías en la naturaleza. El periodo formativo-descriptivo realiza una caracterización de las asimetrías en diversos grupos de animales y plantas. En periodo de consolidación desarrolla un marco teórico estadístico de las asimetrías, profundiza en los modelos asimétricos y define mucho mejor los tipos de asimetrías. El periodo de diversificación resulta en la explosión de publicaciones de asimetrías, abarcando un amplio segmento de temas como la genética de caracteres cuantitativos, la heredabilidad, etc. El eje temporal no sigue una lógica en escala.

Morfometría geométrica aplicada al estudio de la variación craneofacial

Una de las ventajas o adelantos de la morfometría geométrica (MG) respecto de la morfometría tradicional o clásica es que mediante el uso de distancias, ángulos o curvas se pierde información de la forma biológica en estudio (Richtsmeier et al., 2002), ya que las relaciones espaciales del objeto bajo de estudio también se pierden. Otro punto medular, un tanto más epistemológico, es la discusión de Pucciarelli, (2008) que apunta que:

“Mediante la craneología tradicional se consiguen deslumbrantes distribuciones taxonómicas con escaso, y a veces nulo, valor de información biológica. Lo importante es detectar las diferencias inter o intrapoblacionales a través de valoraciones con traducción biológica porque sustentaría, a su vez, la existencia de procesos evolutivos, adaptativos o producto de mixogénesis”

De esta manera, el mejor eje analítico de la MG reside en que permite un análisis multifactorial de los diversos puntos que miden la forma, más allá del estudio de la forma meramente descriptiva (D’Arcy, 1961), así que no solo es una “técnica o modelo mejor” también es un cambio paradigmático del pensamiento morfológico. Dicha sustitución paradigmática, tuvo su comienzo con el concepto de morfometría multivariada (MM), concepto introducido por Blackith y Reyment, (1971), que proponen la aplicación protocolaria de métodos estandarizados de análisis multivariado de datos (e.g. análisis canónico, componentes principales, etc.), para medidas estándares en organismos (morfometría clásica). Lo que hoy se ha denominado análisis hiperdimensional multivariado se sustenta en la caracterización poblacional, que representa una síntesis de metodologías aplicadas al análisis de las formas biológicas (ver Slice, 2005).

Otro punto importante de la MG es que se preserva la relación anatomo-espacial de las estructuras, además de poder acceder a todas las distancias entre puntos de la configuración utilizada (O’Higgins et al., 2001). En contraste, los datos en morfometría clásica no pueden ser transformados en puntos espaciales. Cabe destacar que las características generales de la cara, la definen como una estructura anatómicamente irregular en tres dimensiones, al igual que puede referirse para el cráneo.

Conceptos: *shape*, *form* y *size*.

La MG se define como la unión entre la geometría y la biología (Bookstein, 1998) para el estudio de la forma en dos o tres dimensiones (Richtsmeier et al., 2002). La forma (*shape*) son las propiedades geométricas que son invariantes cuando son eliminados los efectos de localización, escala y orientación (Slice, 2005). La forma (*form*) es la característica que sigue siendo invariante una vez eliminado cualquier efecto de translación, rotación o reflexión del objeto (Lele y Richtsmeier, 2001). Finalmente, el tamaño (*size*) está representado por la raíz cuadrada de las distancias euclidianas de cada *landmark* hacia el centroide (Dryden y Mardia,

1998) y representa la medida universal del tamaño en morfometría geométrica (Figura 2.2). El tamaño (*size*) es eliminado de la configuración de *landmarks*, para ser estudiado independiente de la forma. Considerando X como una $k * m$ matriz de coordenadas cartesianas de k *landmarks* en m dimensiones, la medición del tamaño $g(X)$ es cualquier función con valores reales positivos de la matriz de configuración tales que, $g(aX) = ag(X)$, para cualquier positivo escalar a . Luego entonces, el *centroid size* es la raíz cuadrada de las distancias euclidianas de cada *landmark* hacia el centroide (Dryden y Mardia, 1998) y representa la medida estimadora del tamaño del objeto más utilizada en el análisis geométrico de la forma (*shape*) (Leamy, 1984; Bookstein, 1991; Goodall, 1991; Dryden y Mardia, 1998).

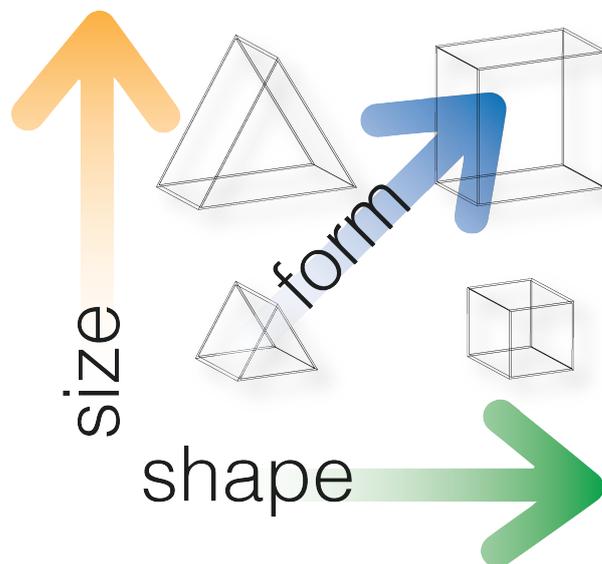


Figura 2.2. El cambio en la forma (*form*) es el resultado de la combinación del cambio en el tamaño (*size*) y la forma propiamente dicha (*shape*). Los términos *size* y *shape* son preferidos a sus equivalentes en castellano, para poder diferenciarlos del cambio en tamaño y forma (*form*), para lo cual el idioma español no tiene un término específico (modificado de Richtsmeier et al., 2002).

Espacios morfométricos

Los espacios utilizados en los MMG, son *manifolds*⁵ que permiten transformar los datos para ser analizados logrando separar o hacer independientes, la forma del tamaño (Mosier, 1939; Gower, 1975; Bookstein, 1991; Goodall, 1991; Cole, 1996; Small, 1996; Dryden y Mardia, 1998; Sneath, 2009). El desarrollo matemático se encuentra en Dryden y Mardia, (1998), Lele y Richtsmeier, (2001), Bookstein, (1991), Slice, (2005) y/o Zelditch et al., (2004). Lo anterior se realiza utilizando el método de ajuste por Procrustes, que es un método de superposición que utiliza matrices ortogonales para hacer coincidir las configuraciones de *landmarks* con transformaciones de similitud hasta lograr que las distancias euclídeas sean mínimas bajo el criterio de mínimos cuadrados (Dryden y Mardia, 1998). El ajuste completo de Procrustes da

⁵ es un espacio matemático abstracto que, en una vista de primer plano, se asemeja a los espacios descritos por la geometría euclidiana (Rowland, 2016).

menos peso a las observaciones que están lejos de la dimensión de una variable media y, por lo tanto, estas serán más robustas contra la influencia de individuos fuera de rango (Klingenberg, 2008). En la transformación de espacios, debido a las características de los modelos matemáticos utilizados se pierden dimensiones en función del modelo (Small, 1996). Más adelante se explicará la transformación de Procrustes realizada para estructuras bilaterales.

El proyecto CANDELA

Se trata de un consorcio multidisciplinario internacional que incluye investigadores científicos especialistas en la diversidad biológica de los latinoamericanos y su entorno socio-cultural. El trabajo de CANDELA se centra en poblaciones urbanas de cinco países: México, Colombia, Perú, Chile y Brasil. En individuos pertenecientes a esas poblaciones fue que se caracterizó su apariencia física, acervo genético y entorno social, así como su percepción y actitudes en torno a ellos mismos y a los otros. El objetivo general es poner a prueba una serie de hipótesis relevantes para la antropología, la investigación biológica y médica, como la relación entre la auto percepción de la identidad y el aspecto físico externo, la ancestría genética y el ambiente socio cultural.

Dicho proyecto prospectó un muestreo de ~7500 individuos, logrando para su primera publicación un total de 7,342 individuos (Ruiz-Linares et al., 2014) en los cuales se aplicó un protocolo general de: 1) toma de muestra sanguínea, 2) fenotipado, consistente en mediciones antropométricas generales y fotografías faciales y 3) encuesta socioeconómica (ver Anexo 1, Figura 2.3).

El proyecto tuvo las aprobaciones de los comités de ética (ver Anexo 2) de la Universidad Nacional Autónoma de México, Escuela Nacional de Antropología e Historia (México), Universidad de Tarapacá (Chile), Universidade Federal do Rio Grande do Sul / Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (Brasil), y el University College of London (Reino Unido). En 2009 el CANDELA obtuvo el financiamiento de Leverhulme Trust (Titulo del Proyecto: *Network for the study of the evolution of Latin American populations*, # F/07134/DF), lo que permitió tomar la muestra en los cinco países arriba mencionados. Además, se recibió financiación del *Biotechnology and Biological Sciences Research Council*, que permitió caracterizar genómicamente a los voluntarios. El Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET-Argentina) otorgó mediante sus mecanismos establecidos y regulares la beca doctoral que sustentó la presente disertación.

A la fecha el proyecto cuenta con una serie de publicaciones que la respaldan entre las que se encuentran un análisis genético del color de la piel en relación al mestizaje (Cerqueira et al., 2014), la exploración del patrón de ancestría genética de la muestra (Ruiz-Linares et al., 2014), uno de los capítulos de esta tesis (Quinto-Sánchez et al., 2015), un trabajo sobre asociación de genoma completo identificando siete zonas del genoma altamente relacionadas con la variación de la oreja en humanos y ratones (Adhikari et al., 2015) y un reciente trabajo identificando genes implicados en características de pelo y cuero cabelludo (forma, color, canas y calvicie) y el vello facial (espesor de la barba, unicejas y el grosor de la ceja), identificando 18 asociaciones con significación genómica (Adhikari et al., 2016).



Figura 2.3. Infografía de las principales características del proyecto CANDELA. El proyecto concentra un muestreo para secuenciación genómica de individuos de grandes ciudades latinoamericanas, concretamente: México, Colombia, Perú, Chile y Brasil. Como se puede ver en la imagen cada país tuvo un coordinador, siendo liderados por Andrés Ruiz-Linares de la UCL. El objetivo fue el estudio de los caracteres físicos y genéticos de las poblaciones mestizas latinoamericanas. Se tenía un blanco de muestreo de 7500 individuos. En dicha muestra, con un rango de edad entre 18 y 65 años, se realizó un protocolo de 5 pasos: toma de sangre, encuesta socioeconómica, toma de fotografías faciales, lectura de pigmentación y antropometría.

Mestizaje en Latinoamérica

Reseñar la historia del mestizaje latinoamericano es una empresa que excede éste trabajo. En ésta sección únicamente se señalarán algunos factores que se consideran como determinantes del proceso y que determinan la configuración y perspectivas de éste estudio.

El primer hecho a subrayar es que la historia biológica del continente y de la población base, los nativos americanos, comenzó como parte de otra historia más antigua: la vasta migración humana sobre el planeta. Así, las poblaciones basales de América son las consecuencias de un proceso que comenzó en el noreste de Asia hace 15,000-18,000 años (Schurr y Sherry, 2004; Fagundes et al., 2008a; b; Perego et al., 2009; Salzano, 2011), teniendo varias oleadas de migración y una rápida expansión por el continente (de Azevedo et al., 2011).

Se ha propuesto que la diáspora tuvo un movimiento principalmente costero y posteriormente hacia el interior del continente (Fagundes et al., 2008a). Cabe destacar que, hasta la llegada de los españoles en 1492, se suscitaron algunos cambios microevolutivos de particular interés como lo fue el reemplazo poblacional del Clásico al Posclásico en México (González-José et al., 2007), el poblamiento sudamericano (Neves y Hubbe, 2005), de la Patagonia (González José et al., 2001), Tierra del Fuego (González-José et al., 2004; Perez et al., 2007). Todas estas características dotan a América de una gran diversidad de manifestaciones culturales de que la arqueología da evidencia, y de igual manera la diversidad interna respecto de su variabilidad fenotípica, en íntima relación con la historia biológica de las poblaciones antiguas (González-José et al., 2008).

Latinoamérica es una región geográfica inmensa, denominada como microcosmos por algunos autores (Salzano y Sans, 2014), por el crisol de variables ecológicas y sociales que en ella interactúan. Geográficamente se extiende desde los 32° Norte a los 60° de latitud Sur y de los 120° a los 20° de longitud Oeste. En ella habita una población muy diversa que ocupa ambientes, tropicales, subtropicales y hasta climas extremos en frío.

La CELADE, división de población de la CELAP, caracterizó una población de 588 millones de personas en Latinoamérica (CELADE, 2010). De esta población se cree que 165 millones son “mestizos” (caracterizados por relevamientos en encuestas) (Salzano y Sans, 2014). De acuerdo con Lizcano, (2005) los datos de mestizos fluctúan en frecuencias de país a país, sobre estimaciones realizadas bajo entrevistas, en países como Colombia y México el 50% de éstos se considera mestizo a diferencia de Perú en donde el 45% se considera amerindio, y en contraste con Brasil y Chile que tienen un alto porcentaje de “blancos”. Sin embargo ya se ha detallado la posible sobre o subestimación de la ancestría autoreportada (Ruiz-Linares et al., 2014).

Además, Latinoamérica guarda una historia única en relación con las políticas sociales y culturales de la etnia, raza y nación. Dentro de estas peculiaridades está la historia sobre la configuración de las castas, la jerarquización social que la sociedad novohispana, racista, multiétnica y multilingüe, demandaba para su estructura. La clase dominante era constituida por los blancos y la escala menor era ocupada por los indígenas, que eran considerados seres inferiores (recuérdese el debate Gines-Casas sobre el tema).

La historia de este proceso comenzó, el 12 de octubre de 1492 en la costa de la isla

Guanahani, sitio que Cristóbal Colón comenzaba con uno de los procesos más trascendentes para las poblaciones nativas de América, el sometimiento por parte de la corona española. El choque de dos grandes ramas de la cultura humana comenzaba su sincretismo, no bajo un esquema idealista como se ha intentado retratar, si no bajo el sometimiento, genocidio y saqueamiento desproporcionado. Tal fue su impacto que la genética y el fenotipo de los Latinoamericanos son testigos del proceso.

Los cálculos de la densidad poblacional al momento de la conquista son muy especulativos. Bartolomé de las Casas calculó que la población era de entre 3 y 4 millones de personas (Thornton, 1987). Las primeras estimaciones fueron muy diversas entre 8.4 y 112.55 millones (Denevan, 1992a). En la actualidad Denevan (1992a) postula, mediante una revisión sobre el tema, que es probable que la población total en América eran 53,904 millones de personas, y alrededor de 45 millones para Salzano y Bortolini, (2002).

Otra realidad es que el proceso de genocidio de los nativos americanos (Figura 2.3) fue dramático en términos numéricos. Basta con ver las tendencias de declive de la población respecto de los inmigrantes (Pereña, 1992) en los Estados Unidos de América para el periodo comprendido entre 1492 a 1980. Éste proceso fue una constante durante la colonia en varias regiones, masacres (violencia generalizada) y epidemias mermaron la población indígena (Pereña, 1992). Para detallar, si bien cada población recibió de diferente manera el proceso de la conquista de América, las poblaciones nativas estaban en diferentes fases de desarrollo cultural y demográfico en el inicio de la conquista europea. Por ejemplo para algunas comunidades sudamericanas sedentarias en las regiones más densamente pobladas sufrieron los impactos estructurales de las epidemias y otros factores más fuertemente, mientras que muchos grupos pequeños simplemente de fueron extinguiendo (Salzano y Callegari-Jacques, 1988). Para más detalles sobre el tema véase (Thornton, 1987, 2000; Denevan, 1992a; b, 2003; Pereña, 1992; Stannard, 1993).

La población americana, nativa o amerindia, como ya se ha mencionado, se cree que fue constituida por tres oleadas de diferentes poblaciones asiáticas (Reich et al., 2012). La población africana fue obligada a migrar a América como esclavos. Su comercio, en acción desde 1518, comenzó en el Caribe, extendiéndose a América Central y norte de Brasil (Salzano y Sans, 2014). Se han definido cuatro principales áreas fuente de esclavos: Guinea superior, Guinea Inferior, Delta del Congo y Angola, y Mozambique (Rout, 1976), existiendo mucha variación cronológica en el flujo de esclavos desde esas regiones (más detalles en Salzano y Bortolini, 2002). Y estimando en nueve millones el número de esclavos embarcados a través del océano Atlántico entre 1452 y 1870 (Reader, 1998).

En contraparte, la componente europea se caracteriza por una primera oleada Hispano-Portuguesa. Posterior al hecho anterior le siguieron diversas oleadas de otros países como Francia, Alemania y Holanda. Finalmente y debido al grado de apertura de las leyes de migración, la complejidad del fenómeno se tornó muy poco mensurable. Si bien es difícil estimar el número de inmigrantes a América los datos más fehacientes que pueden darnos idea del proceso son aquellos que entraron en los Estados Unidos calculado en 850.000 en 1650, 13,47 millones en 1825, y 221,16 millones en 1950 (ver Rosenblat, 1954).

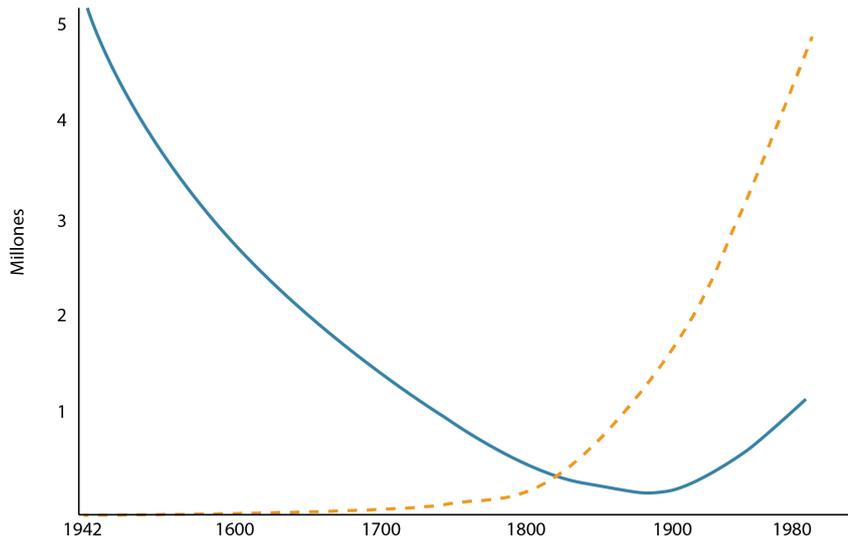


Figura 2.3. Dinámica poblacional de durante el proceso de colonización de EE.UU. La línea azul representa la tendencia de la población indígena y cómo ésta disminuye hasta finales de 1900. Por el contrario la línea naranja punteada representa la llegada de extranjeros.

Según Salzano y Sans, (2014) se puede establecer que después de la llegada de Colón se establecieron un máximo de 21 generaciones de mestizaje, con variaciones regionales. Otros autores estiman que el tiempo medio desde la primera mezcla habría permitido de seis a 14 generaciones (Wang et al., 2008). Finalmente, se estiman 19 generaciones identificadas a partir de los hombres que vivieron en el siglo XVII (Heyer et al., 1997).

No cabe duda entonces, que el proceso de mestizaje es hiperdimensional, además de tener características particulares, como el hecho de que existió una asimetría de la migración, más tendiente a los hombres que a las mujeres. Los contextos sociales, económicos y sociales de las poblaciones nativas, europeas y africanas en un principio, y la reestructuración de estas dentro del marco de las políticas migratorias hasta el presente, constituyen un complejo esquema de realidades genéticas, fenotípicas y sociales que son un marco de amplio interés para la investigación de las ciencias humanas.

Sujetos, materiales y métodos

Muestra

Como se ha mencionado, CANDELA tuvo un objetivo inicial de muestreo de ~7.500 individuos, estimado a través de un cálculo de poder estadístico para las pruebas de GWAS. A la fecha de la escritura de este manuscrito se lograba un objetivo de 7.342 (ver Ruiz-Linares et al., 2014). Los individuos totales utilizados en este análisis fueron 4.382, ya que éstos fueron aquellos individuos digitalizados (ubicación de los *landmarks* en 3D mediante fotogrametría, ver abajo) al tiempo de análisis de esta disertación y que presentaban alguna de las variables utilizadas en el estudio, obtenidas de la encuesta antropométrica. De esta manera cada capítulo presenta una ligera fluctuación en el número muestral (*n*), debido a la presencia de *outliers* o por aquellos individuos que no presentaban alguno de los datos requeridos para el análisis. De esta manera, el capítulo V, VI, VIII y IX utilizan 4.107 individuos (Tabla 3.1), el VII 2.019 individuos. El capítulo VII presentó muchos individuos sin reporte de datos en la encuesta socioeconómica, por lo que fueron eliminados del análisis. Como ya se mencionó las ciudades de muestreo fueron: Ciudad de México (México), Medellín (Colombia), Lima (Perú), Arica (Chile), Porto Alegre y Jequié (ambos en Brasil). En cada capítulo se detallan los valores de cada configuración de datos, pero como referencia general puede verse la Figura 2.3 en la página 35.

Tabla 3.1. Detalles de la muestra concernientes a la edad, sexo y país para un total de 4104 voluntarios.

país	edad							
	adulto joven (18-20)		adulto (20-40)		adulto medio (40-60)		adulto mayor (60 y más)	
	f	m	f	m	f	m	f	m
Brasil	110	53	336	151	70	49	9	7
Chile	102	184	279	666	61	115	5	1
Colombia	211	129	360	286	1	5	0	0
México	181	87	217	164	45	22	2	2
Perú	65	40	52	34	1	2	0	0
Totales	669	493	1244	1301	178	193	16	10

Criterios empleados en la fotografía facial

La forma de la cara fue capturada/fijada utilizando cámaras DSLR modelo Nikon D90 y una óptica Nikon 50mm fija tal como se aplica en algunos estudios anteriores (Galantucci et al., 2008; Menezes et al., 2009) y por recomendación del programa fotogramétrico a utilizar: Photomodeler (ver sección Fotogrametría). La toma fotográfica se realizó manualmente a ~1.5 metros de distancia al rostro en cinco posiciones diferentes (Figura 3.1a): laterales a 0 y 180° (2), frontolaterales a 45 y 135° (2) y frontal a 90° (1).

Se realizaron tres series fotográficas para su posterior discriminación visual (ver más abajo, Figura 3.1b), bajo el criterio de descartar las dos sesiones de peor calidad y retener para la reconstrucción fotogramétrica la mejor de las tres sesiones en cuando a foco, expresión neutra, iluminación, etc. Así, primeramente, se intentó elegir una serie completa y subsecuente

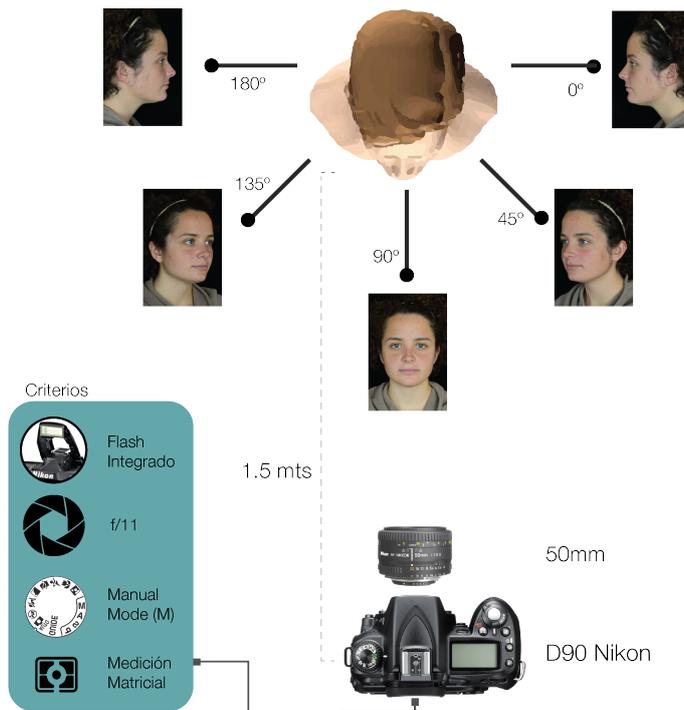
de cinco disparos. Segundo, se verificó que en las cinco fotos se observen todas las estructuras en donde se pondrían puntos deberían ser visibles. Tercero, se comprobó no tener desenfoques producto de la toma fotográfica o mala calidad de iluminación. Cuarto, tener la expresión facial neutra; cualquier sonrisa, expresión, entrecierre de ojos, boca, etc., fue tomado como un rasgo suficiente para eliminar la fotografía. Sólo cuando no se logró tener una serie completa cumpliendo los requisitos arriba listados se optó por combinaciones entre las tres series.

Las fotografías fueron tomadas siguiendo el mismo protocolo en los cinco países. Esto consistió en utilizar una apertura de $f/11$ con el flash de la cámara integrado, lo que permitió que, según el equipo utilizado, se tuviera una profundidad de campo de 40 cm (para su comprobación realizar cálculo en: <http://www.dofmaster.com/dofjs.html>, bajo los datos: camera Nikon D90, *focal length* (mm) 50, *selected f-stop* $f/11$, *subject distance* 150 cm; resultando en un campo total de 40.1 cm, limite próximo de 132.6 cm y lejano de 172.7.4 cm).

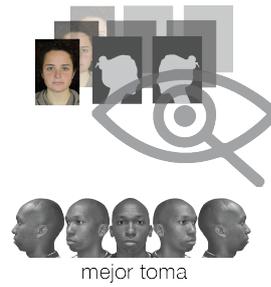
De igual manera, durante la toma se eliminaba cualquier elemento que interfiriera con el posicionamiento de los *landmarks* del protocolo, tales como aretes, collares, pelo, diademas, entre otros. El voluntario fue tomado en orientación al plano de Frankfurt (plano porion-orbital, solo como referencia no de manera estricta, ver más abajo), con expresión facial neutra y la menor cantidad de maquillaje. Cabe destacar que debido a la técnica de reconstrucción 3D por fotogrametría los efectos de rotación (der-izq) o flexión-extensión de la cabeza no conforman elementos de ruido en la toma, como lo pudieran ser en las fotografías de trabajos en 2D (para más detalles ver Zelditch et al., 2004)

Finalmente, se realizó el *landmarking* en el programa PhotoModeler (Figura 3.1c). Previo a esto cada cámara fue estandarizada mediante el cálculo de una calibración (ver modelo más adelante) que consiste en la toma de ocho fotografías a una plantilla con puntos fiduciaros, en dos: vistas horizontal y vertical. El programa analiza la aberración del lente para su corrección. Con las cinco fotografías elegidas como mejor toma y la calibración es que el programa permite la digitalización del protocolo de *landmarks*, su escalamiento y su exportación como coordenadas en 3D en un archivo *.txt (Figura 3.1c).

a) Fotografía científica



b) Elección de fotografía



c) Landmarking

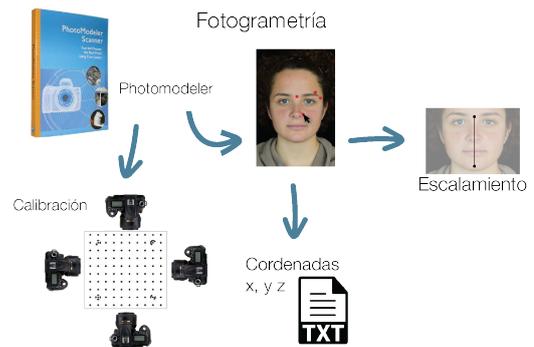


Figura 3.1. Protocolo fotográfico y fotogramétrico CANDELA. a) Procedimiento de toma fotográfica, equipo utilizado con sus respectivos parámetros (recuadro azul turquesa) y estándares empleados. b) Proceso de selección de mejor toma fotográfica según criterios de visibilidad de puntos y enfoque (ver texto). c) *Landmarking* manual mediante el uso del software PhotoModeler previa calibración con una serie de ocho fotografías según requerimientos estándares de la plataforma PhotoModeler que estima el error del lente y evalúa su fiabilidad. Escalamiento del modelo 3D mediante la distancia Nasion-Gnathion. Finalmente, mediante este *landmarking* se obtienen las coordenadas 3D para su posterior análisis.

Criterios de fotogrametría en la reconstrucción facial 3D

La técnica de fotogrametría, según la Sociedad Americana de Fotogrametría y Teledetección (ASPRS) es:

“el arte, ciencia y tecnología para la obtención de medidas fiables de objetos físicos y su entorno, a través de la grabación, medida e interpretación de imágenes y patrones de energía electromagnética radiante y otros fenómenos”

Esta última definición es más amplia y abarca técnicas modernas incluyendo la Teledetección. Algunas otras definiciones citan que la fotogrametría es la ciencia de obtener información confiable acerca de las propiedades de superficies y objetos, sin el contacto físico con éstos; así como la medición e interpretación de dicha información (Schenk, 2005a; b; Gomasasca, 2009). Según Kraus,

(2007) y Linder, (2009) por medio de la fotogrametría se:

“permite la reconstrucción de la posición, orientación, forma y tamaño de un objeto a través de fotografías. Básicamente, la reconstrucción geométrica de un objeto a partir de una fotografía se plantea como un problema geométrico de reconstrucción de rayos homólogos desde dos puntos de vista diferentes”

Finalmente, y según Sánchez Sobrino, (2007):

“la reconstrucción geométrica de un objeto a partir de una fotografía aérea se plantea inicialmente como un problema geométrico de reconstrucción de rayos homólogos (que van a un mismo punto) desde dos puntos de vista diferentes”

De manera general el proceso fotogramétrico se realiza en cuatro pasos:

1. La determinación del haz perspectivo por sus datos internos, conocer la forma del haz. En el caso de una fotografía, saber la distancia focal y otros parámetros como la orientación interna.
2. Determinación de la posición relativa de un haz respecto a otro, de tal forma que las intersecciones de puntos homólogos en la fotografía determinen los puntos del objeto: orientación relativa.
3. Colocación y escalado de todo el conjunto rígido en un sistema de coordenadas terreno: orientación absoluta.
4. Determinación e identificación de pares de rayos homólogos y los puntos del objeto o terreno: restitución.

Zelditch y colaboradores, (2004) detallan que todavía hay grandes obstáculos para la recolección de datos 3D en el estudio biológico, incluyendo el costo, la disponibilidad y la idoneidad de los instrumentos para estudios de campo. No obstante ello, ya existen las tecnologías para la captura de individuos en 3D, como lo son digitalizadores 3D de escaneo, microscopios, escáneres ópticos y de tomografía axial computarizada. Sin embargo su uso está limitado, ya que su costo es alto, o bien se trata de equipos no portátiles (Chiari et al., 2008). Por ello a pesar de que es poco utilizada en biología, la experiencia de su uso en ingeniería, medicina, geología y otras, le confiere a la fotogrametría elementos clave para la reconstrucción de estructuras complejas como el rostro o el cráneo en condiciones “de campo” (Chiari et al., 2008).

En algunas publicaciones sobre el uso de la fotogrametría se insiste en la facilidad para obtener datos en campo (Sonnweber et al., 2013) e inclusive algunos autores obtienen resultados saludables empleando fragmentos de videos (Stevens, 1997). Como sea, su aplicación, el bajo costo

y la facilidad relativa de su uso confieren a la fotogrametría de una ventaja sobre otras técnicas. La rapidez de la captura del fenotipo de 7.500 individuos en el proyecto CANDELA y la calidad del dato, respecto del costo y tiempo de procesamiento resultó en la mejor apuesta para los objetivos del análisis, al menos en el momento que se planificó el muestreo, en un workshop realizado en la ciudad de Medellín, Colombia, en el año 2008.

Por las características anteriores, y teniendo en cuenta los fondos disponibles y las condiciones de mercado sobre escaneos tridimensionales, se eligió la fotogrametría como herramienta de captura 3D empleando el programa PhotoModeler (Eos-Systems, 2014), que extrae mediciones 3D y modelos a partir de fotografías tomadas con una cámara convencional. La marca se auto promociona como una forma rentable de hacer un escaneo 3D preciso, medir y realizar topografía. PhotoModeler acepta fotos de una amplia gama de fuentes: digital, película escaneada digital, cámaras de vídeo, etc. La empresa recomienda el uso de cámara réflex digital para obtener los mejores resultados, siendo la cámara utilizada por el proyecto, Nikon D90, la estándar. Los requerimientos de PhotoModeler son:

1. Alta resolución: resoluciones de apoyo a la mayoría de cámaras de alta calidad de 8 mega píxeles o superior.
2. Objetivos sin zoom de alta calidad: casi todas las cámaras digitales de consumo vienen con una lente de zoom, así que esto es difícil de evitar. Si se utiliza un objetivo zoom, se debe configurar el zoom óptico para un ajuste para todos sus proyectos PhotoModeler.
3. Evitar el uso de los ajustes de zoom digital: éste zoom manipula la foto sin tener que ajustar la longitud focal.
4. Las réflex digitales, por otro lado le permiten elegir su lente y le recomendamos un objetivo sin zoom gran angular (llamada una lente de foco fijo).
5. No utilice la reducción de vibraciones o lentes de estabilización de imagen.
6. Al hacer proyectos con objetivos de alto contraste se recomienda el uso de cámaras con un filtro anti-aliasing (la mayoría de las cámaras tienen uno) y desactivar o reducir el ajuste de nitidez.
7. El control sobre los ajustes: si la cámara tiene funciones automáticas tales como la estabilización de imagen o detección de orientación debe asegurarse que no estén activos los ajustes de menú para dejar estas características fuera. Otros buenos controles son para el enfoque manual y enfoque (y en algunos casos la apertura y la velocidad de obturación).
8. Cuando se necesita una alta exactitud puede utilizarse el *software* de calibración de la

cámara de PhotoModeler para elevar la calidad de los proyectos. Para ello, ocho a doce fotos deben ser tomadas y suministradas al programa para generar un modelo, por medio de la función calibrador de cámara, que procesa las tomas de forma automática. El programa calcula la longitud focal de la cámara, la distorsión de la lente, la relación de aspecto de formato y la ubicación de punto de referencia o fiduciaros. El archivo de datos de calibración resultante se guarda como referencia de cada cámara y se usa en todos los proyectos que involucran PhotoModeler con fotos tomadas por esa cámara, resta decir que con los mismos ajustes. PhotoModeler también incluye modos de calibración auto-calibración (ver sección siguiente) y de campo para mejorar los parámetros de la cámara aún más cuando la precisión es la principal preocupación.

Corrección de las posibles aberraciones en las fotografías faciales CANDELA

En términos generales, hay dos razones por las cuales se producen aberraciones en un sistema óptico. En primer lugar, estos errores se producen debido simplemente a imperfecciones en los componentes ópticos individuales y son muy difíciles de evitar, incluso cuando se utilizan los mejores componentes. En segundo lugar, los errores en la fabricación y en la alineación de los componentes ópticos individuales pueden dar lugar a otras aberraciones. Cualquier imagen de una escena formada por un solo elemento presentará distorsión. En este contexto Bilissi y Langford, (2007) reconocen hasta siete principales aberraciones geométricas que pueden ocurrir en un sistema óptico. Para minimizar estos problemas se utilizó un equipo fotográfico de media calidad (empleando exactamente las mismas cámaras y lentes en los cinco países), la Nikon D90 de 12.3 megapíxeles en formato DX (ángulo de imagen efectivo 1.5x). Los fotogramas fueron realizados en formato *Large* (3.216 x 2.136 píxeles).

En relación al objetivo AF Nikkor 50mm, este presenta las siguientes características: f/1.8D, con un ángulo máximo de visión de 31°30', compuesto de 6 elementos en 5 grupos; y con una distancia mínima de enfoque de 0.45m. En relación a la aberración, en su trabajo titulado "*Photogrammetric Measurement error associated with lens distortion*", Neale et al., (2011) afirma que:

"is clear from these plots that a 50 mm lens has the least distortion, and as the focal length decreases or increases from a 50mm lens there is also an increase in distortion"

En el proceso de revisión de las publicaciones asociadas a este manuscrito, algunos revisores sugirieron una lente más larga (200mm), tal como emplea Windhager et al., (2014):

“fotografías frontales fueron tomadas a una distancia normalizada ya la altura de los ojos con una cámara réflex digital (Canon EOS 40D) y una lente de 200 mm”

Sin embargo, un correcto entendimiento de la teoría de la fotografía científica permite entender que lentes de mayor distancia no son mejores que una lente 50mm, de hecho la cantidad de error (para lentes no aplanáticas) es siempre mayor. Además, se puede decir sin lugar a dudas, que el protocolo fotográfica CANDELA asegura que todas las caras están bajo la cobertura de “zona verde” (*sensu* Neale et al., 2011), lo que significa que todos los píxeles que ocupa el rostro están muy lejos de la región de píxeles más afectados por la distorsión de la lente (Figura 3.2). Finalmente en la Tabla 3.2 se muestran los parámetros de exactitud del PhotoModeler, el protocolo aquí empleado está dentro de la limitación de máxima calidad (recuadro verde), con la excepción de las *targets* que no fueron utilizadas en el proyecto.

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1	-15	-25	-27	-82	-78	-55	-57	-50	-42	-42	-42	-45	-50	-57	-66	-78	-92	-107	-125	-145	
2	-31	-11	-93	-77	-63	-51	-43	-35	-32	-29	-28	-29	-32	-36	-43	-52	-63	-77	-93	-111	-131
3	-18	-98	-80	-64	-51	-40	-32	-25	-21	-19	-18	-19	-21	-25	-32	-40	-51	-64	-80	-98	-118
4	-207	-87	-69	-54	-41	-31	-23	-17	-13	-11	-10	-11	-13	-17	-23	-31	-41	-54	-69	-87	-107
5	99	-79	-61	-46	-34	-24	-16	-11	-7	-6	-5	-6	-7	-11	-16	-24	-34	-46	-61	-79	-99
6	-63	-73	-53	-40	-28	-19	-12	-7	-4	-2	-2	-4	-7	-12	-19	-28	-40	-53	-73	-93	
7	88	68	-51	-36	-25	-15	9	4	2	1	0	1	2	4	9	15	25	36	51	68	88
8	-86	-66	-49	-35	-23	-14	-7	-5	-3	0	0	0	-1	-3	-7	-14	-23	-35	-49	-66	-86
9	86	66	-49	-35	-23	-14	-7	-5	-3	0	0	0	1	3	7	14	23	35	49	66	86
10	-82	-68	-51	-36	-25	-15	9	4	2	1	0	-1	-2	-4	-9	-15	-25	-36	-51	-68	-82
11	93	-73	-55	-40	-28	-19	-12	-7	-4	-2	-2	-4	-7	-12	-19	-28	-40	-55	-73	-93	
12	-99	-79	-61	-46	-34	-24	-16	-11	-7	-6	-5	-6	-7	-11	-16	-24	-34	-46	-61	-79	-99
13	-207	-87	-69	-54	-41	-31	-23	-17	-13	-11	-10	-11	-13	-17	-23	-31	-41	-54	-69	-87	-107
14	-18	-98	-80	-64	-51	-40	-32	-25	-21	-19	-18	-19	-21	-25	-32	-40	-51	-64	-80	-98	-118
15	-31	-11	-93	-77	-63	-51	-43	-35	-32	-29	-28	-29	-32	-36	-43	-52	-63	-77	-93	-111	-131
16	-15	-25	-27	-82	-78	-55	-57	-50	-42	-42	-42	-45	-50	-57	-66	-78	-92	-107	-125	-145	

Figura 3.2 La zona verde en la imagen representa las partes de la imagen con menor cantidad de deformación, teniendo un gradiente de color amarillo, para un error medio y el rojo para grandes cantidades.

Tabla 3.2 Parámetros de exactitud del programa PhotoModeler.

	Camera Resolution	Camera Calibration Method	Angles between Photos	Photo Orientation Quality	Photo Redundancy	Targets
Lowest Accuracy 1 part in 100	Video 640x480	no calibration	most less than 15 degrees	few points per photo, low coverage	points mostly on only 2 photos	no targets, all user marked
Average Accuracy 1 part in 5,000	5-6 MegaPixel	Inverse Camera Camera Calibrator	most between 20 and 90 degrees	15+ points/photo, 25 to 60% coverage	all points on 3+ photos	some naturally lit targets for key points
Highest Accuracy 1 part in 30,000+	11 MegaPixel	Field Calibration*	most between 60 and 90 degrees	35+ points/photo, 50 to 80% coverage	most points on 8 or more photos	many good quality naturally lit retro-reflective

Fortaleciendo las ideas ya expuestas, podemos entonces exponer que si bien los instrumentos utilizados para la captura de la forma de la cara tienen bajo efecto respecto de aberraciones generales que pudieran significar sesgo en la interpretación de los fenómenos biológicos. El detalle más importante con respecto a la distorsión es que el software utilizado explícitamente elimina cualquier efecto de distorsión óptica. De hecho, PhotoModeler cita que se puede compensar:

"la distorsión de la lente a través de un procedimiento de calibración con lo que incluso lentes de calidad normal, brindan opciones razonables para hacer mediciones"

La calibración de la cámara (Figura 3.1c) es el proceso de encontrar los parámetros geométricos con los cuales se tomaron las fotografías. Algunos de estos parámetros son la distancia focal, el tamaño del formato, punto principal, y la distorsión de la lente. El *software* elimina la distorsión de la lente desplazando un punto en la superficie de la imagen a su posición verdadera como si hubiera sido fotografiada por una cámara ideal *pinhole*. La compensación para cualquier punto (x, y) en la superficie de la imagen (dado que el punto principal es 0,0) viene dada por:

$$xc = x + drx + dpx \quad (1)$$

$$yc = y + dry + dpy \quad (2)$$

Donde, xc, yc es el punto de la imagen corregida, drx es el componente x de la corrección de la distorsión radial lente y dpy es el componente y de la corrección de la distorsión radial lente, dpx es

el componente x de la corrección de la distorsión del descentramiento de la lente y dpy es la componente y de la corrección de la distorsión del descentramiento de la lente. Por lo tanto, PhotoModeler también puede dar cuenta de la distorsión de lentes radial y descentramiento.

Cabe destacar que todos estos indicadores son calculados por el software automáticamente cuando el usuario ejecuta la rutina de calibración de la cámara¹. Después de ejecutar esta rutina, PhotoModeler genera un informe que detalla todos los indicadores de la distorsión de la lente; si cualquiera de estos está por encima de los límites aceptados de distorsión, la calibración de la cámara evita la construcción de un modelo 3D basado en la cámara y la lente propuesta.

Finalmente, existen varias referencias que dan cuenta de la precisión y exactitud de la reconstrucción 3D a través de fotogrametría, muchos de ellos con condiciones similares a las presentes en esta tesis:

“The advantage of the presented (photogrammetric) method over laser scanning and coded light range digitizers is the acquisition of the source data in a fraction of a second, allowing the measurement of human faces with higher accuracy...” (D’Apuzzo, 2002);

“Systematic errors between the two methods [direct measurements versus photogrammetric reconstruction using Photomodeler] were found for seven measurements but most mean differences were clinically insignificant (below 2 mm). In terms of measurement precision, no systematic biases were found between repeated measurements on the same photographs or on different photographs and our precision estimates showed a clinically acceptable level of repeatability for the Photomodeler system.” (Abdulkareem y Abdulkareem, 2012);

“In terms of measurement precision, the 3D photos were clearly better than direct anthropometry. In almost all cases, the 3D photo with landmarks labeled had the highest overall precision. In addition, labeling landmarks prior to taking measurements improved precision, regardless of method. Good congruence was observed between means derived from the 3D photos and direct anthropometry.” (Weinberg et al., 2006).

Las tres referencias destacan la precisión y economía del uso de la fotogrametría. Además, como ya se ha planteado para CANDELA representó la mejor opción dado a que se muestrearían 7500 individuos, además de un set de fenotipos extras, reduciendo el tiempo de toma de datos para cada voluntario.

¹ más información en: http://www.photomodeler.com/products/about_cameras.html#calibration

Protocolo de *landmarks* faciales

El estudio de la variación de forma es intrínseco a la antropología biológica (Richtsmeier et al., 2002). Con el advenimiento de la fusión de la biología y la geometría, es decir, la morfometría geométrica (Bookstein, 1982), el uso de puntos espaciales para el análisis del cambio en la forma, ha constituido una revolución en el campo de la morfología (Adams et al., 2004). Luego entonces, según Zelditch et al., (2004) los *landmarks* son *loci* anatómicos discretos que pueden ser reconocidos como el mismo *loci* en todos los organismos en estudio, es decir presentan la propiedad de ser homólogos. Idealmente, los *landmarks* deberán:

- 1) ser *loci* anatómicos homólogos
- 2) no alterar su topología de posición respecto de otros puntos
- 3) crear una adecuada cobertura de la morfología en estudio
- 4) deben poder ser hallados persistentemente y ser reproducibles
- 5) deben encontrarse en el mismo plano (sólo cuando se busca estudiar objetos tridimensionales en imágenes bidimensionales).

Así, los *landmarks* se resumen como puntos en dos o tres dimensiones que corresponden con la posición espacial de una característica de interés particular en un objeto x (Lele y Richtsmeier, 2001), mismos que presentan una correspondencia entre y dentro de las poblaciones (Dryden y Mardia, 1998), o lo que sería lo mismo son puntos anatómicos que corresponden en su derivación biológica (Jardine, 1969).

Bookstein, (1991) caracteriza tres tipos de *landmarks*: tipo 1 o de yuxtaposición discreta de tejidos; tipo 2 o de máxima curvatura o proceso morfogenético local, y tipo 3, o puntos extremos. Una variación de esta clasificación la definen Lele y Richtsmeier, (2001) que clasifican los puntos o *landmarks* como: tradicionales, *fuzzy* y contruidos. Finalmente, Dryden y Mardia, (1998) los definen como: anatómicos, matemáticos y pseudo-*landmarks*.

Con el fin de capturar la forma del rostro se realizó un *landmarking*, que consistió en un set de 34 puntos anatómicos faciales (Tabla 3.2, Figura 3.1). Se siguió la propuesta protocolar de Ercan et al., (2008) y Ferrario et al., (1995). Se intentó cubrir la mayoría de las regiones faciales (espagnocráneo) aunque algunas quedaron fuera debido a dos factores: 1) la aplicación del protocolo mismo a realizarse en una muestra grande de 7.500 individuos, y 2) la varianza del mismo según las definiciones anatómicas. La Tabla 3.3 describe los puntos utilizados y su respectiva definición anatómica. Asimismo, la Figura 3.3 muestra la relación anatomo-espacial de la misma. Todos los puntos fueron colocados por medio de la asistencia del programa PhotoModeler (Eos-Systems, 2014). En este sentido, se siguieron las recomendaciones para los valores de calidad y exactitud más altos del programa, es decir: valores residuales inferiores a cinco, calibración óptima de la cámara,

resolución de la cámara, fotoredundancia, etc. Cabe destacar que cualquier distorsión del sistema óptico es solucionado por el programa mediante la aplicación de un algoritmo (ver arriba).

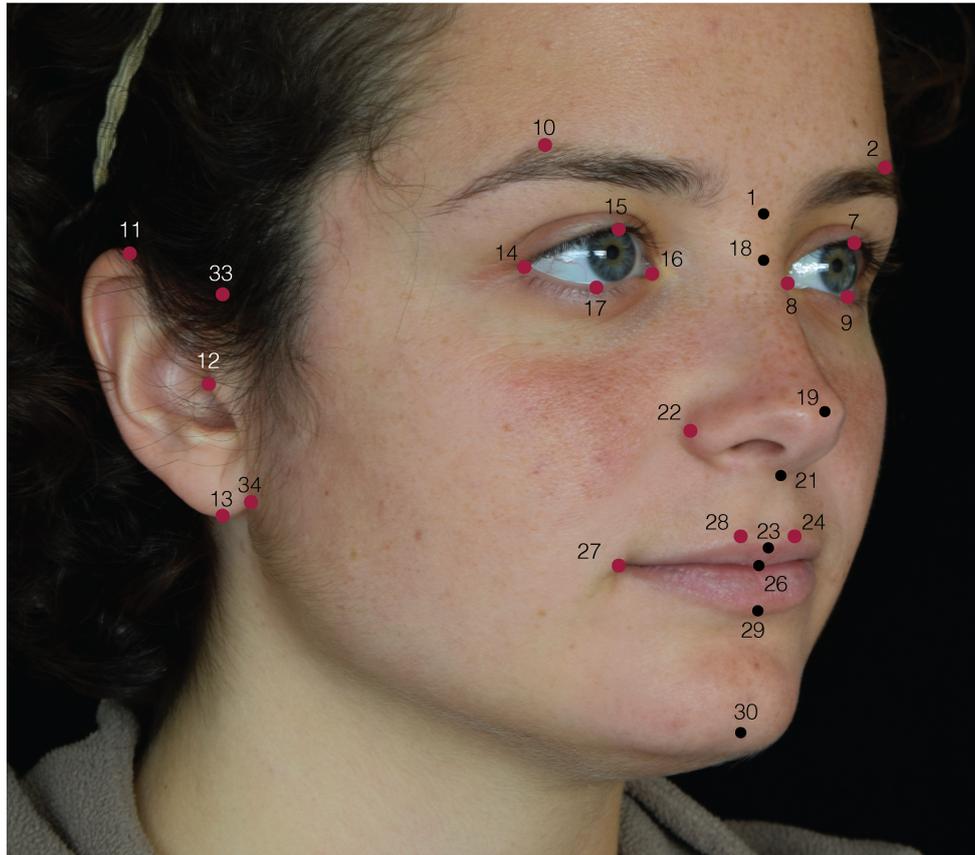


Figura b.3. Referencia espacial de los *landmarks* anatómicos craneofaciales utilizados en éste análisis. El protocolo se integra de 8 puntos sagitales (rojo) y 26 bilaterales (negro). Según Ercan et al., (2008) y Ferrario et al., (1995).

Tabla b.3. Definiciones anatómicas de los *landmarks* craneofaciales empleados en este análisis según Ercan et al., (2008) y Ferrario et al., (1995) (ver Figura 1 para referencia espacial).

No.	Nombre	Definición anatómica
Landmarks sagitales		
1	Glabella	El punto sobre la línea media a la altura de los arcos superciliares
18	Nasion (sellion)	El punto medio de la sutura nasofrontal
19	Pronasal	El punto más prominente de la nariz
21	Subnasal	El punto medio donde se une el borde inferior del septum nasal, la partición que divide las narinas y la porción cutánea del labio superior
23	Labiale superius	El punto medio del borde vermilion sobre el labio superior
26	Stomion	El punto medio de la fisura labial cuando los labios están cerrados naturalmente
29	Labiale inferius	El punto medio del borde vermilion del labio inferior
30	Gnathion	El punto más bajo en la línea media del borde inferior de la barbilla
Landmarks bilaterales		
2,10	Frontotemporale	El punto mas medial sobre la cresta temporal del hueso frontal
3,11	Superaurale	El punto máximo en el borde superior de la oreja
4,12	Tragion	La punta del tragus
5,13	Subaurale	El punto más bajo en el borde inferior de la oreja
6,16	Exocanthion	La esquina exterior de la hendidura del ojo derecho donde los párpados se encuentran.
7,15	Palpebrale superiorus	El punto más alto en el margen superior de la porción media del párpado
8, 14	Endocanthion	La esquina interior de la hendidura del ojo derecho donde los párpados se encuentran, no es caruncular
9, 17	Palpebrale inferiorus	El punto más bajo en el medio del margen del párpado inferior
20,22	Alare	El punto más lateral sobre el ala nasal
24,28	Crista philtrum (upper lip point)	El punto sobre la cresta de la depresión infranasal (philtrum), cuando este cruza con el borde vermilion
25,27	Cheilion	La esquina externa de la boca donde los bordes externos del vermilion superior e inferior se encuentran
31,33	Otobasion superiorus	El punto superior de la unión entre el lóbulo y la cabeza (punto de inserción de la oreja)
32,34	Otobasion inferiorus	El punto inferior de la unión entre el lóbulo y la cabeza (punto de inserción de la oreja)

La escala fue determinada por medio de la distancia nasion-gnathion, la cual fue medida directamente en los voluntarios con un calibre estándar; y utilizada en el proceso de escalamiento en el Photomodeler. Las coordenadas crudas (*raw coordinates*) 3D obtenidas del proceso anterior fueron exportadas en un archivo de texto y se utilizaron en los análisis posteriores.

Finalmente dentro de los análisis de error fue utilizado un maniquí (Figura 3.4) de rostro para realizar una prueba de reproducibilidad y repetibilidad entre las técnicas de digitalización directa y reconstrucción fotogramétrica (ver Capítulo IV). La obtención de las coordenadas de *landmarks* es la misma que la descrita en este segmento, con la variación de que el maniquí es invariante a factores como movimiento, gestos, etc.

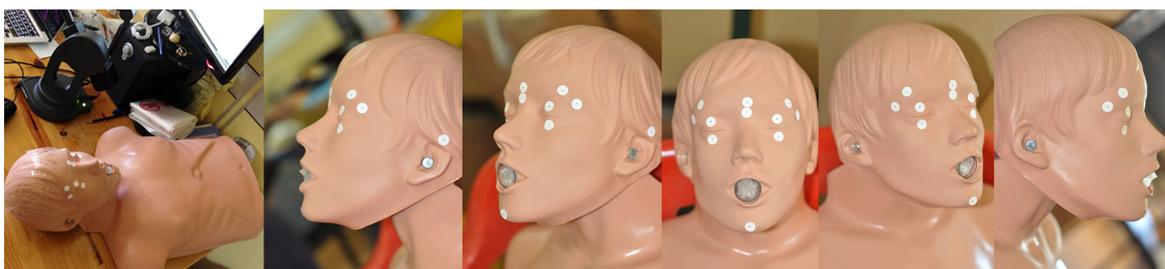


Figura 3.4. Vista general del aspecto del maniquí utilizado en la prueba de reproducibilidad. Las pegatinas fueron colocadas en los puntos de conflicto y con el fin de reducir el error en la toma de datos.

Diseño experimental

Si bien ya se ha descrito el planteamiento del problema, su fundamento teórico, y relevado los objetivos e hipótesis a contrastar, la intención de esta sección es detallar algunos aspectos más del diseño de la tesis (Figura 3.5). Así, es oportuno definir que la presente investigación se trata de un estudio prospectivo, transversal, descriptivo-comparativo (efecto-causa) y observacional (Mendez et al., 2006).

Criterios generales de inclusión/exclusión

El primer criterio de corte en el *dataframe* utilizado fue la digitalización, el esfuerzo de digitalización contando con dos observadores llegó a 4.697 digitalizaciones (incluyendo pruebas del error). Además de esto, se realizaron revisiones de aquellos individuos que una vez estandarizados por los métodos de morfometría geométrica (MG) éstos presentaban una desviación de la forma promedio aberrante. Dicho proceso se realizó en la plataforma *MorphoJ*, donde únicamente fueron identificados 17 individuos como *outliers* (de entre los 4.697 registros). De éstos, nueve fueron el resultado de una mala digitalización y el resto se trató de un efecto de la escala. Finalmente, algunos individuos no pudieron ser incluidos por presentar alteraciones morfológicas severas, aunque no fueron excluidos para otros análisis genéticos.

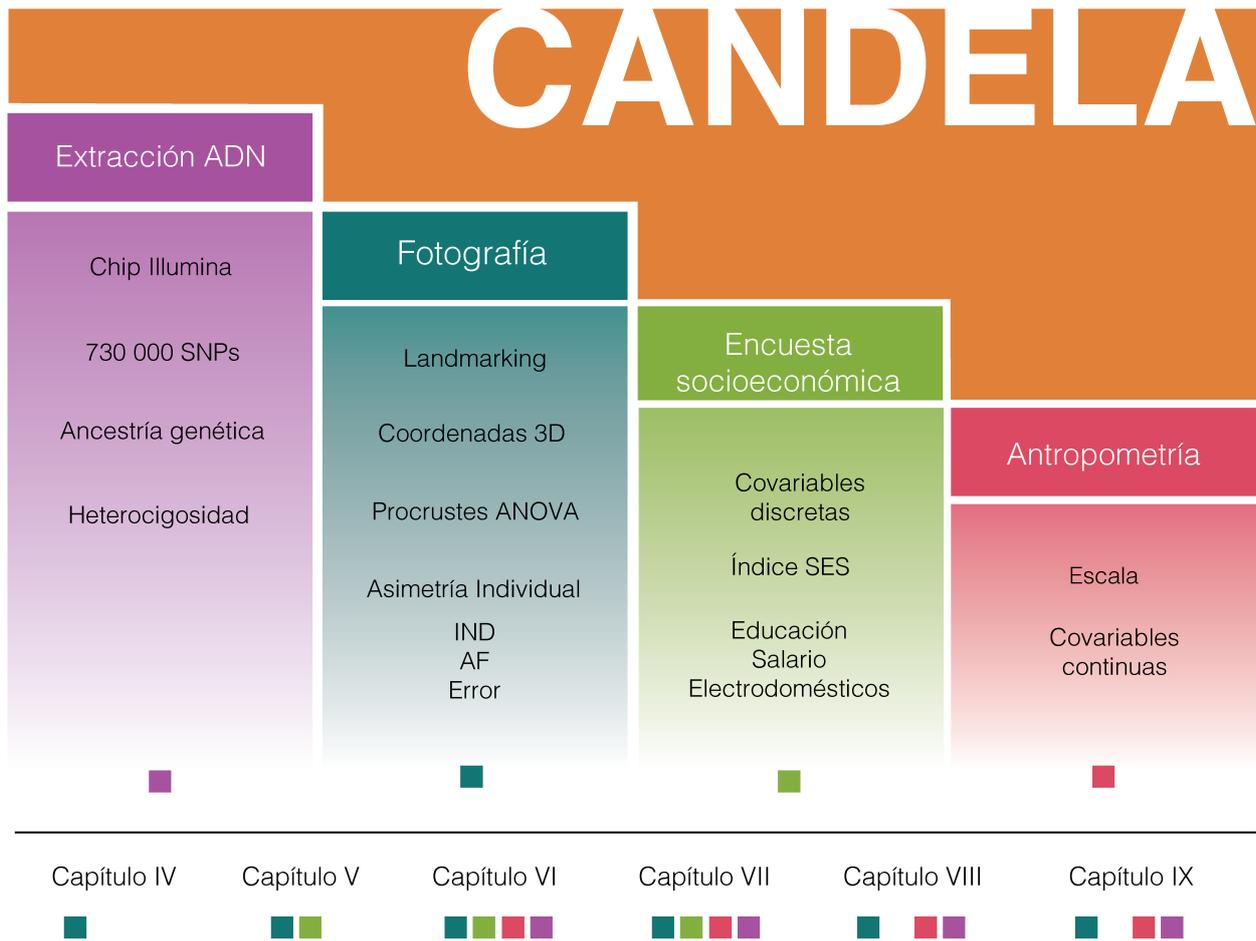


Figura 3.5 . Esquema general de la tesis. Relación de los datos de muestreo en CANDELA y su uso en los diversos capítulos de la tesis. De manera general se realizó una extracción de DNA, fotografías, encuestas socioeconómicas y antropometría. Los colores indican que dicho dato fue empleado en el capítulo respectivo.

Aspectos sobre la estimación genómica de la ancestría

En cada individuo, se tomó una muestra de sangre, para la extracción de ADN que se realizó siguiendo los procedimientos estándar de laboratorio (detalles del protocolo de extracción en el Anexo 3). Sobre estas muestras, se obtuvieron datos genómicos en el orden de los 730.525 SNPs (ver más detalles en Ruiz-Linares et al., 2014). Todos los SNPs utilizados, fueron sometidos a un análisis de equilibrio de ligamiento y después de eliminar la correlación, 90.000 SNPs fueron válidos para el análisis. La estimación de ancestría se realizó con estos SNPs. La heterocigosidad promedio de todo el genoma (*Genome-wide average heterozygosity*) se estimó a partir de estos datos utilizando Plink (Purcell et al., 2007; Yang et al., 2011).

La heterocigosidad se calcula como $1 - \text{homocigosidad}$, mientras que la homocigosidad se estima utilizando el coeficiente de endogamia como el promedio de alelos homocigotos a través de todos los SNPs para un individuo en comparación con el grupo global. Utilizando los datos de SNPs, se calculó la relación de a pares de todos los individuos para construir la matriz de relación genética (*genetic relatedness matrix*), donde la relación se define como la presencia de alelos compartidos entre dos individuos en comparación con el grupo global, a través de un promedio de todos los SNPs (ver Anexo 4).

Reproducibilidad, repetibilidad y
error intra-interobservadores

Introducción

La observación fundamental de la biología es la morfología (MacLeod, 2002). En años recientes el estudio morfológico ha sido encabezado por la morfometría, que se encarga de la cuantificación de las formas biológicas. Dicho proceso conlleva una técnica de medición, misma que impone una limitación práctica a lo que puede estudiarse: la capacidad del observador de realizar mediciones precisas, es decir, su error de registro (Cramon-Taubadel et al., 2007). El error es una constante en los estudios de caracteres morfométricos (Yezerinac et al., 1992; Arnqvist y Martensson, 1998; Zelditch et al., 2004) e igualmente lo es para las estimaciones de asimetrías (Palmer y Strobeck, 1986; Merilä y Björklund, 1995; Björklund y Merilä, 1997). Por lo tanto, esta tesis asume varios supuestos generales:

- 1) el resultado de una medición es sólo una aproximación o estimación del valor de la cantidad específica sometida a medición, es decir, magnitudes de medición, y por lo tanto el resultado es completo sólo cuando se acompaña de una evaluación cuantitativa de su incertidumbre (Taylor y Kuyatt, 2009).
- 2) la sofisticación de los instrumentos de medición no implica la eliminación de error en las mediciones, por el contrario el error siempre se encontrará presente y reducirlo es un elemento importante del *quehacer* morfométrico (Arnqvist y Martensson, 1998).
- 3) se ha constatado que los protocolos utilizados por la morfometría geométrica presentan menos problemas con el error respecto de los empleados por la morfometría tradicional (Arnqvist y Martensson, 1998). Luego entonces, la práctica morfogeométrica deberá estar orientada a amortiguar el error de medición (EM) mediante protocolos robustos de medición, pericia del investigador y correcta implementación de modelos estadísticos.

A continuación se presentan las evidencias teóricas y metodológicas que esta tesis ha seguido para reducir el EM a valores despreciables.

Error de medición (EM), repetibilidad y reproducibilidad en estudios de asimetría

El EM ha sido definido como el porcentaje de la variación fenotípica atribuible al error de medida (Merilä y Björklund, 1995). Sin embargo esta definición no es correcta, ya que si dicha variación es atribuible a un factor ajeno a la variación biológica, entonces es un factor extrínseco o no inherente a ella (Cramon-Taubadel et al., 2007). Una definición más aceptada es que el EM “*es la desviación del resultado en una medición al valor verdadero de ésta*” (Merilä y Björklund, 1995). Básicamente se busca que la precisión, que es la dispersión del conjunto de valores obtenidos de mediciones repetidas de una magnitud, y la exactitud, que es cuán cerca del valor real se encuentra el valor medido (Figura 4.1) dentro del proceso de digitalización y *landmarking*

se distribuyan cercanos a cero y bajo diversos criterios: entre observadores, dentro de observadores y entre diferentes métodos. Según Taylor y Kuyatt, (2009) en las *Guidelines for Evaluating and Expressing the Uncertainty of NIST Measurement Results* la incertidumbre de un resultado de un grupo de medidas se agrupan en dos categorías de acuerdo al método usado para estimar sus valores numéricos:

- a) Aquellos que son evaluados por métodos estadísticos
- b) Aquellos que son evaluados por otros medios.

La evaluación correcta del error de medición debe incluir ambos enfoques. Dentro del tipo a), Taylor y Kuyatt, (2009) recomiendan el uso de estadísticas como ANOVA o correlaciones en la resolución de éstos efectos. La evaluación de los factores b) están orientados a un juicio científico sobre: i) datos de medidas previas, ii) experiencia o conocimiento general del comportamiento y propiedades de los materiales e instrumentos, iii) especificaciones o recomendaciones de fabricantes, iv) datos proveídos en la calibración y otros reportes disponibles y v) incertidumbres asignadas para hacer referencia a los datos tomados de manuales.

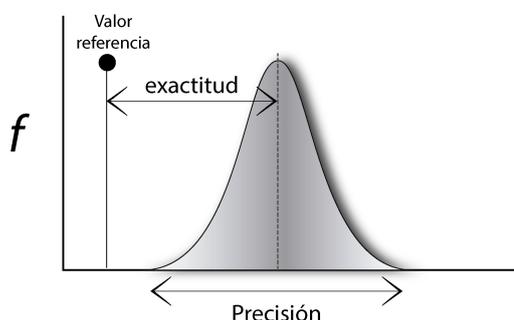


Figura 4.1 Relación de la precisión y exactitud en la medición morfométrica, aplicable al posicionamiento de landmarks 3D. Frecuencia en eje y.

Con el surgimiento del estudio de asimetrías también aumentó el énfasis en la caracterización del EM como una posible fuente de mala interpretación de resultados (Figura 4.2). Muchos autores reconocen que el EM, es uno de los aspectos más importantes a reducir en los estudios de asimetrías (Greene, 1984; Palmer y Strobeck, 1986; Swaddle et al., 1994; Fields et al., 1995; Merilä y Björklund, 1995). Como cita Palmer, (1996):

“(...) las desviaciones de la simetría son tan pequeñas que pueden ser típicamente similares en magnitud al EM (...)”.

Se ha establecido que el EM comúnmente contribuye en un alto porcentaje a la variación total entre lados (Fields et al., 1995; Van Dongen y Lens, 2000), siempre reduciendo la correlación entre los valores observables de asimetría fluctuante (AF) y por ende de la inestabilidad del desarrollo (ID). Palmer y Strobeck, (2003) establecen que el EM y el error de muestreo son los factores más importantes por lo que las asimetrías siguen siendo un pobre indicador de ID; por ello, agregan los autores, es necesario la caracterización de la significación relativa de los valores de AF respecto del EM. Dentro de los reportes de error en estudios de asimetrías se establecen rangos de entre el 10% y el 76% de error en las muestras (Palmer y

Strobeck, 1986). Debido a esto, Merila and Bjorklund, (1995) se preguntan si posiblemente muchas de las estimaciones publicadas de AF son meros errores al azar en las mediciones y no la descripción de un fenómeno biológico. Por estos planteamientos teórico-metodológicos, la construcción de un modelo del estudio del error es trascendental en los estudios de morfometría geométrica y, concretamente, de asimetrías.

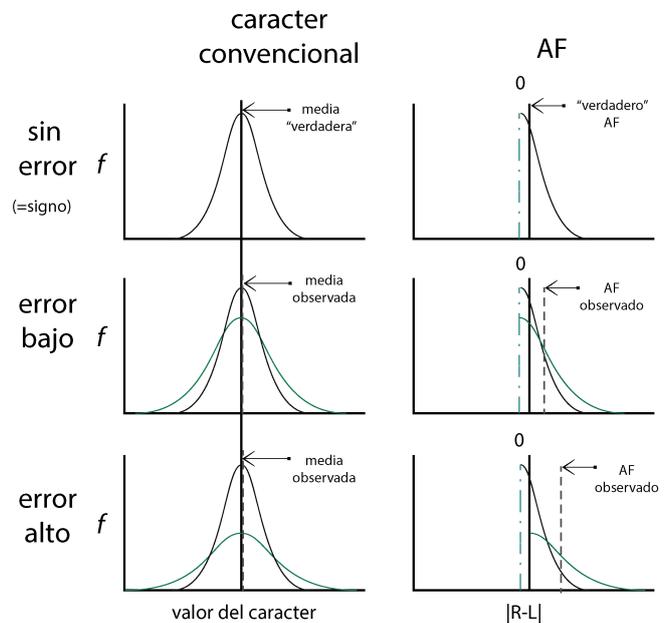


Figura 4.2. Efecto del error sobre los valores de asimetría fluctuante según (Palmer y Strobeck, 1986). R= derecho, L=izquierdo, f=frecuencia

Matemáticamente, las desviaciones de la simetría y el EM son indistinguibles ya que ambos son aleatorios, independientes y normalmente distribuidos sobre una media cero (Palmer y Strobeck, 1986; Palmer, 1994). Palmer y Strobeck (2003) recomiendan que cuando múltiples caracteres serán medidos, un ANOVA provee un poderoso método para probar la heterogeneidad de la ID entre individuos; y para el caso multivariado el método de Procrustes ANOVA (Klingenberg y McIntyre, 1998a). Además, algunos estudios reportan: 1) que la magnitud de la AF se incrementa con el tamaño del carácter, 2) que siempre deberá ser menor que el EM y 3) que la repetibilidad de los caracteres es inversamente proporcional al EM (Bechshøft et al., 2008). La ventaja del método de Procrustes ANOVA es que incluye una comparación entre el estimador de tamaño y la asimetría direccional (AD) y fluctuante (AF), es decir, integra los requerimientos desglosados por Bechshøft et al., (2008).

Asimismo, en el caso de números muestrales grandes, como el caso de esta tesis, replicar mediciones no siempre es lo óptimo (Palmer y Strobeck, 1986), pues la digitalización de 3000 individuos, por ejemplo, podría introducir una fuente de error de medición adicional: el cansancio. En algunos índices de asimetría utilizados, la réplica de mediciones en todos los caracteres e individuos puede no ser necesaria; en estas circunstancias basta con repetir las mediciones en una submuestra de individuos (Palmer y Strobeck, 2003). Bajo esta idea, esta tesis estudio el EM sobre una re-digitalización de 200 individuos.

Finalmente, algunas comparaciones de métodos de medición morfométrica manual y digital, muestran que estos últimos presentan mayor precisión y están menormente influenciados por factores que aumentan el EM (Muñoz-Muñoz y Perpiñán, 2010; Muñoz-Muñoz et al., 2011), y mejor aun cuando éstos son realizados en CTscans (Richtsmeier et al., 1995a), por lo que la

morfometría geométrica, implementando el método de Procrustes ANOVA, deberá presentar un menor umbral al EM, menor al 2% que se establece como umbral clásico y aceptado en morfometría (Richtsmeier et al., 1995a; Singleton, 2002).

Modelo general del error de medición (EM)

A continuación se presenta el modelo teórico que para la evaluación del error aplicó esta tesis. Arnqvist y Martensson, (1998) sintetizan, siguiendo a Rabinovich (1994), los factores de EM en la datos de *landmarks* como:

$$EM (\zeta) = \zeta_m + \zeta_i + \zeta_n \quad (1)$$

Donde, ζ_m es el error metodológico, ζ_i el error del instrumento y ζ_n el error personal. Como se observa en el modelo, cada componente es aditivo y se subdivide como sigue (Figura 4.3): el error metodológico en preparación del espécimen, reducción dimensional (coplanaridad) y preparado de datos; el error instrumental en distorsión óptica cuando se captura el individuo, distorsión óptica al reproducir el individuo, distorsión digital en la captura y reproducción del individuo; finalmente el error personal, que es el error cometido por el o los observadores en un banco de datos (Arnqvist y Martensson, 1998). Las formas para minimizar la contribución del EM en la muestra son diversas, sin embargo algunas pautas generales ayudan a resolver el problema. Una ruta comúnmente empleada es que los paso, procesos, tratamientos, estandarizaciones y correcciones desde el individuo original a los datos morfogeométricos deberán ser los menos posibles (Arnqvist y Martensson, 1998). Luego entonces, el protocolo utilizado en esta tesis intentó seguir esta línea de requerimiento.

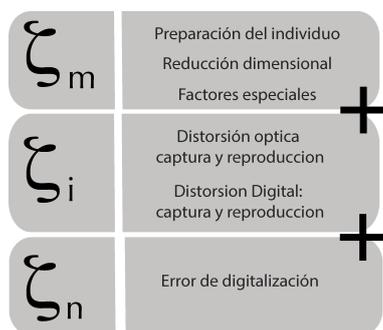


Figura 4.3 Modelo aditivo de los factores del error de medición para estudios de morfometría geométrica basado en Arnqvist y Martensson (1998).

Repetibilidad y reproducibilidad: conceptos.

La repetibilidad es la cercanía entre los resultados de mediciones sucesivas de la misma magnitud por medir, efectuadas en las mismas condiciones de medición (Figura 4.4a). Las condiciones de repetibilidad incluyen: un mismo procedimiento de medición, el mismo observador, el mismo instrumento de medición utilizado en las condiciones y un mismo lugar y repetición dentro de un periodo de tiempo corto (Llamosa et al., 2007). Según la IUPAC, (1997) la repetibilidad es:

“the closeness of agreement between independent results obtained with the same method on identical test material, under the same conditions (same operator, same apparatus, same laboratory and after short intervals of time)”

La reproducibilidad es la cercanía entre los resultados de las mediciones de la misma magnitud por medir, efectuada bajo mediciones diferentes (Figura 4.4b) como pueden ser: el principio de medición, el método de medición, el observador, el instrumento de medición, el patrón de referencia, el lugar y las condiciones de uso y el tiempo (Llamosa et al., 2007).

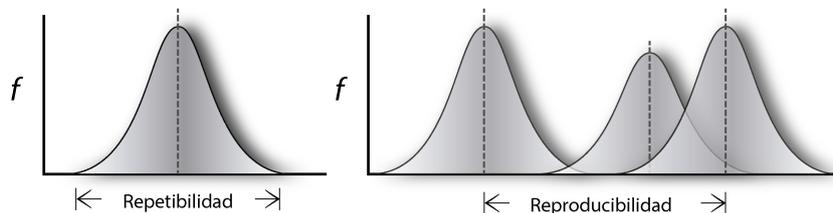


Figura 4.4. Diferencia gráfica de los conceptos de repetibilidad y reproducibilidad en los estudios morfométricos. a) repetibilidad y b) reproducibilidad.

Así, estadísticamente (siguiendo las definiciones de Rohlf, (2003), un estimador fenotípico será insesgado cuando para todos los valores de la muestra, el valor esperado de la estimación (el valor medio de la estimación) es igual al valor verdadero del parámetro, esto es:

$$E(\hat{q}) = q \quad (2)$$

Donde \hat{q} es una estimación del parámetro q (Rohlf, 2003). De lo contrario, se dice que el estimador está sesgado. El desvío o error, entonces, es la diferencia de:

$$E(\hat{q}) - q \quad (3)$$

La magnitud promedio de error a menudo se mide como el error cuadrático medio, MSE (por su significado en inglés, *mean square error*), el promedio de la desviación al cuadrado de una estimación de su valor real:

$$MSE_{\hat{q}} = E(\hat{q} - q)^2 = s^2 + (E(\hat{q}) - q)^2 \quad (4)$$

Este estadístico proporciona una medida de la exactitud en lugar de sólo la precisión, ya que es una función de la proximidad de las estimaciones a la media real en lugar de la media de la muestra (Rohlf, 2003).

El objetivo general de este capítulo es determinar el grado de reproducibilidad, repetibilidad y EM en la digitalización de la cara humana por medio de fotogrametría y morfometría geométrica. La hipótesis a trabajar es que se espera que la digitalización de la cara sea reproducible entre técnicas, es decir que los estimadores de reproducibilidad, repetibilidad y error inter e intra observador sean insesgados ($E(\hat{q}) = q$), dentro de los estándares establecidos para la morfometría (Richtsmeier et al., 1995b; Singleton, 2002). Este análisis previo es clave, pues uno de los fenómenos biológicos a estudiar, la asimetría fluctuante, es sensible a la problemática del error de medición, como se ha explicado arriba.

Método

Pruebas de reproducibilidad, repetibilidad y EM

Debido a todos los factores expuestos anteriormente, se generó una serie de análisis para poder evaluar si el EM era despreciable en el estudio, y si por lo tanto los valores de asimetría que se presentan son plenamente confiables. Se siguieron varios modelos analíticos para los mismos, principalmente enfocados en conocer la reproductibilidad, repetibilidad y caracterización del EM en los datos generados por el proyecto CANDELA. A continuación se describen detalladamente, los experimentos orientados a evaluar la repetibilidad y reproductibilidad de la reconstrucción fotogramétrica en la configuración de los *landmarks* faciales 3D y la caracterización del EM entre y dentro de observadores.

1) Reproducibilidad de digitalización de la cara humana: fotogramétrica (PhotoModeler) y directa (MicroScribe)

Una de las primeras preguntas formuladas fue si la técnica de fotogrametría constituía una forma confiable y robusta de capturar la forma de la cara. En respuesta se realizó una comparación del método de reconstrucción fotogramétrica contra una digitalización directa, en éste caso, empleando un brazo MicroScribe G2X (Figura 4.5). El objetivo particular es determinar y caracterizar la reproducibilidad de la fotogrametría para un objeto 3D, como la cara o el cráneo. La hipótesis es que la reproducibilidad deberá ser aceptable ya que el programa utilizado asegura que, siguiendo sus recomendaciones protocolarias, el margen de error es ínfimo (ver Sujetos, materiales y método). A continuación se describen los objetivos, hipótesis y métodos de una secuencia de experimentos encaminados a resolver la pregunta central, antes planteada.



Figura 4.5. MicroScribe empleado en la digitalización de *landmarks*.

Experimento 1: reproducibilidad de la digitalización en cráneos humanos explorando las diferencias entre ajustes de simetría

Se utilizó un protocolo de 24 *landmarks* faciales (Figura 4.3, Sujetos, materiales y métodos) para realizar la reconstrucción de seis cráneos humanos (3 femeninos, 3 masculinos) por medio de un brazo digitalizador MicroScribe G2X y mediante la reconstrucción 3D por medio del programa PhotoModeler con cinco fotografías (similares a las utilizadas en el protocolo CANDELA para la reconstrucción de la cara). El experimento (Figura 4.6a), consistió en comparar los valores de asimetrías faciales y el ajuste general de ambas técnicas de digitalización. Se espera que no existan diferencias significativas entre dichas técnicas cuando

una prueba PROTEST y Procrustes ANOVA sean aplicadas. Además se espera que no exista diferencia estadística entre los ajustes de *object* y *matching symmetry*.

La prueba PROTEST (Peres-Neto et al., 2005) permite conocer la asociación de reproducibilidad entre las dos técnicas de digitalización teniendo como referencia que no deberían existir diferencias significativas y que la asociación debería ser muy grande. La prueba se realizó sobre los componentes principales obtenidos del cada tipo de ajuste. En el caso del Procrustes ANOVA, éste da cuenta de la variación y significación de los efectos individual, asimetría direccional (AD) (reflexión por lado en el caso de *object symmetry* y superposición de lados en *matching symmetry*) y la asimetría fluctuante (para más detalles sobre los tipos de ajustes ver Capítulo V).

Experimento 2: reproducibilidad de las técnicas de digitalización en caras humanas: modelo abierto

La reproducibilidad en caras humanas se evaluó comparando los datos obtenidos de la digitalización de 34 *landmarks* del protocolo CANDELA en la cara de 10 voluntarios en las dos técnicas fotogrametría (fotografías adquiridas bajo el protocolo fotográfico CANDELA, ver detalle en Capítulo III) y MicroScribe G2X. Cada digitalización, para ambas técnicas, se realizó dos veces con el fin de valorar esta iteración como un indicador de error intra-técnica. El experimento consistió en comparar entre técnicas, la visualización de los cambios en el componente asimétrico y varianza total mediante un análisis de componentes principales (PCA), el análisis de los mínimos cuadrados resultantes del Procrustes ANOVA, la comparación de los valores de asimetría fluctuante facial (vAF) por medio pruebas F y el análisis de la función discriminante (DFA) entre técnicas para toda la cara (Figura 4.6b).

Experimento 3: reproducibilidad de las técnicas de digitalización en caras humanas: modelo restringido

La prueba siguiente consistió en la digitalización de un modelo fijo de rostro humano (maniquí, Figura 4.4, Sujetos, materiales y métodos) con MicroScribe G2X y PhotoModeler con el set de *landmarks* del protocolo CANDELA (Tabla b.2, Sujetos, materiales y método). Se utilizaron unas referencias (12 círculos de papel adhesivo con un punto en el centro de cada etiqueta) en aquellos puntos conflictivos en su digitalización reduciendo así su error y evaluando únicamente el efecto de la variabilidad entre técnicas (reproducibilidad). El modelo de cara (maniquí) se fijó a una mesa con cinta comercial para evitar su movimiento durante la digitalización con el brazo mecánico. Las digitalizaciones fueron realizadas de manera independiente durante dos semanas (iteración 1 y 2). El objetivo era determinar si en un modelo restringido (maniquí) los valores de los indicadores descritos en el experimento 2 cambiaban o eran persistentes; además, de aportar una estima de reproducibilidad que sea independiente a la variación por percepción del observador (modelo restringido), donde se incluyen únicamente los puntos bilaterales con pegatinas. La hipótesis es que no habrá diferencias entre las técnicas de digitalización y que las pruebas de este experimento y el anterior serán las mismas. Se realizó la misma batería de análisis que el pasado experimento (Figura 4.6c), con algunas diferencias que se detallan. Los PCA se realizaron sobre toda la cara y cuatro módulos ojos, nariz, boca y orejas con la finalidad

de conocer la distribución de la repetibilidad en éste espacio multivariado. Los valores de cada PC, para toda la cara, fueron comparados para los componentes simétrico y asimétrico, por medio de un PROTEST únicamente en los *landmarks* que tenían etiquetas y que eran bilaterales (4 puntos bilaterales). El Procrustes ANOVA no fue calculado ya que el modelo no se ajustaba a los requerimientos del modelo general; en cambio se generó una correlación de matrices de varianza-covarianza del componente asimétrico (ver arriba).

Experimento 4: correlación de los valores de asimetría fluctuante por técnica modelo abierto y restringido

Se evaluó el grado de dependencia lineal simple de los valores de AF obtenidos de las digitalizaciones realizadas por el MicroScribe y PhotoModeler en el modelo real (Experimento 2; Figura 4.6d), comparados mediante una regresión simple. El objetivo es conocer el grado reproducibilidad de los datos base de esta tesis. Se espera que la reproducibilidad de los datos sea significativa y con un ajuste de más del 90%.

Experimento 5: correlación de las distancias chelion-chelion directas y estimadas.

Como punto final, se evaluó el grado de dependencia lineal simple entre los valores de las distancias chelion–chelion generadas por el PhotoModeler y aquellas que se tomaron durante la toma antropométrica de los datos CANDELA (Figura 4.6e). El objetivo es determinar si existe una correlación entre los datos directos y aquellos estimados por el algoritmo de fotogrametría, bajo la hipótesis de que existirá una alta correlación (+80%) entre éstas y que su ajuste será elevado.

2) Repetibilidad de la técnica fotogramétrica por *landmarks*

La segunda pregunta planteada era si existía una repetibilidad de la fotogrametría. Para ello se realizaron experimentos con el objetivo particular de determinarla y caracterizarla dentro de la fotogrametría para la cara y un objeto 3D (modelo restringido o maniquí). La hipótesis es que, al igual que la reproducibilidad, deberá ser aceptable ya que el programa utilizado está diseñado para fotografías de rango corto. Establecidas las normas operativas básicas, el margen de error es ínfimo (ver Capítulo III). A continuación se describen los experimentos encaminados a resolver la pregunta central.

Experimento 6: varianza multidimensional por *landmarks*

Se realizó una evaluación de la varianza multidimensional (3D) de los 34 *landmarks* utilizados en el proyecto CANDELA. Se empleó el cálculo de *convex hull* (Barber et al., 1996) en *Python* para la obtención de dicho indicador por cada *landmark* digitalizado en PhotoModeler. Para éste experimento se realizaron dos series de 15 digitalizaciones sobre el maniquí utilizado

en el experimento 3. En primera instancia, se espera que aquellos *landmarks* señalizados *a priori* presenten menor varianza que aquellas que no tenían marcado (pegatinas) y que las regiones problemáticas presenten una distribución de varianza fuera del rango medio a toda la configuración de puntos. Además, se espera que no existan diferencias entre las dos iteraciones realizadas. Lo anterior representa una medida de repetibilidad del PhotoModeler estimada por medio de la regresión y diferencias de medias (ANOVA) de ambas iteraciones (Figura 4.7a). Además, se evaluará la reproducibilidad de la digitalización del PhotoModeler, con los datos generados en dos iteraciones independientes de 15 repeticiones cada una. De esta manera, siguiendo el protocolo de Singleton, (2002) se calculó un ANOVA de una vía por cada *landmark* y cada iteración; los valores del error cuadrático medio fueron analizados como un indicador del error intra-observador (Sokal y Rohlf, 1995). El error intraobservador no ha de exceder 0.33 mm o 2%, mientras que las medidas más imprecisas no deben exceder el 5% de error (Singleton, 2002).

Finalmente, se calcularon, sobre la base de datos de 200 individuos repetidos de CANDELA, los valores cuadráticos medios (*mean square*, MS) resultantes del Procrustes ANOVA, como un indicador de varianza por módulo (toda la cara, ojos, nariz, boca y orejas). El objetivo es conocer el grado de fluctuación en la varianza en cada subconjunto de puntos faciales. La hipótesis es que las regiones más alejadas del plano medio frontal tengan mayor cantidad de varianza, además de aquellos *landmarks* tipo 2, según la definición de (Bookstein, 1997). Así, se calcularon los valores de variación (MS) individual, asimetría direccional, fluctuante y error; para toda la cara, cara sin orejas, ojos, nariz, boca y orejas (Figura 4.7b).

3) Prueba de error de medición (EM) entre observadores e intra observador.

Experimento 7: el EM inter-intra observadores

Para analizar el error inter observador en la toma de datos (*landmarking*), se generaron múltiples digitalizaciones (Observador 1L=Lucia Castillo y Observador 2M=Mirsha Quinto-Sánchez) del protocolo de 34 *landmarks* de CANDELA (Figura 4.3, Sujetos, materiales y método) en un individuo (ZBR0064) del sexo masculino durante cuatro sesiones separadas (tomas independientes). Los observadores 1 y 2 tuvieron una revisión del protocolo en la iteración tres, cuando fueron discutidas las posiciones de los puntos. El análisis llevó tres vertientes: la exploración por técnicas multivariantes de la covariación de los datos por medio de la implementación del análisis de componentes principales (PCA), el cálculo de estadísticos univariados de contraste de varianza (ANOVA, Singleton, 2000), y la estimación de la reclasificación de una serie de individuos tomados al azar de la muestra de repeticiones del observador 1 y 2 (Figura c.7b)

El individuo elegido para el análisis tenía características que se consideran generales para la muestra, en cuanto al protocolo fotográfico. Ello implica que presentaba poca profundidad de campo, variantes en la iluminación de la toma, y puntos de foco diferentes. Asimismo, en un paso previo, se digitalizó a cinco individuos para conocer cuál de éstos presentaba una varianza media entre digitalizaciones, resultando ser el individuo ZBR064. De

esta manera, se considera que su elección incluía las generalidades de deficiencia del protocolo fotográfico (ver Capítulo III). La imagen se escaló en milímetros (mm) mediante la distancia conocida del diámetro chelion-chelion (ver Figura 4.2), medida utilizada para el experimento 5. La hipótesis es que no existirán diferencias estadísticas entre los observadores 1 y 2 (Figura 4.7b).

El análisis de reclasificación tuvo la finalidad de conocer cómo se comportaba la distancia euclidiana de una digitalización del observador 1 repetida por el 2. Se eligieron 25 individuos al azar de Brasil, Chile, Colombia y Perú; digitalizados por el observador 1. De éstos, se eligieron únicamente a cinco individuos que el observador 2 digitalizó. La hipótesis es que la media de las distancias euclidianas entre las digitalizaciones del mismo individuo del observador 1 y 2 deberá ser menor que el valor mínimo de las digitalizaciones del 1 y 2. Una vez ajustados los datos por el método de Procrustes (ver Capítulo I y Capítulo III) se exportaron las coordenadas transformadas y por medio de un *script Python* se calcularon las distancias euclidianas entre todos los individuos. Finalmente, con la matriz de distancias se calculó un análisis de conglomerado por medio del algoritmo UPGMA con 1000 permutaciones para conocer si las distancias inter-observadores se agrupaban más respecto de las intraobservadores (Figura 4.7b).

Adicionalmente, se reportan los valores de error generados en el Procrustes ANOVA utilizado a lo largo de toda la tesis. Mediante este análisis se podrá determinar la persistencia estadística de los valores de asimetría en la muestra. Se espera que los valores de cuadrados medios (indicador de varianza) sean menores en el caso del error (caracterizado como 200 repeticiones de digitalizaciones de individuos de la muestra CANDELA) según la propuesta de Klingenberg y McIntyre, (1998). Siguiendo a Palmer, (1994), si el patrón anterior se cumple, los valores de asimetría son un fenómeno biológico y no un efecto de error.

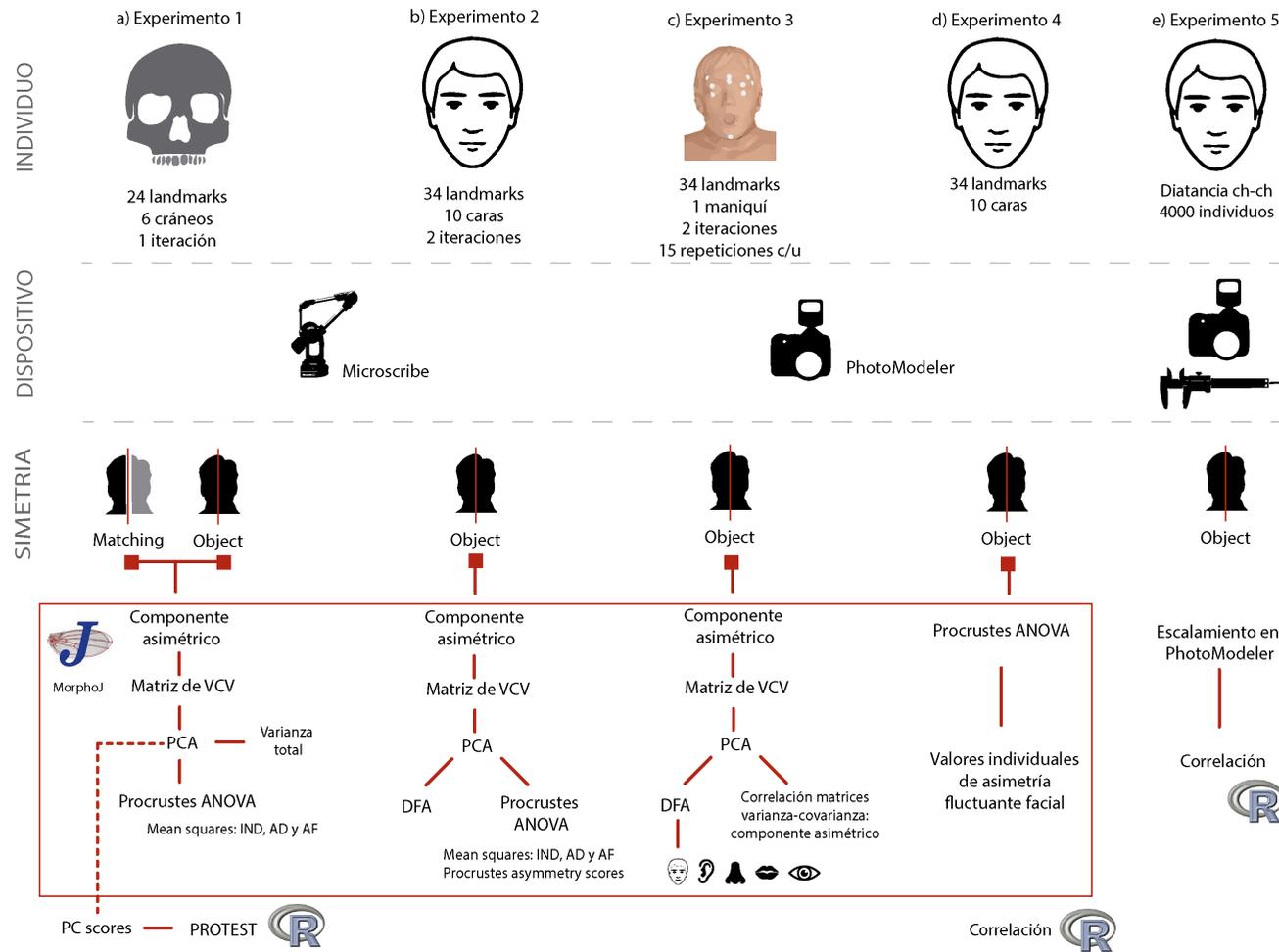


Figura 4.6. Esquema general del protocolo de reproducibilidad de la técnica fotogramétrica. Se muestran los cinco experimentos o diseños utilizados, sus datos iniciales, dispositivos, tipo de simetrías y análisis utilizados.

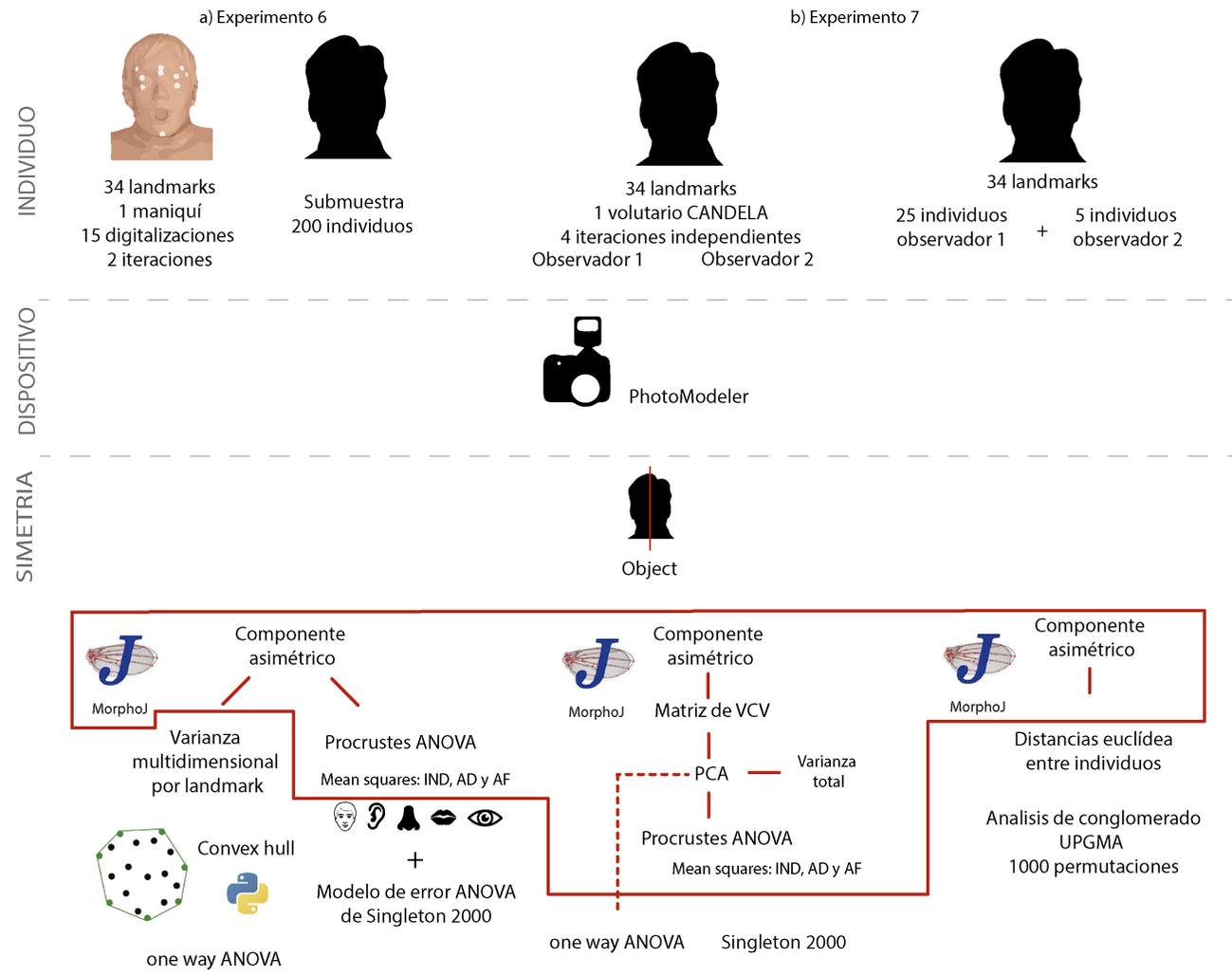


Figura 4.7. Esquema general del protocolo de repetibilidad y EM. Se muestran los cuatro experimentos o diseños utilizados, sus datos iniciales, dispositivos, tipo de simetrías y análisis utilizados.

Resultados

1) Reproducibilidad de digitalización de la cara humana: fotogramétrica y MicroScribe.

Experimento 1: reproducibilidad ajuste *object symmetry*.

Los resultados del Procrustes ANOVA (Tabla 4.1) muestran un patrón diferente de los valores mínimos cuadrados (MS) para los efectos de variación individual, lado y AF en ambas comparaciones. La varianza total de PhotoModeler fue 0.0008 y 0.0022 para MicroScribe. Los valores de MS para MicroScribe presentan un patrón más esperado, disminuyendo desde individual a AF. En PhotoModeler la distribución de la AF y AD son similares, sin embargo la AF tiene valores más altos. En el caso del MicroScribe las diferencias son marcadas con valores más bajos en PhotoModeler. La discrepancia entre las técnicas de manera global se significa más adelante.

Tabla 4.1 Resultados del Procrustes ANOVA intertécnica *object symmetry*.

Photomodeler: varianza total 0.00087615				
	MS	gl	F	p
Individual	8.03313E-05	272	2.84	<.0001
Lado	2.55302E-05	31	0.9	0.6185
AF	2.82631E-05	248		
MicroScribe: varianza total 0.00227265				
Individual	5.20986E-05	333	3.3	<.0001
Lado	3.18224E-05	34	2.01	0.0011
AF	1.58101E-05	306		

Tabla 4.2. Resultados del Procrustes ANOVA intertécnica *matching symmetry*.

Photomodeler: varianza total 0.0036505				
	MS	F		p
Individual	0.000230325	184	2.4	<.0001
Lado	8.82091E-05	23	0.92	0.5726
AF	9.59313E-05	184		
MicroScribe: varianza total 0.00304332				
Individual	0.000221525	184	4.84	<.0001
Lado	0.000110874	23	2.42	0.0006
AF	0.000045792	184		

Reproducibilidad: ajuste *matching symmetry*.

Lo resultados muestran que los valores de MS tienen un patrón similar que los resultados de la sección anterior (Tabla 4.2). Primero, los valores de efecto individuo, lado y AF muestran un patrón diferente de los valores mínimos cuadrados (MS). La varianza total para PhotoModeler y MicroScribe fue similar, con un valor de 0.003, mientras que en el caso de ajuste por *object symmetry* se obtiene siempre una mejor distribución de los datos en el MicroScribe. Los valores de MS para PhotoModeler presentan un patrón similar al anterior, presentando el siguiente orden de mayor a menor: individuo, AF y AD. En el caso del MicroScribe las diferencias son aún más marcadas, respecto del *object symmetry*; las diferencias se aproximan a 70 puntos de diferencia. La discrepancia entre las técnicas de manera global se significa más adelante.

Adicionalmente, la prueba PROTEST (Peres-Neto et al., 2005) mostró diferencias (Tabla 4.3) entre las técnicas cuando fue utilizado el ajuste por *object symmetry* ($p=0.54$), con una asociación de 0.87. En el caso del ajuste *matching symmetry* las técnicas no se diferencian estadísticamente ($p<0.001$), y una correlación de 0.84. Estos datos indican que no hay reproducibilidad de la técnica de digitalización cuando un ajuste de *object symmetry* es usada, únicamente para el caso de *matching symmetry*.

Tabla 4.3. Resultados PROTEST para las comparaciones MS-PM de *object* y *matching symmetry*.

MS-PM object symm	
Suma cuadrática de Procrustes	0.227
Correlación en la rotación simétrica de Procrustes	0.8792
Significación	0.52448*
MS-PM matching symm	
Suma cuadrática de Procrustes	0.2907
Correlación en la rotación simétrica de Procrustes	0.8422
Significación	0.000999*

Experimento 2: reproducibilidad de las técnicas de digitalización en caras humanas, modelo real.

El PCA del componente asimétrico de las digitalizaciones faciales por medio de fotogrametría (PhotoModeler) y técnica directa (MicroScribe) indica una menor varianza de los datos obtenidos por fotogrametría, no existiendo un claro patrón de diferenciación para los tres primeros componentes principales acumulando el 67.282 % de la varianza (Tabla 4.4 , Figura 4.8). Las varianzas totales para ambas configuraciones resultaron en 0.0014, en PhotoModeler 0.0003 y 0.0024 para MicroScribe. Los cambios asociados al PC1 están localizados en la estimación de la glabella (desplazamiento lateral), las orejas y los *landmarks* supraciliares.

Tabla 4.4 Restados del PCA para la reproducibilidad de digitalización PhotoModeler-MicroScribe

Microscribe				Photomodeler			
PC	Eigenvalores	% Varianza	% acumulado	PC	Eigenvalores	% Varianza	% acumulado
1	0.00121128	50.108	50.108	1	0.00008035	22.595	22.595
2	0.0004196	17.358	67.465	2	0.00006567	18.467	41.062
3	0.0001982	8.199	75.664	3	0.00004328	12.171	53.233
Total	0.00241736			Total	0.0003556		

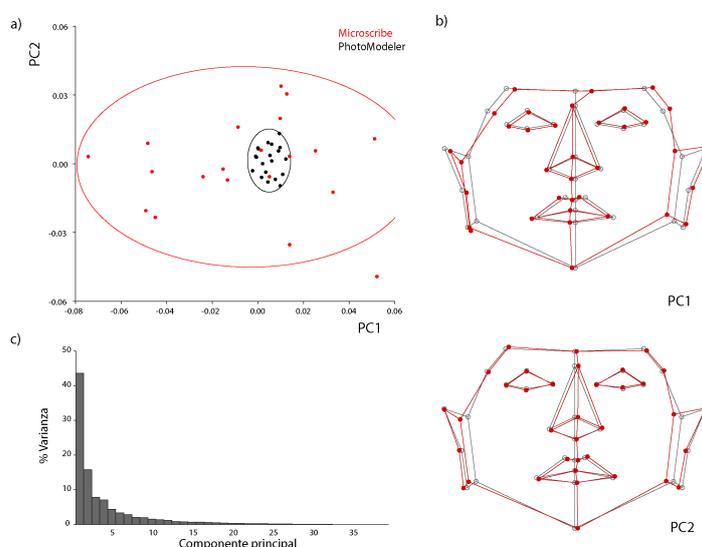


Figura 4.8. Caracterización de la reproducibilidad de digitalización de la cara. a) Gráfico de dispersión del PC1 y PC2. Se estiman los rangos de distribución de la variación al 99% (elipses) para MicroScribe (rojo) y PhotoModeler (gris). b) Cambios en la forma para el PC1 y PC2, se presenta la forma media en gris y el extremo positivo de la variación en el eje (rojo). d) Distribución de la varianza por cada PC.

Los resultados del Procrustes ANOVA muestran un patrón similar de varianza en los efectos individual, AD, AF y error (Tabla 4.5). El error en el PhotoModeler (0.0037) es menor que en MicroScribe (0.023) y es importante destacar que todos los efectos resultaron significativos ($p < 0.01$). Las correlaciones matriciales entre PhotoModeler y MicroScribe resultaron en una asociación significativa para la variación individual (0.59, $p < 0.001$), AF (0.27, $p < 0.001$) y los errores (0.22, $p < 0.003$). El análisis de los valores de AF (*scores* de Mahalanobis) muestra que existen diferencias estadísticas entre su estimación por técnica ($ss=0.003$, $ms=0.003$, $f=52.55$, $p < 0.001$) y no hay una dependencia lineal en los datos ($r^2 = 0.012$, $p = 0.75$). Finalmente, el DFA mostró que la reproducibilidad entre técnicas es baja ya que aunque las diferencias por medias no son significativas en primera instancia (distancia entre medias=0.016, $t^2=588.05$, $p=0.87$) a las 1000 permutaciones el valor se significa (distancia=0.064, $p < 0.001$), reclasificándose mucho mejor el PhotoModeler (3 de 20) que el MicroScribe (6 de 20).

Tabla 4.5 Resultados del Procrustes ANOVA para la reproducibilidad de digitalización PhotoModeler-MicroScribe

PhotoModeler					
Efecto	SS	MS	df	F	p
Individual	0.0376143	7.73957E-05	486	6.25	<.0001
AD	0.00159938	3.40293E-05	47	2.75	<.0001
AF	0.00523544	1.23769E-05	423	3.3	<.0001
Error	1	0.00378501	3.7475E-06	1010	
Microscribe					
Individual	0.06432913	0.000132365	486	1.59	<.0001
AD	0.00659294	0.000140275	47	1.68	0.0045
AF	0.03529372	8.34367E-05	423	3.54	<.0001
Error	1	0.02377633	2.35409E-05	1010	

Experimento 3: reproducibilidad de técnicas sobre un modelo fijo de cara humana (maniquí).

El PCA generado sobre la matriz de varianza-covarianza del componente asimétrico indica que existe una diferenciación clara de las digitalizaciones realizadas por medio de fotogrametría (PhotoModeler) y técnica directa (MicroScribe). Los valores de varianza total para ambas técnicas fueron 0.0020, 0.00013 en PhotoModeler y 0.00007 en MicroScribe. Tan solo el PC1 tiene un 56.9% de varianza explicada, y es el eje que divide a las técnicas (Tabla 4.6 , Figura 4.9). La correlación entre la matriz de varianza-covarianza del componente asimétrico resultó en 0.3959 significativa ($p < 0.0001$). Los PCA realizados sobre los módulos faciales demuestran que las diferencias entre la reproducibilidad están concentradas en orejas y ojos, principalmente, y no así, en boca y nariz (Figura 4.10), es decir que existe una mayor reproducibilidad mientras más cercano se esté de la línea media o sagital.

Tabla 4.6. Resultados del PCA para la reproducibilidad de digitalización PhotoModeler-MicroScribe modelo fijo

PC	Eigenvalores	% varianza	% acumulado
1	0.0001147	56.906	56.906
2	0.00002186	10.844	67.751
3	0.00001493	7.405	75.156
..			
Total	0.00020157		

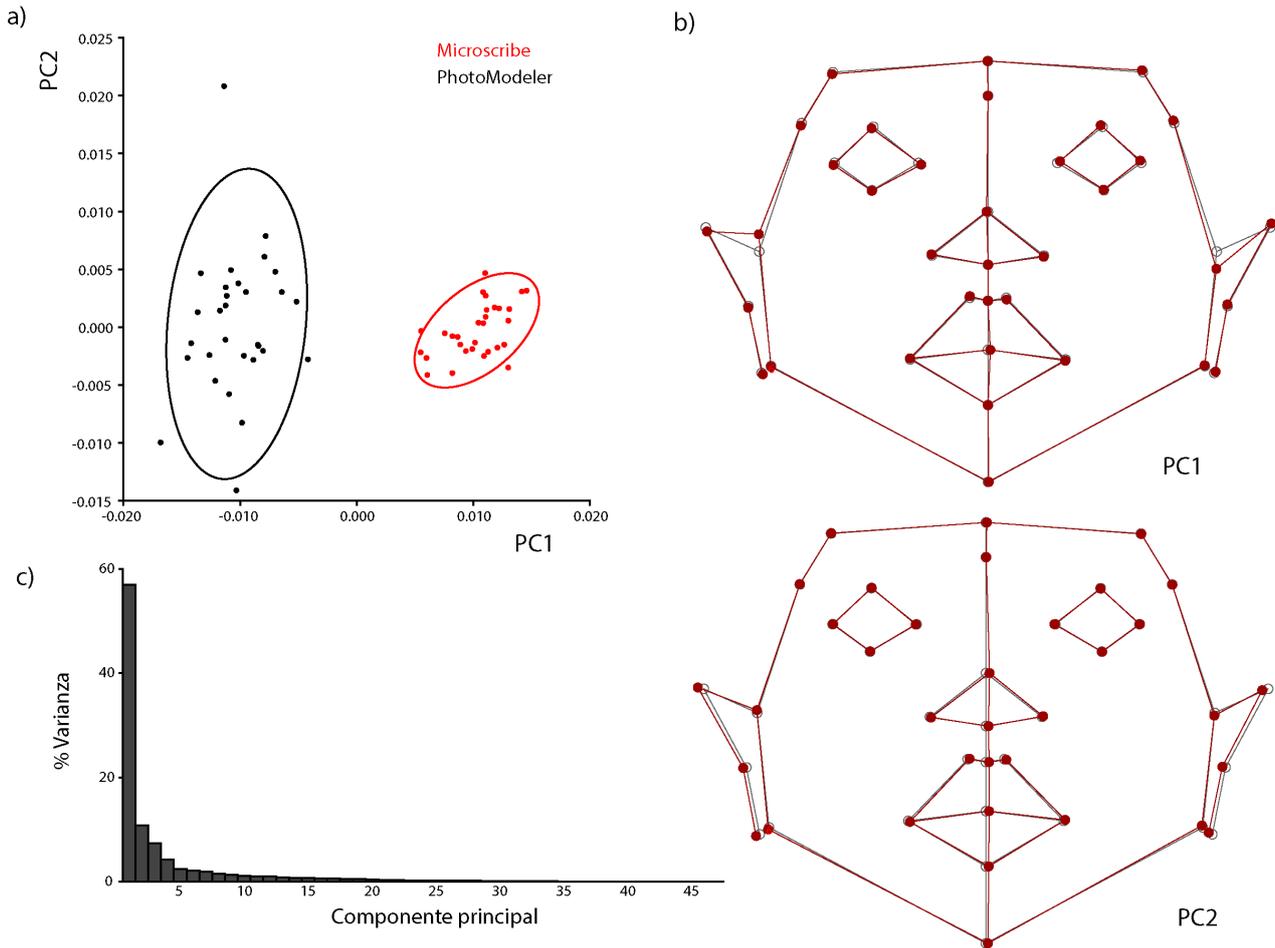


Figura 4.9. Análisis de Componentes Principales (PCA) para caracterizar la reproducibilidad de la técnica de digitalización de la cara de acuerdo a un modelo fijo (maniquí). a) Gráfico de dispersión del PC1 y PC2. Se estiman los rangos de distribución de la variación al 99% (elipses) para MicroScribe (rojo) y PhotoModeler (negro). b) Cambios en la forma para el PC1 y PC2. Se presenta la forma media (average shape) en gris y el extremo positivo de la variación en el eje (rojo). d) Distribución de la varianza por cada PC.

En contraste, la prueba PROTEST realizada sobre los valores de PC del componente simétrico y asimétrico, considerando únicamente los cuatro puntos bilaterales con etiquetas (modelo restringido estricto) muestran una baja reproducibilidad de la técnica (Tabla 4.7).

MS-PM componente asimétrico	
Suma cuadrática de Procrustes	0.7542
Correlación en la rotación simétrica de Procrustes	0.4958
Significación	0.24575
MS-PM componente simétrico	
Suma cuadrática de Procrustes	0.7744
Correlación en la rotación simétrica de Procrustes	0.4749
Significación	0.18082

Tabla 4.7 Resultados PROTEST para el modelo restringido estricto (cuatro puntos laterales). Se muestran los resultados para el componente simétrico y asimétrico.

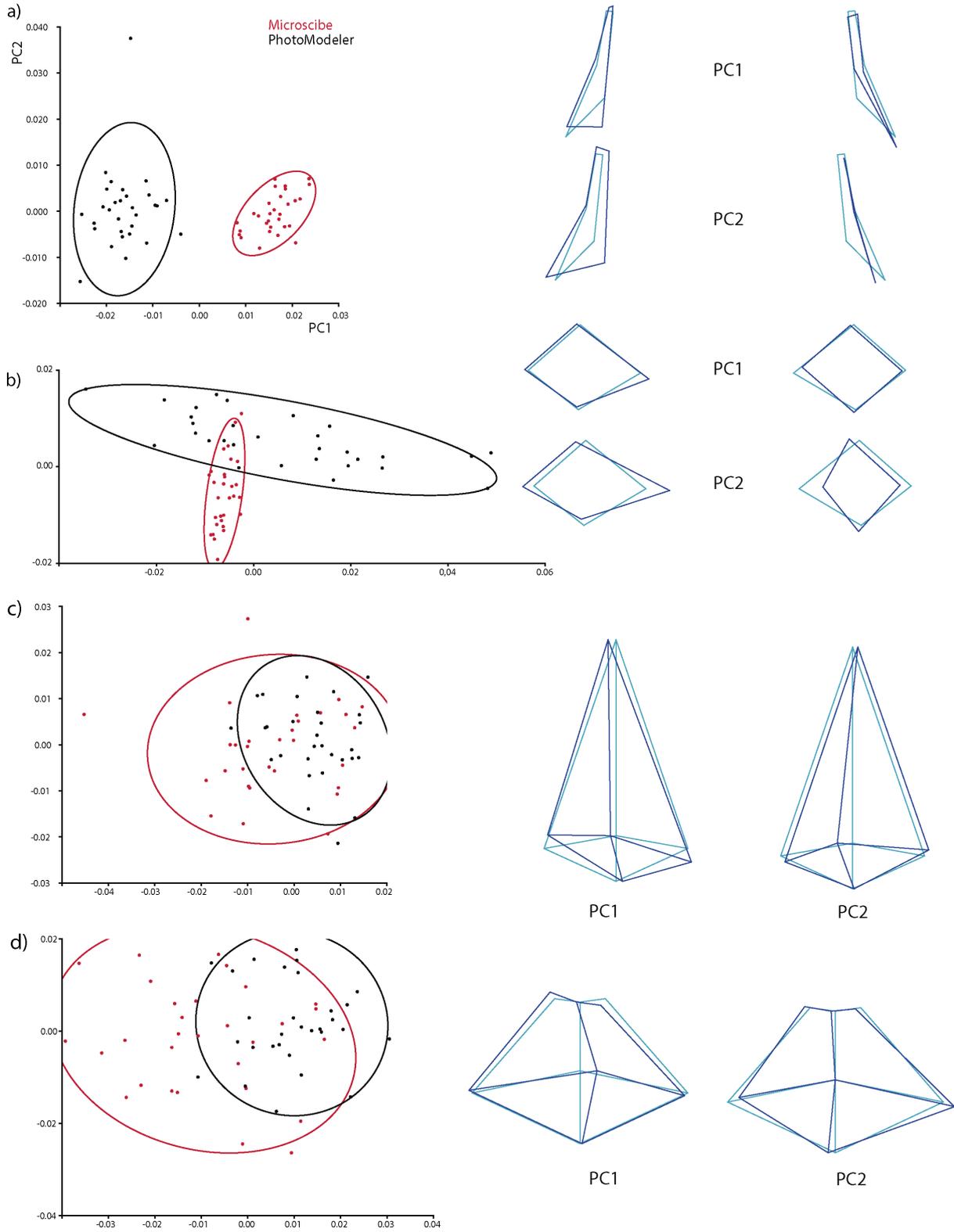


Figura 4.10. Análisis de Componentes Principales (PCA) por región facial: a) orejas, b) ojos, c) nariz y d) boca. A la derecha de la figura se presentan gráficas con polígonos de cambio en forma (shape) donde la forma media es la línea azul clara y el extremo positivo del eje la línea azul oscuro.

Experimento 4: correlación de los valores de asimetría fluctuante por técnica modelo real.

Los valores de AF, obtenidos del experimento 2, para ambas técnicas de digitalización, mostraron una nula dependencia lineal ($r^2= 0.0127$, $p=0.756$), es decir, una nula reproducibilidad (Figura 4.11).

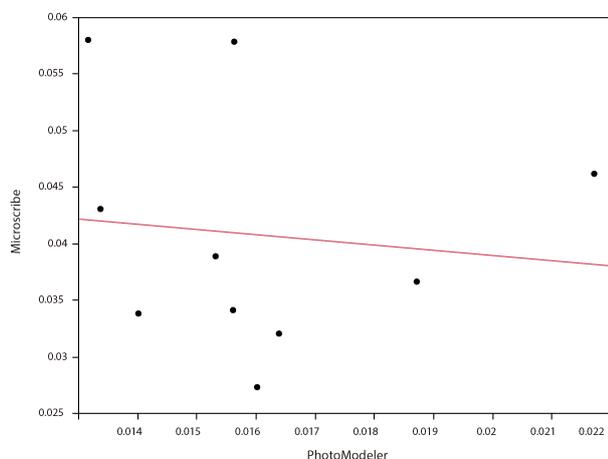


Figura 4.11. Correlación de los valores de asimetría fluctuante (vAF) para ambas técnicas de digitalización. Línea roja, ajuste de regresión.

Experimento 5: correlación distancias estimadas y directas

La comparación por regresión lineal simple de las distancias ch-ch medidas directamente (antropometría) y por PhotoModeler muestra una alta concordancia (correlación >93%) indicando una alta reproducibilidad del proceso de reconstrucción 3D ($p<0.001$).

2) Repetibilidad de la técnica fotogramétrica por *landmarks* y módulos

Experimento 6: repetibilidad fotogrametría

Las dos iteraciones realizadas muestran una alta repetibilidad, su correlación es significativa ($r^2=0.78$, $p<0.0001$) y asimismo, no existen diferencias entre sus medias ($F=0.18$; $p=0.67$), por lo que fueron analizadas en conjunto. La varianza multivariada estimada por *convex hull* indica que los *landmarks* ubicados en la parte de las orejas son los puntos con más variación entre iteraciones (Figura 4.12). El rango de valores se ubicó desde los $2.86e-9$ a $1.26e-6$ con una media de $7.794e-8$ y una mediana de $5.97e-8$. Existe una asimetría en los datos, ya que 34 puntos se ubicaron entre los $2.86e-9$ y $4.68e-7$. Los puntos: *labiale inferioris* (31) y *otobasion superioris* izquierdo (33) fueron los “*outliers*” de la distribución (Figura 4.12). En ambos casos, estos puntos se colocaban sin etiqueta previa, por lo que el error de observador pudo ser un factor de influencia.

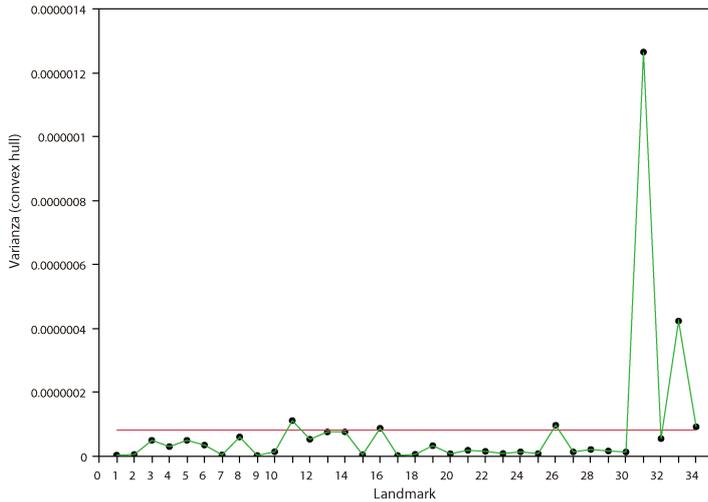


Figura 4.12. Valores de varianza multidimensional (*convex hull*) para los *landmarks* del modelo fijo. Línea roja, corresponde a la media de la varianza de los *landmarks*.

Los valores de la desviación media de los *landmarks* (Tabla 4.9) indican que la media se ubica en 2.66 para el componente asimétrico y 2.77 para el simétrico. Los valores de RMSE (Tabla 4.10) para las dos repeticiones no fueron significativos en el ANOVA de una vía ($F=1.1$, $p=0.465$) y tuvieron un valor medio de 0.0003.

Tabla 4.9 Valores de desviación media para el error intra-observador en ambos componentes de la simetría de objeto.

	Desviación media		
	Min	Max	Media
Simétrico	0.0000	14.5654	2.7714
Asimétrico	0.0001	7.5161	2.6602

Tabla 4.10 Valores de RMSE y porcentajes para las dos iteraciones realizadas. * Ninguno de los *landmarks* resultó significativo para ningún intervalo de confianza

	Min	Media	DE
Repetición*	0.0000	0.0003726	0.0005071
%RMSE	Min	Media	
	0.0000	0.0278	

Se presentan los cuadrados medios (MS) para cada efecto y parte de la cara (Tabla 4.11; Figura 4.13). La boca y nariz son las partes de la cara con mayor cantidad de asimetría direccional y fluctuante. En el Anexo 5, se puede ver que los diferentes Procrustes ANOVA para cada parte de la cara no difieren en el patrón esperado de asimetría direccional (AD).

Tabla 4.11 Resultados de los Procrustes ANOVA para cada parte de la cara.

Efecto	Configuración total	Cara sin orejas	Boca	Nariz	Ojos	Orejas
Individual	0.00011	0.00019	0.00194	0.00157	0.00028	0.00024
Lado	0.00030	0.00115	0.01404	0.01145	0.00284	0.00044
AF	0.00001	0.00002	0.00028	0.00021	0.00006	0.00004
Error	0.00001	0.00001	0.00013	0.00011	0.00003	0.00002

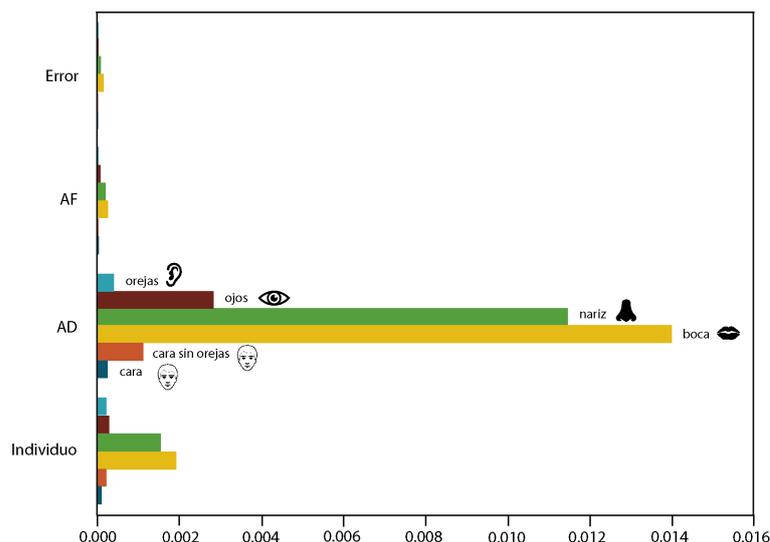


Figura 4.13 Frecuencia de varianza (MS) por subdivisión del fenotipo facial.

3) Prueba de error de medición (EM) entre observadores e intra observador

Experimento 7: error entre e interobservadores

En la Figura 4.14 pueden observarse los principales ejes de covariación en las repeticiones por observador. El análisis de exploración inter observadores generó 54 eigenvectores para resumir el 100% de la varianza (Tabla 4.12). Los tres primeros componentes resumen el 63% de la varianza. El *wireframe* (polígono de cambio en la forma) del PC1 permite ver los extremos de la variación a lo largo del eje de las digitalizaciones, resultando seis *landmarks* variables: *superaurale* (derecho), *otobasion superiorious* (derecho), *tragion* (derecho), *subaurale* (derecho), *otobasion inferiores* (derecho), *pogonion* (Figura 4.14). El patrón de varianza no muestra una gran diferencia entre observadores (Figura 4.15) corroborada con una prueba *t* y Levene ($pM=0.99849$, $pL=0.9749506$).

PC	eigenvalor	% varianza	% v acumulada
1	0.00007187	34.98	34.98
2	0.00003373	16.417	51.397
3	0.00002429	11.822	63.219
4	0.00001579	7.685	70.904
5	0.00000755	3.675	74.579
		...	
51	0.00000007	0.033	99.925
52	0.00000006	0.028	99.952
53	0.00000006	0.027	99.979
54	0.00000004	0.021	100

Tabla 4.12. Resultados del PCA. Eigenvalores, porcentaje de varianza, y varianza acumulada por PCs. Se muestran los primeros cinco y cuatro últimos PCs.

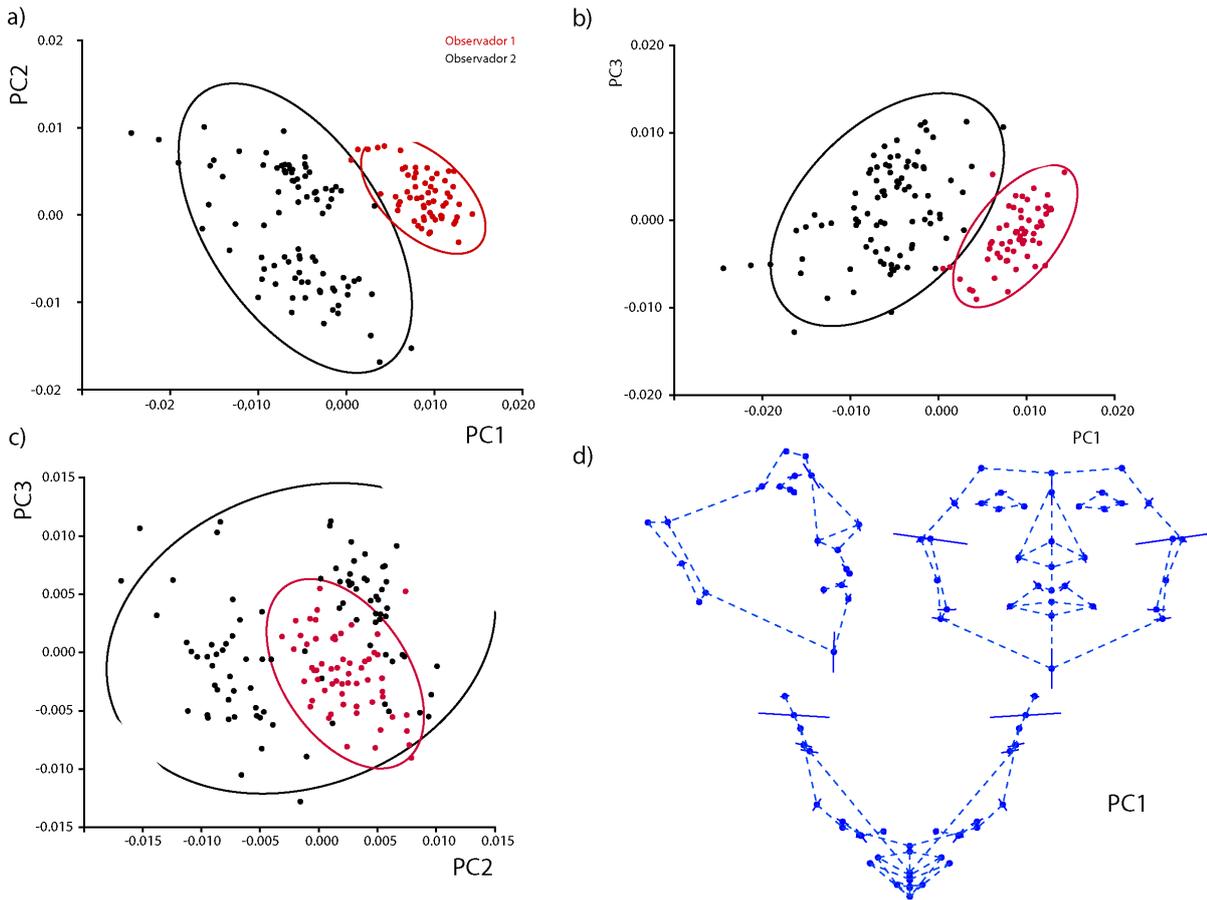


Figura 4.14. Gráfico de dispersión del PC1, PC2 y PC3 (a, b, c) de todas las digitalizaciones realizadas por los observadores L (4) y M (6). Se observa la varianza de los datos del observador no entrenado M y la de L. Los valores de varianza total son 0.00009101 para L y 0.00018768 para M. En el caso de M las repeticiones con entrenamiento se delimitan hacia los valores centrales del PC1 (-0.01 a 0.0) y hacia valores positivos del PC2. Las elipses contienen el 95% de la varianza. (d) Se muestra el eje de tendencia de variación (línea continua) para cada *landmark* en el PC1.

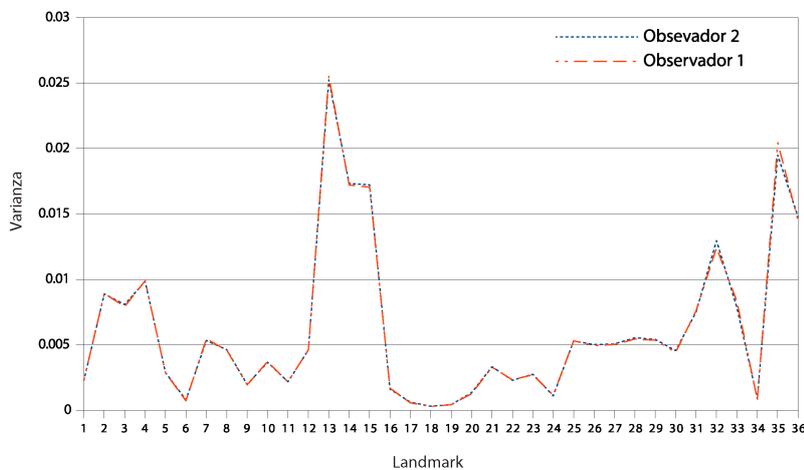


Figura 4.15. Distribución de la varianza por *landmarks* en el ensayo. Media y varianza no significativas ($p=0.01$). Cada dato en la gráfica corresponde a la varianza total por *landmark* sobre los datos ajustados mediante GPA (*Procrustes coordinates*) por observador.

La varianza del observador entrenado es homogénea (Observador 1, izquierda, Figura c.16) versus la variabilidad del observador no entrenado (Observador 2, derecha; Figura 4.16). La distribución del observador 2 (Mirsha) es bimodal, porque después de la tercera repetición tuvo el entrenamiento otorgado por el observador 1 (Lucia). De ésta manera, se generó una

nueva tendencia en las digitalizaciones, que minimizaron el error interobservador. Las repeticiones 4, 5 y 6 del observador 2 tienen una varianza tendiente a valores positivos del PC1 y PC2, contraria a la que se presentaba en las primeras iteraciones. La varianza total de las digitalizaciones del observador 1 fue 0.00009101, mientras que el 0.00018769 para el observador 2 (teniendo que la varianza total es la sumatoria de los eigenvectores del PCA por observador). Después del entrenamiento el observador 2 tuvo una varianza total de 0.00011431 ajustándose mejor a lo mostrado por el observador entrenado 1 y tendiendo a reducir, cada vez más, la varianza de sus iteraciones (elipses de la gráfica).

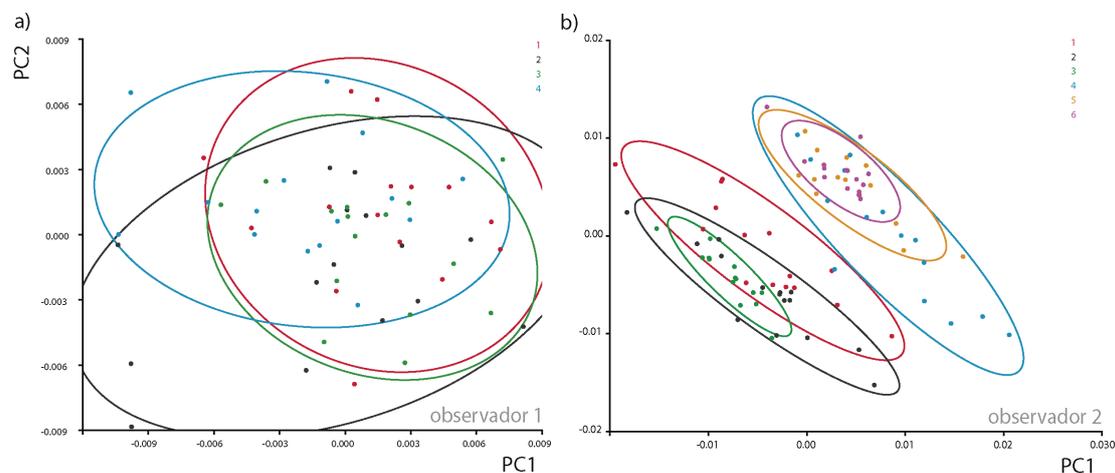


Figura 4.16. Gráfico de dispersión del PC1 y PC2 de cada observador (observador 1=Lucia, izquierda; observador 2=Mirsha, derecha) por día. Varianza homogénea en observador 1 y bimodal en observador 2. La dispersión de las observaciones en observador 1 se reduce con el tiempo ajustándose cada vez más hacia valores positivos del PC1 y PC2. Las elipses contienen el 95% de la varianza.

En el contexto del ANOVA, para cada observador se calcularon las distancias euclidianas para cada *landmark* a su centroide (*average shape*). Sobre estas distancias se calculó un ANOVA de una vía por observador, examinando las raíces cuadradas medias. La raíz de los cuadrados medios de los grupos (*root mean square error*) corresponde al error intra-observador (Sokal and Rohlf, 1995) y la raíz de los cuadrados medios entre grupos corresponde al error interobservador. Teóricamente, el error intra-observador no debe exceder 0.33mm o 2%. La media del error interobservadores deberá ser aproximadamente de 1mm y menos de 2%, y las observaciones más imprecisas no deben exceder el 5% de error (Singleton, 2002). Cuando, la media del error inter-observador excede el error intra-observador por aproximadamente 0.66 mm, el porcentaje de error es comparables dentro y entre observadores (Singleton, 2002). Como se observa en los resultados (Tabla 4.13) el porcentaje de error (%RMSE), exceptuando el primer análisis (diciembre), es mayor para inter-observador que para intraobservador. Asimismo, la variación del error inter-observador disminuye con el tiempo 1.4884 a 0.9172 para la última iteración.

Tabla 4.13. Valores medios del error inter e intra-observador a través de los *landmarks*.

Febrero	RMSE			%RMSE		
	min	max	media	min	max	media
Interobservador	0	0.0053	0.0009	0	1.6995	0.9172
Intraobservador	0	0.0032	0.0007	0.3005	2	1.0828

Enero	RMSE			%RMSE		
	min	max	mean	min	max	media
Interobservador	0	0.0033	0.0007	0.1713	1.411	0.908
Intraobservador	0	0.0026	0.0007	0.589	1.8287	1.092

Diciembre	RMSE			%RMSE		
	min	max	media	min	max	media
Interobservador	0	0.0149	0.0043	0.2665	1.8766	1.4884
Intraobservador	0	0.0028	0.0009	0.1234	1.7335	0.5116

En la Tabla 4.14, podemos ver los estadísticos descriptivos de la matriz de distancias. El valor de la media inter-observador (observador 1 y 2) es de 0.0373, cifra más baja que el valor mínimo de cualquiera de las distancias entre individuos intraobservador. El valor máximo del observador 1-2 (0.0739) no alcanza cualquiera de las medias del observador 1 y 2. Los valores de las distancias entre los individuos repetidos se muestran, de menor a mayor, en la Tabla c.15 (20 repeticiones del observador 2). La Figura 4.17 muestra la división del valor mínimo del observador 1 y 2 (observador 1=0.041) con una línea roja, la variación normal de la muestra queda delimitada hacia la derecha de la gráfica y los valores de las repeticiones del observador 1 y 2 hacia la izquierda de manera agrupada.

Tabla 4.14 Estadísticos de tendencia central y dispersión para la matriz de distancias entre individuos (digitalizaciones) con tres niveles de exploración: intra-observador (Observador 1 y 2), inter-observador (observador 1-2) y sus respectivos totales.

efecto	min	max	de	media	mediana	moda
Observador 1	0.0410	0.1719	0.0170	0.0827	0.0806	0.0575
Observador 2	0.0490	0.1505	0.0171	0.0794	0.0765	0.0833
Observador 1-2	0.0257	0.0739	0.0169	0.0373	0.0316	0.0833
Total	0.0257	0.1719	0.0169	0.0828	0.0808	0.0833

Tabla 4.15 Distancias entre individuos digitalizados por observador 1 y 2. Los datos están ordenados de la distancia mínima a la máxima

Individuo	54-54m	220-220m	131-131m	53-53m	358-358m	94-94m	68-68m	510-510m	671-671m	44-44m	171-171m	10-10m	249-249m	639-639m	152-152m	46-46m	25-25m	84-84m	7-7m	29-29m
Distancia	0.0257	0.0264	0.0288	0.0290	0.0293	0.0296	0.0297	0.0300	0.0306	0.0312	0.0320	0.0334	0.0366	0.0382	0.0436	0.0437	0.0447	0.0483	0.0606	0.0739

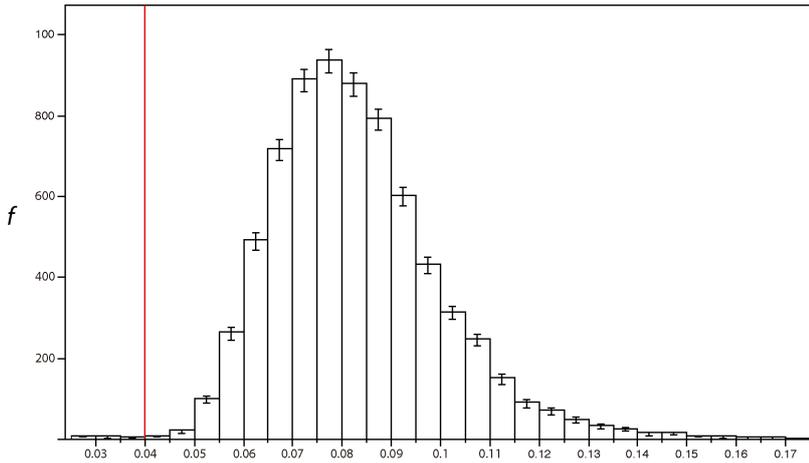


Figura 4.17 Histograma de frecuencias de las distancias entre individuos digitalizados. Se delimita (línea roja) el límite inferior del rango de distancias totales. Se observa a la izquierda las distancias por debajo del valor mínimo del observador 1 y 2, estas distancias son las de los individuos repetidos.

La Figura 4.18 muestra que 16 de las 20 repeticiones de Observador 2 fueron pareadas de manera correcta (80%, ramas rojas en el árbol). En ninguno de los casos de las distancias intra-observador se observan valores de clasificación correcta como en interobservador. Aquellas repeticiones que no se agruparon corresponden a fotografías de mala calidad, en lo referente a una baja profundidad de campo y a la no ortogonalidad de la toma.

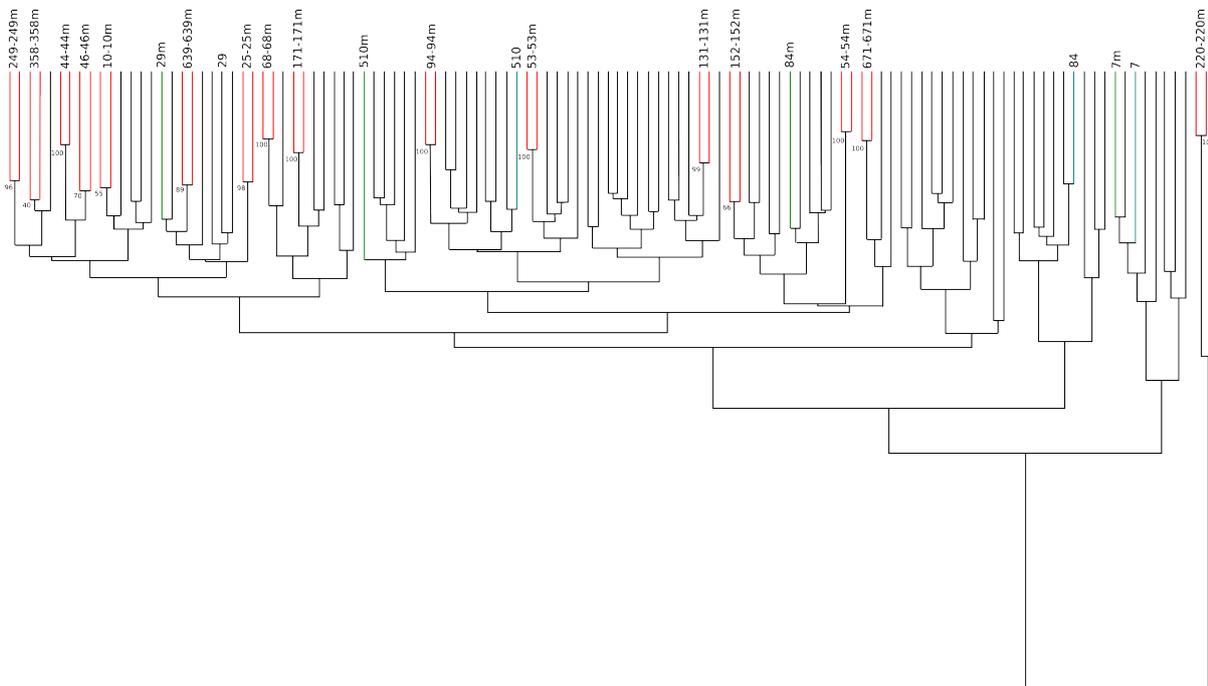


Figura 4.18 Dendrograma UPGMA de la matriz de distancias entre individuos con 1000 permutaciones. En rojo se observan las clasificaciones correctas para las digitalizaciones repetidas, en verde aquellas erróneas en el observador 2 y en azul la del 1. Las digitalizaciones de observador 2 están identificadas con el número de individuo más la letra m. El número en los nodos indica el porcentaje de clasificaciones correctas.

El Procrustes ANOVA (Tabla 5.1, Capítulo V) mostró que los cuadrados medios presentan los valores más bajos (varianza) para el error que los respectivos cuadrados medios para AF, debido a que el orden de magnitud del error, cuando éste es comparado con la AF, es más bajo.

Estos datos indican que los valores de repetibilidad de los datos son aceptables y que la AF podría ser considerada como *proxy* en la inferencia de inestabilidad en el desarrollo (Palmer, 1994; Palmer et al., 1994).

En resumen, los experimentos 2, 3 y 4 no tuvieron un resultado positivo, todos ellos enfocados a conocer la reproducibilidad de la técnica. Empero, el resto de los experimentos aseguraron una reproducibilidad media, y altas repetibilidades y error despreciable (Tabla 4.16).

Tabla 4.16. Resumen de los experimentos de validación de la técnica fotogramétrica.

Prueba	Experimento	Estado	Descripción
Reproducibilidad	Experimento 1	Si	Comparar ajuste entre técnicas y valores de AF en cráneos y tipos de ajuste
	Experimento 2	No	Contraste entre técnicas en rostros humanos
	Experimento 3	Si	Comparación entre técnicas en maniquí (modelo restringido)
	Experimento 4	No	Comparación de valores de AF entre técnicas
	Experimento 5	Si	Correlación entre distancias Ch-Ch medidas directamente y estimadas
Repetibilidad	Experimento 6	Si	Varianza multidimensional por landmark
EM	Experimento 7	Si	Prueba de error inter e intraobservador

Discusión

Debido a que el error es una constante en los estudios de caracteres morfométricos (Lougheed et al., 1991; Yezerinac et al., 1992; Björklund y Merilä, 1997; Arnqvist y Martensson, 1998) y en las estimaciones de asimetrías (Palmer y Strobeck, 1986; Merilä y Björklund, 1995), el protocolo de experimentos desarrollado aquí, provee evidencia determinante sobre el comportamiento de los principales efectos durante el proceso de digitalización por fotogrametría, concretamente con el uso del programa Photomodeler que fue utilizado en las investigaciones del consorcio CANDELA. Por ello, fueron evaluados la reproducibilidad, repetibilidad y error de medición (EM) como principales procesos en la validación de la técnica de estimación del fenotipo facial en rostros humanos. La lectura de la sección de toma fotográfica verterá un complemento importante para la erradicación de dudas sobre la técnica de reconstrucción, ya que en ella se detallan los requerimientos determinantes por la plataforma informática para la reconstrucción 3D (ver Capítulo III).

Existe suficiente evidencia sobre la utilidad y repetibilidad de la técnica fotogramétrica en la reconstrucción de caracteres faciales (Tanner y Weiner, 1949; Farkas et al., 1980; Guyot et al., 2003; Galantucci et al., 2008; Aksu et al., 2010; Payne, 2013, y otros). Incluso existe evidencia de que probablemente tenga un error similar a la de los métodos de escaneo 3D (Vannier et al., 1993). La constante, tomada desde la perspectiva de la metrología, es que todos los métodos de medición son imprecisos, por lo que se intentó mediante los análisis expuestos anteriormente caracterizarlos y observar que su tendencia era despreciable según el argumento de Arnqvist y Martensson, (1998).

Reproducibilidad

Los experimentos 1, 2, 3, 4 y 5 estuvieron enfocados a caracterizar el patrón de reproducibilidad de la técnica fotogramétrica (Tabla 4.16). El experimento 1 exploró la

fluctuación del modelo Procrustes ANOVA en relación a los ajustes por simetría *object* y *matching*, además de realizar una estimación del ajuste de cada técnica por medio de un PROTEST, todo ello sobre cráneos humanos. El experimento 2 buscó determinar la fluctuación en los valores de Procrustes ANOVA y varianza total (PCA) y análisis discriminante entre técnicas de digitalización, todo ello sobre caras humanas de 10 voluntarios ajenos a CANDELA. El experimento 3 utilizó un modelo restringido (maniquí) como *following study* del experimento 2, además de generar un análisis discriminante para 5 regiones faciales: cara, nariz, ojos, boca y orejas; y un modelo restringido estricto para una digitalización con etiquetas para eliminar la mayoría de las fuentes de error. El experimento 4 evaluó la dependencia lineal simple entre los valores de AF obtenidos por MicroScribe y PhotoModeler. Como punto final, el experimento 5 busco determinar el grado de correspondencia de los valores de la distancia chelion-chelion medida directamente (antropometría) en cada voluntario CANDELA y dicha medida reconstruida por el PhotoModeler.

En primera instancia (experimento 1), se observaron pequeñas diferencias entre la distribución del modelo Procrustes ANOVA en relación al tipo de ajuste por simetría *object* o *matching*, enfocadas a la significación de la asimetría direccional y la varianza dentro de cada técnica. La prueba PROTEST no mostró diferencias significativas cuando un modelo de simetría *object* era elegido, pero si para *matching* en donde la significación es importante ($p < 0.001$).

El experimento 2 mostró una menor varianza (Figura 4.8a,c), de un orden de magnitud, de la técnica fotogramétrica, respecto de la digitalización directa con un brazo MicroScribe, que presentó una enorme varianza (debido a que los individuos medidos no tenían un estadiómetro para reducir el movimiento, Tabla 4.8c.). Asimismo, el error estimado en el Procrustes ANOVA es menor para el caso del PhotoModeler. La correlación matricial entre PhotoModeler y MicroScribe fue significativa (para la variación individual, asimetría fluctuante y error). Sin embargo, los valores de AF muestran diferencias significativas y sin dependencia lineal de los datos. Finalmente, el análisis discriminante mostró que la reproducibilidad entre las técnicas es baja, ya que para 1000 permutaciones existen diferencias entre las medias por técnica. Cabe señalar que aun así, el PhotoModeler tiene mejor índice de reclasificación en el análisis discriminante. Estos datos nos ejemplifican, básicamente que la técnica de medición directa es altamente sensible al error de medición, ya que el patrón de varianza del PhotoModeler se mantuvo constante entre las pruebas.

El experimento 3 demostró que existe una reproducibilidad contradictoria cuando se restringe el movimiento de la cara en las digitalizaciones por MicroScribe (como se discute arriba). El PC1 divide las técnicas de digitalización y los cambios se delimitan a dos *landmarks* en la zona de inserción de la oreja en la cabeza (Figura 4.9b), puntos que no tenían referencias espaciales (pegatinas) y que en las fotografías dificultaban su posicionamiento en el PhotoModeler. El resto del polígono de forma parece seguir un mismo patrón (Figura 4.9b). Cabe destacar que la correlación de matrices de varianza-covarianza resultó significativa ($p < 0.0001$). Además, los PCA realizados sobre los módulos faciales demuestran que las diferencias en la reproducibilidad están concentradas en orejas y ojos, principalmente; y no así en boca y nariz (Figura 4.10a,b,c,d). Además en la prueba PROTEST, utilizando únicamente los datos obtenidos de los *landmarks* con etiquetas, resultó no haber diferencias significativas para ninguno de los

componentes, simétrico y asimétrico (Tabla 4.7). Por éste motivo, y con la evidencia recolectada en el experimento 2, se puede decir que la baja reproducibilidad tiene un origen exógeno a las técnicas. Concretamente, el efecto de no fijar las cabezas de los voluntarios en las pruebas determino un aumento considerable de la varianza (Figura 4.8c).

El experimento 4 generó una correlación negativa de los valores de asimetría fluctuante facial (vAF), obtenidos del experimento 2, para ambas técnicas de digitalización (Figura 4.11); además, se evidenció una nula dependencia lineal ($r^2= 0.0127$; $p=0.756$), es decir, una nula reproducibilidad. Cabe destacar que los valores de mayor asimetría para MicroScribe corresponden a los más bajos de PhotoModeler. De igual manera, se debe señalar que los valores de AF están influidos por la varianza exógena del error de medición, como se discutió anteriormente.

El experimento 5 evidencia, como otros estudios lo hacen (Lynnerup et al., 2003), una buena repetibilidad de la técnica de reconstrucción del modelo 3D por fotogrametría. Las distancias chelion-chelion estimadas por PhotoModeler y aquellas medidas por un observador, presentaron una alta correlación (> 93%) indicando una alta reproducibilidad del proceso de reconstrucción 3D ($p < 0.001$).

Integrando, los valores de reproducibilidad cambian debido a la naturaleza de la toma del dato. El experimento 1 y 5 muestra una gran reproducibilidad. La baja reproducibilidad de los experimentos 2, 3 y 4 está altamente influenciada por el único factor que cambia entre experimentos: el procedimiento al digitalizar/medir los individuos al medirlos con MicroScribe sin poseer un estadiómetro que minimice el movimiento de los individuos genera una varianza considerable (Figura 4.8c y 4.11) en comparación con la varianza del PhotoModeler, técnica que minimiza más efectivamente el movimiento del voluntario. Además de la gráfica, los indicadores de varianza (Tabla 4.4) evidencian un orden de magnitud en la diferencia. Finalmente, los cambios asociados al PC1 (Figura 4.8b) denotan que la variabilidad de los puntos está asociada al movimiento de los voluntarios que repercute en un aumento en las diferencias entre técnicas. Luego entonces, se pensó en la utilización del maniquí como método para eliminar las variaciones por movimiento, debido a la ausencia de un dispositivo para fijar la cabeza. Además de esto se agregó una serie de pegatinas con el objetivo de minimizar la variación en la colocación de los puntos. Los resultados para el modelo fijo indican una baja reproducibilidad entre las técnicas. Para comprobar los resultados en la cara, no en cráneos, se integraron los experimentos 2, 3 y 4 para explorar más la variación en la estructura de estudio. Es de señalar que algunos puntos infieren gran cantidad de varianza por error de medición (Figura 4.9, 4.10); aun en el modelo fijo (maniquí) puede verse cómo cuando se estiman puntos el error era importante y se observaba en el PC1 (Figura 4.9). Ello se puede observar también en el análisis con los puntos etiquetados en que la variación entre técnicas no fue significativa (Tabla 4.7); patrón igualmente observado en los datos del PCA por módulos faciales (Figura 4.10a), en que se puede ver cómo la colocación de los *landmarks* en las orejas (sin etiquetas) causa que se discriminen las técnicas. Cuando las orejas son eliminadas del análisis, sin embargo, la reproducibilidad es alta (Figura 4.10b,c,d).

Repetibilidad

El experimento 6 permitió detectar una alta repetibilidad en la técnica fotogramétrica. Las iteraciones realizadas evidencian una alta correlación ($r^2=0.78$, $p<0.0001$) y sin diferir en sus medias ($p=0.67$). Este resultado y las estimas de EM, definen un marco de referencia excelente de la técnica (ver Error de Medición, abajo). Además, como ya se había inferido en el modelo fijo (Experimento 3), la mayor varianza (inferida como *convex hull*) de los *landmarks* está depositada en las orejas y labios, concretamente los puntos labiale inferiorius (31) y otobasion superiorius izquierdo (33) ocasionaron que la varianza se disparara (Figura 4.12). A pesar de éstas diferencias, cuando se analizó la distancia a la forma promedio (*average shape*) no existieron diferencias estadísticas entre las dos iteraciones ($p=0.465$), en concordancia con los datos de la correlación e indicando una alta repetibilidad de la fotogrametría utilizando el PhotoModeler. Finalmente, aunque los valores de asimetría reportados (Tabla 4.11, Figura 4.13) se centran en la nariz y boca, éstos no son los módulos que discriminan en repetibilidad en el modelo fijo (Figura 4.10c,b), una evidencia más de la potencia de la fotogrametría y dejan de manifiesto que los módulos con mayor AD y AF no son los más variables y plausibles a error.

Error de Medición

Como ya se ha planteado, el error de medición (EM) es uno de los elementos más importantes a descartar en los estudios de asimetrías. Si los datos superan éste obstáculo conceptual, la inferencia de procesos asociados a la inestabilidad del desarrollo son confiables (Palmer, 1994; Klingenberg et al., 2010). Luego entonces, las pruebas de EM indican que no existen diferencias entre los observadores ($p<0.01$). La mayor varianza entre observadores se manifiesta en los puntos de la inserción de la oreja a la cabeza (Figura 4.14d y 15). Asimismo, se logró identificar que la variación del observador 1 (entrenado) fue menor en éste primer acercamiento, pero que a medida de que se realizaban más iteraciones la varianza se fue homogenizando (Figura 4.15).

Además, siguiendo el protocolo de Singleton, (2002), se observó que el porcentaje de error (%RMSE), siempre fue mayor para el nivel inter-observador respecto del intra-observador (Tabla 4.13). De igual manera, se puede observar que la variación del error inter-observador disminuye con el tiempo 1.4884 a 0.9172 para la última iteración. Complementando el dato anterior, el valor medio inter-observador (observador 1 y 2) es de 0.0373, valor siempre inferior que cualquiera de las distancias entre individuos intraobservador. Se debe notar que el valor máximo del observador 1-2 nunca es cercano a cualquiera de las medias del observador 1 y 2.

Otra evidencia de la confiabilidad de la fotogrametría la aporta el dato de que 16 de las 20 repeticiones de Observador 2 fueron pareadas de manera correcta (80%, Figura 4.17). Cabe destacar, que en ninguno de los casos de las distancias intra-observador se observan valores de clasificación correcta como en el caso de las diferencias inter-observador, hallazgo ya reportado anteriormente. Como aporte indirecto, se hace la anotación de que aquellas repeticiones no clasificadas correctamente correspondían a fotografías con errores en la secuencia protocolar de toma, concretamente, en parámetros como profundidad de campo y/o la ortogonalidad de la

toma.

Como muchos trabajos lo discuten (Richtsmeier et al., 1995b; Arnqvist y Martensson, 1998; Cramon-Taubadel et al., 2007; Ross y Williams, 2008), los estudios de error intra e inter observador son un paso obligado para un análisis de cambios morfométricos sutiles, como los que se intenta detectar en esta tesis. Por este motivo es que los valores de la repetición de 200 individuos de la muestra CANDELA demuestran que el error tiene un orden de magnitud bajo, respecto de la varianza de la asimetría o los individuos.

En conclusión, los valores de AF reportados luego de los ensayos de error presentados en este capítulo pueden ser considerados como una aproximación sólida y fiable al fenómeno biológico bajo estudio (inestabilidad en el desarrollo, *sensu*, Palmer y Strobeck, 1986; Palmer, 1994).

Estimación de la asimetría individual

Introducción

La simetría bilateral puede ser dividida de dos maneras que Mardia et al., (2000) han distinguido como: simetría de objeto (*object symmetry*) y simetría de pares (*matching symmetry*). Bajo la simetría de pares, una estructura de interés está presente en dos copias separadas como imágenes especulares uno del otro, cada una situada en un lado del cuerpo o de la estructura. Cada estructura con simetría de pares existe como un par de copias separadas. El plano o eje de simetría del individuo o estructura se encuentra entre ellos, pero no pasa a través de cualquiera de las copias. En la simetría de objeto, en cambio, la estructura es simétrica en sí misma, por lo tanto tiene una línea o plano de simetría interna de modo que sus mitades izquierda y derecha son contiguas. Un buen ejemplo son extremidades de algún primate o las alas de insectos para simetría de pares, y la cara o un caparazón de tortuga para simetría de objeto.

Los organismos casi nunca son perfectamente simétricos, sin embargo, y las pequeñas asimetrías también afectan a las características estructurales (Palmer y Strobeck, 1986) que se encuentran en el plano sagital del cuerpo. Es decir, las estructuras que se encuentran sobre la línea media de un individuo o estructura puede abultarse localmente hacia la izquierda o derecha y por ende contribuir en la cuantificación de la asimetría. Por esta razón, es que los estudios de variación en las estructuras simétricas deben tener en cuenta la variación tanto en el plano medio como en las estructuras bilaterales (Klingenberg y McIntyre, 1998). Incluso, aunque la asimetría no sea el foco de interés analítico, el estudio y/o observación del patrón simétrico debe analizarse de todos modos (Klingenberg et al., 2002).

Los métodos existentes para el estudio de la asimetría de la forma se han centrado casi exclusivamente en la simetría de pares (Bookstein, 1991; Smith et al., 1997; Klingenberg y McIntyre, 1998), aunque el interés de muchos estudios se centra en estructuras o individuos con simetría de objeto. Existen un sin número de modelos matemáticos para poder inferir la AF (ver Palmer y Strobeck, 1986) desde métodos univariados a multivariados, así como aquellos que utilizan la morfometría geométrica como método de análisis (Klingenberg y McIntyre, 1998; Klingenberg et al., 2002). Los índices clásicos tienen cierta sensibilidad a los *outliers*, a la AD, AA y a la variación del tamaño del carácter (Palmer y Strobeck, 1986). Una ventaja de los modelos de morfometría geométrica es el incluir una evaluación de todos los factores influyentes descritos arriba.

La asimetría, definida como la ausencia de simetría (Van Valen, 1962), presenta tres patrones observables en la naturaleza: la asimetría fluctuante (AF), antiasimetría (AA) y la asimetría direccional (AD). La AF constituye pequeñas y estocásticas desviaciones de la simetría perfecta, y está distribuida normalmente alrededor de una media cero; AA involucra un patrón de variación derecha-izquierda distribuida con media cero, pero que su frecuencia de distribución tiende a la platicurtosis o la bimodalidad; finalmente, la AD muestra un patrón de diferencias derecha-izquierda con una media que es significativamente distinta de cero.

Mardia et al., (2000) y Schaefer et al., (2006) definen el componente de la asimetría individual (AI) como la descomposición aditiva de la AD, la AF y el error de medición. A través de las diferentes asimetrías definidas por Van Valen, (1962), la AF puede ser vista como más

relevante en lo concerniente a los estudios de la variación facial porque es considerada un común indicador de inestabilidad en el desarrollo (ID), que puede medirse directamente en los rasgos fenotípicos bilaterales humanos (Palmer y Strobeck, 1986; Møller y Swaddle, 1997; Milne et al., 2003; Little et al., 2008; DeLeon y Richtsmeier, 2009; Özener, 2010abc; Özener y Fink, 2010; Weisensee, 2013), y observable, de igual manera, en otros animales (Leary y Allendorf, 1989; Clarke, 1993; Allenbach et al., 1999; Lens y Van Dongen, 2008; Little et al., 2012). Aun así, algunos análisis previos, han puesto en duda la existencia de asociación directa entre la AF y la ID (McKenzie y Clarke, 1988; Graham et al., 1993; Bjorksten et al., 2000; Lens et al., 2002).

El principal objetivo de las investigaciones enfocadas en la asimetría individual (AI) ha sido la caracterización de la “desviación” de un *bauplan* normal, como respuesta a una amplia gama de factores como la selección sexual (Gangestad et al., 2001, 2010), condiciones de trabajo o estatus socioeconómico (Özener, 2010b; Özener y Ertuğrul, 2010), o la atracción (Scheib et al., 1999; Gangestad y Thornhill, 2003; Little y Jones, 2003; Rhodes et al., 2009; Zaidel y Hessamian, 2010; Neby y Ivar, 2013).

Modelo de inferencia de la asimetría individual

El método de Procrustes ANOVA (Klingenberg y McIntyre, 1998; Klingenberg et al., 2002) es una extensión de los trabajos para el estudio de la variación y asimetría de las formas simétricas delineados por Bookstein, (1991) y Auffray et al., (1999), y desarrollados ampliamente por Mardia et al., (2000), quienes elaboraron una prueba formal para la asimetría individual. La diferencia con relación a los índices clásicos es que éstos procedimientos comparan las formas originales de especímenes a sus respectivas copias especulares y por lo tanto hace que sea posible segmentar la variación de forma en componentes simétrica y asimetría (Klingenberg et al., 2002). Finalmente, se incorpora el método para abarcar el diseño completo de dos factores ANOVA (Klingenberg y McIntyre, 1998; Klingenberg et al., 2002) incluyendo asimetría fluctuante y la medición de error recomendado por Palmer y Strobeck, (2003).

El Procrustes ANOVA permite el análisis de datos en dos y tres dimensiones, además de que presenta mejoras en los supuestos de los procedimientos de pruebas estadísticas publicados anteriormente (Klingenberg y McIntyre, 1998). Según Palmer y Strobeck, (2003) los estudios de asimetría fluctuante (AF) se enfrentan a una serie de desafíos, por ejemplo que: a) se presenta variación fenotípica al azar por razones distintas a la inestabilidad del desarrollo, b) que todos los descriptores de AF estiman una varianza y sus diferencias se estiman con una confianza mucho menor que los medios (es decir, la repetibilidad es inferior), c) que los desvíos sutiles de la simetría son típicamente tan menores, que son muy difíciles de medir con fiabilidad, d) que el error de medición y el tamaño del rasgo interactúan de manera compleja y e) que las pruebas de desviaciones de la normalidad son débiles para muestras pequeñas. Todos estos aspectos han sido considerados en la propuesta de Klingenberg y McIntyre, (1998). Por otro lado, debe tenerse en cuenta que la muestra trabajada en esta tesis está entre las más grandes en relación a la gran mayoría de estudios sobre patrones de simetría-asimetría, por lo que se diluyen muchos de los efectos dependientes del tamaño muestral antes descritos.

El ajuste de Procrustes tradicional analiza la forma superponiendo configuraciones de

landmarks de dos o más individuos para lograr el mejor ajuste entre éstos (Rohlf y Slice, 1990). En los estudios de asimetría, el método tiene varios pasos (Bookstein, 1991; Smith et al., 1997; Auffray et al., 1999): 1) se reflejan las configuraciones de *landmarks* de un lado del cuerpo o estructura hacia su imagen espejo hasta alinear los *landmarks* correspondientes en ambos lados; 2) se escalan las configuraciones a *centroid size* 1; 3) se superponen las configuraciones derecha e izquierda hasta que éstas tengan el mismo centroide (considerado como el punto medio entre las coordenadas x e y para cada configuración); y 4) se rotan las configuraciones hasta obtener el mejor ajuste para dichos *landmarks* correspondientes bajo un criterio de optimización determinado (Figura 5.1, Klingenberg y McIntyre, 1998). Luego entonces, la asimetría puede ser medida como las desviaciones entre los pares de *landmarks* correspondientes (Klingenberg y McIntyre, 1998).

Como ya se mencionó, en la simetría de objeto, a diferencia de la simetría de pares (*matching symmetry*), una configuración proporciona información acerca de la asimetría y sobre la forma media izquierda-derecha. Así, para cada individuo hay una configuración que consta de k pares de puntos de referencia y l puntos no apareados en el plano medio o línea media de la estructura (Figura 5.1, círculos negros), donde $k \geq 1$, $l \geq 0$, y $2k + l \geq 3$ (ver Mardia et al., 2000; Kent y Mardia, 2001). Para los puntos apareados, que están situados fuera del plano medio, el análisis es comparable al procedimiento de simetría de pares, excepto que cada configuración de *landmarks* incluye los puntos apareados, tanto para el lado izquierdo y derecho. Para una configuración con k pares de puntos, el análisis de simetría de objeto incluye todos $2k$ de ellos simultáneamente. Los puntos impares son únicos en los análisis de simetría de objeto. Además, como se divide la variación total de forma en componentes de variación simétrica y asimetría por superposición de Procrustes de las configuraciones originales y sus imágenes especulares (Mardia et al., 2000), la superposición genera una copia reflejada de cada configuración, donde no importa qué plano de reflexión se utiliza para cada individuo. Así, los puntos de referencia apareados de las copias reflejadas se re-etiquetan manteniendo una referencia de identificación, lo que hace que la disposición de los *landmarks* sean compatibles con las formas originales de nuevo. El análisis Procrustes incluye las configuraciones originales y de espejo de forma combinada, superponiendo todos ellos simultáneamente. Incluso para las formas asimétricas, el consenso de mínimos cuadrados de Procrustes de un conjunto de *landmarks* y sus imágenes especulares re-etiquetadas es una forma perfectamente simétrica (Mardia et al., 2000; Kent y Mardia, 2001). En este promedio simétrico, los puntos no apareados y los puntos medios entre pares de todos los puntos coinciden exactamente en una línea recta (o en un plano de datos en 3D). Del mismo modo, la media de las configuraciones originales y reflejada de cada individuo después de la superposición general Procrustes es perfectamente simétrica. Por todos estos promedios simétricos, los puntos no apareados y los puntos pares se encuentran en la misma línea (o en el mismo plano); ésta es una estimación natural del eje medio (o plano) que permite la asimetría en todos los puntos de referencia, y proporciona un marco de referencia con un significado anatómico claro.

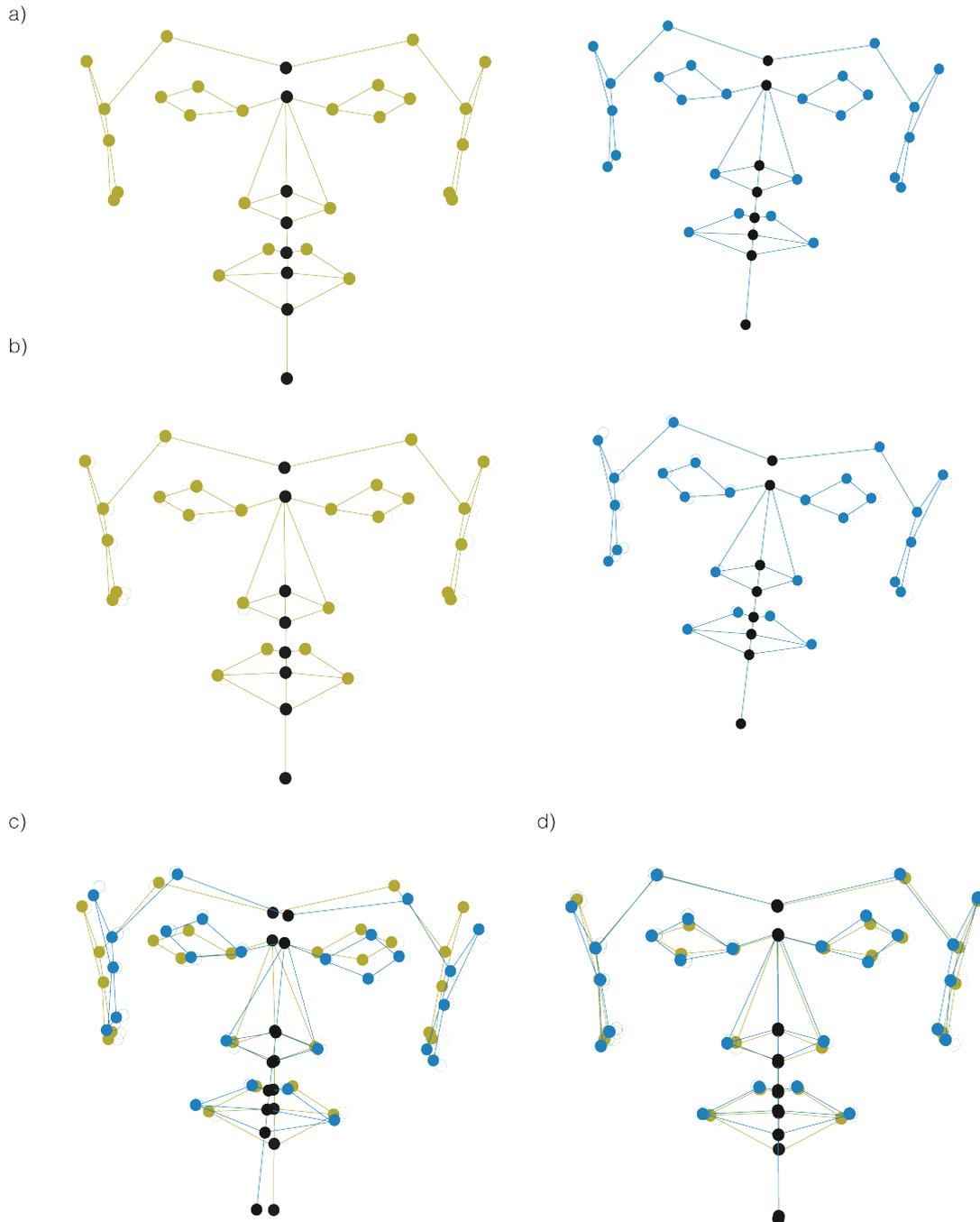


Figura 5.1. Secuencia de transformaciones del método de Procrustes para individuos con simetría de objeto. a) definición de puntos pares y no pares. b) Reflejado de las configuraciones por su configuración especular (círculos vacíos en fondo). c) traslación hasta la coincidencia de centroides de configuraciones y d) escalado a *centroid size* 1.

La variación entre los individuos en estos promedios de las configuraciones originales y reflejadas constituye el componente simétrico de variación de forma. La variación simétrica incluye a los cambios de los puntos no apareados a lo largo de eje medio (o dentro del plano medio) y los cambios de los puntos especulares. Para este componente de simetría perfecta, los pares de k de puntos de referencia se pueden describir completamente por la posición de un miembro de cada par, que es libre de variar en cualquier dirección, de modo que hay $2k$ parámetros libres para 2D y $3k$ parámetros libres para 3D. Los l landmarks no apareados pueden variar en sus posiciones a lo largo de la línea media o en el plano medio y, por tanto, añadir otros l parámetros libres para los datos en 2D o $2l$ de datos 3D.

Sin embargo, el ajuste de Procrustes presenta una serie de constricciones o pérdida de grados de libertad. La constricción debida al tamaño de toda la configuración reduce el número de parámetros a uno; la constricción de la ubicación elimina un parámetro para 2D y dos para 3D; y la constricción adicional para la orientación en el plano medio elimina un parámetro más en 3D (pero ninguno en 2D). Por lo tanto, la dimensión de la forma para la variación simétrica es $2k + l - 2$ para 2D y $3k + 2l - 4$ para 3D (veáse Mardia et al., 2000; Kent y Mardia, 2001).

En cambio, la asimetría se cuantifica a través de las diferencias entre las configuraciones de puntos originales y de espejo. Para los puntos pareados, la asimetría puede observarse en cualquier dirección para cada uno de los pares de k , que asciende a $2k$ parámetros libres para 2D y $3k$ para 3D. La asimetría de los *landmarks* no pareados sólo puede estar en la dirección perpendicular a la línea media y así añade parámetros libres l tanto en 2D como en 3D. La etapa de rotación durante Procrustes impone una restricción adicional y reduce el número de grados de libertad en uno por 2D y por dos para 3D. Es importante señalar que no hay restricciones de orientación o tamaño de las configuraciones de los puntos pareados a cada lado, ya que las diferencias en el tamaño y en la orientación de estas configuraciones medias son componentes genuinos de asimetría en estructuras con simetría de objeto. En total, la dimensión de la forma de asimetría, por tanto, es de $2k + l - 2$ en 2D o $3k + l - 3$ en 3D.

Las dimensiones de la forma de los componentes simétricos y asimétricos resumen a la dimensión total de la forma para toda la configuración de puntos de referencia, es decir, $2(2k + l) - 4$ para 2D y $3(2k + l) - 7$ para 3D. Esto se debe a que los componentes de variación simétrica y asimétrica ocupan subespacios del espacio tangente de Procrustes que son ortogonalmente complementarios (ver Mardia et al., 2000).

Además, si cada configuración se ha digitalizado varias veces, la variación entre las repeticiones da una medida de error de digitalización. Este error puede afectar a cada uno de los $2k + l$ puntos en cualquier dirección, independientemente de la simetría de la configuración. Debido a que la diferencia entre las réplicas se basa en la superposición por Procrustes de toda la configuración, la dimensión de forma para el error de medición es $2(2k + l) - 4$ para 2D y $3(2k + l) - 7$ para 3D.

El objetivo de este capítulo es la caracterización de la asimetría individual (AI) en la muestra CANDELA, con el empleo de la morfometría geométrica, concretamente el Procrustes ANOVA. Lo anterior, sin explorar otras asociaciones más que con referencia a los países y sexo. Al caracterizar la muestra, se obtienen los valores de referencia para contrastar en todos los capítulos siguientes, aunque el desarrollo del mismo ya constituye un paso importante dentro de la tesis. Asumiendo que los mismos procesos del desarrollo craneofaciales deberán incidir de manera uniforme a los patrones de asimetría facial entre poblaciones, la hipótesis nula es que todos los individuos de la muestra presentan niveles de asimetría similares, sin fluctuaciones por país o sexo

Sujetos y método

La muestra

En la estimación de la AI se ha utilizado una muestra de 4.104 voluntarios (Tabla 3.1) con edades comprendidas entre 18 y 85 años (media=26.41; de=9.29), de seis ciudades latinoamericanas: ciudad de México (México), Medellín (Colombia), Lima (Perú), Arica (Chile), Porto Alegre y Jequié (ambos en Brasil); todo ello dentro del marco de muestreo multicentro del consorcio CANDELA (ver Capítulo II y anexo 6 para las dos publicaciones asociadas a esta tesis). Los voluntarios con antecedentes de tratamientos hormonales no fueron considerados en este estudio (ver Anexo 7). Detalles sobre la relación de la edad y sexo de los participantes se proporcionan en la Tabla 3.1 (en Capítulo III).

Caracterización multivariante de la asimetría facial

Se utilizó un análisis de Procrustes ANOVA y MANOVA para caracterizar el componente asimétrico de variación de la forma (*shape*) en el fenotipo facial (Klingenberg y McIntyre, 1998). Klingenberg et al., (2002, 2010), sostienen que los organismos que exhiben simetría de objeto (*object symmetry*) necesitan un procedimiento especial para caracterizarlas cantidades relativas de los componentes de variación de forma simétrica (Cs) y asimétrica (Ca). Los análisis para las configuraciones con simetría de objeto separan la configuración original de *landmarks* en dos componentes de variación: Cs y Ca, usando un método de Procrustes por superposición de las configuraciones originales y sus imágenes especulares (Klingenberg et al., 2002), lo que permite obtener un valor de asimetría fluctuante facial por individuo (vAF). El modelo ANOVA Procrustes estima la importancia de un efecto individual, un efecto secundario informativo de AD, un efecto de interacción individuo por lado que indica la cantidad de AF, y el efecto de error de medición (Klingenberg and McIntyre, 1998; Mardia et al., 2000). Los p-valores se estimaron utilizando una permutación de prueba basadas en 100.000 iteraciones de los datos originales. Para estimar el término de error se realizó un *landmarking* repetido en un conjunto de 200 caras elegidas al azar en de todos los países. Teniendo en cuenta que la mayoría de las formas biológicas presentan una distribución de la variación no isotrópica a través de los *landmarks* (Klingenberg et al., 2002), también se utilizaron los resultados de una prueba MANOVA que considera la naturaleza no isotrópica de las configuraciones de *landmarks* al estimar los efectos AD y AF. El sexo se incluyó como covariable contribuyendo como otro efecto principal en el ANOVA. Por último, el Ca de la forma se sometió a un análisis de PCA con el fin de identificar las principales tendencias en la variación morfológica asimétrica (Klingenberg, 2011).

Adicionalmente se compararon las distribuciones de las variables por países y sexo, con la finalidad de caracterizar los valores asociados a cada grupo de variables. Un test de ANOVA de una vía, un *Welch test* para heterocedasticidad de varianzas y un *post hoc* Tukey-Kramer fueron calculados como fuente de significación de la comparación por grupos (en el caso de varianzas desiguales se empleó una prueba *post hoc* no paramétrica Steel-Dwass).

Resultados

Tanto el sexo como la AD y la AF muestran resultados altamente significativos en el Procrustes ANOVA (Tabla 5.1) y en el modelo no isotrópico MANOVA (ver Klingenberg et al., 2002; Tabla 5.1).

Tabla 5.1 Resultados del Procrustes ANOVA y MANOVA con el sexo como covariable.

Procrustes ANOVA					
Efecto	SS	MS	gl	F	P (param.)
Sexo	0.4987866	0.0097801	51	163.98	<.0001
Individuo	12.6538792	0.0000596	212160	6.64	<.0001
AD	0.0746448	0.0016965	44	188.74	<.0001
AF	1.6456741	0.0000090	183084	1.24	<.0001
Error	0.1132016	0.0000072	15675		

Prueba de efectos MANOVA					
Componente simétrico			Componente asimétrico		
Efecto	Pillai tr.	P (param.)	Efecto	Pillai tr.	P (param.)
Sexo	0.66	<.0001	Sexo	0.1	<.0001
Individuo	51.52		AD	0.75	<.0001
			AF	43.02	<.0001

En la componente asimétrica de forma sometida a un análisis de PCA con el fin de identificar las principales tendencias en la variación morfológica asimétrica, resultó que los cambios en la forma asociada a PC1 (22.015% de la varianza explicada) se centran en el lóbulo de la oreja, la nariz y la boca, mostrando una tendencia de AD izquierda en el eje positivo (Figura 5.2b). Los lóbulos de las orejas fluctúan a lo largo del primer PC con respecto a su posición antero-posterior, alcanzando posiciones más anteriores en el lado derecho de la cara. La boca, la nariz y los ojos, siguen los cambios de dirección generales observados en la cara. El PC2 (11.04% de la varianza explicada) describe cambios de AD supero inferiores, como un desplazamiento izquierdo de la barbilla y la boca, y una posición más basal del lóbulo de la oreja izquierda (Figura 2.2b). A la inversa, la nariz, los ojos y el lóbulo de la oreja izquierda toma posiciones superiores derechas (cambios observables hacia los valores positivos del PC2). Por último, el PC3 (9.61% de la varianza explicada) expresa cambios relacionados con la AD de las orejas, en cuanto a inserción y protuberancia (Figura 2.2b).

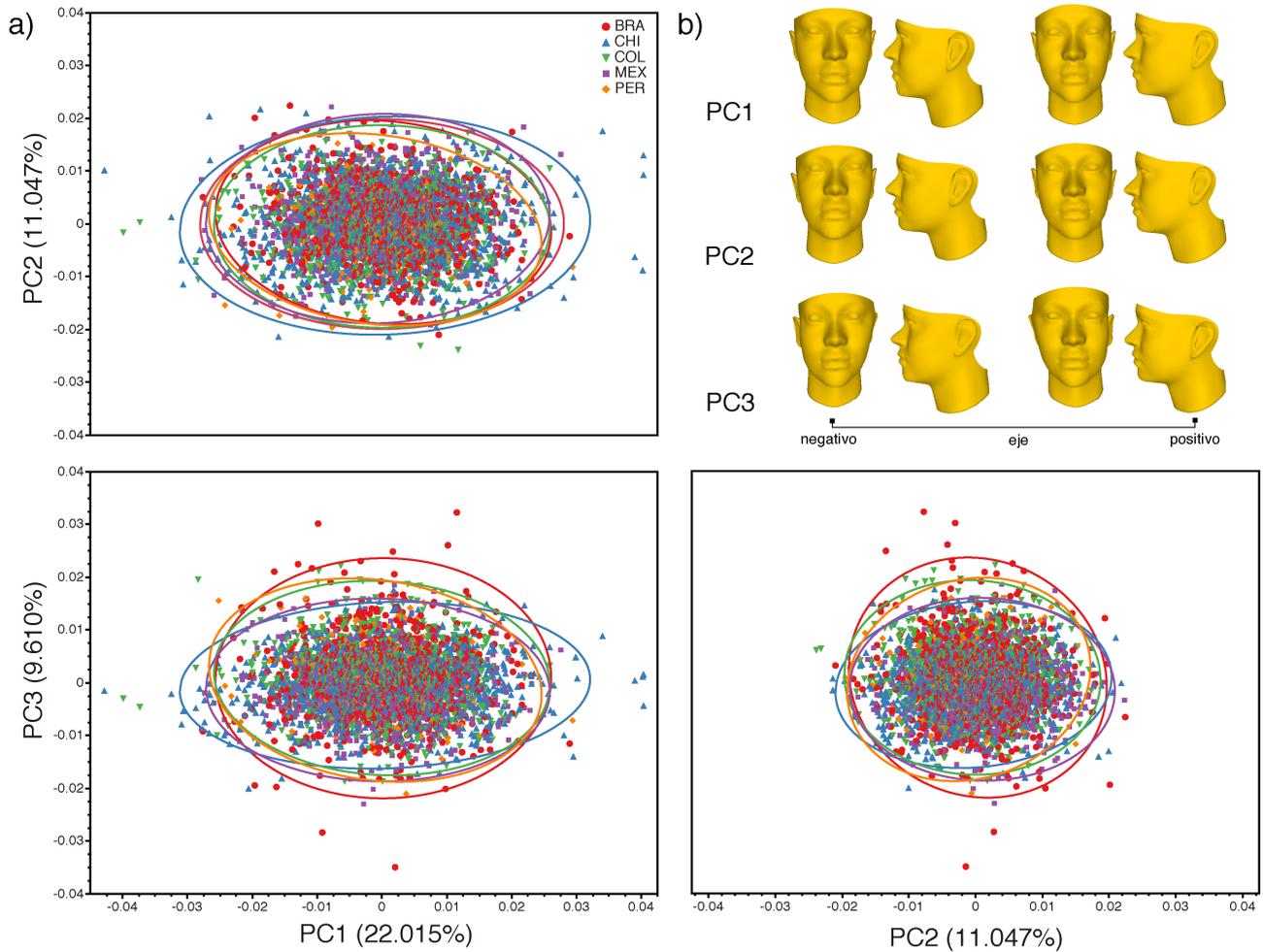


Figura 5.2. Análisis de componentes principales (PCA). Se muestran las gráficas de los PC1, 2 y 3 del componente asimétrico de la forma (a, superior e inferior izquierda e inferior derecha). Las elipses representan el 99% de la varianza. Los *morphings* representan los extremos, negativo y positivo, de la variación asimétrica observada en cada PC. (b) *Morphings* de los cambios asociados a cada PC, son presentados la norma lateral izquierda y frontal.

Finalmente, el ANOVA informó que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.0001$) entre los países en ambos sexos. De igual manera, la prueba de *Welch* resultó en señalar varianzas desiguales en sexo ($p < 0.0001$), para las varianzas. Por este motivo se presentan los datos de la prueba paramétrica pos hoc Tukey-Kramer (Tabla 2.3) y no paramétrica Steel-Dwas: ambas permiten ver los casos en donde las diferencias por país y sexo son significativas. Concretamente, las mujeres de Chile y Colombia se diferencian ($p < 0.0001$) de México, Perú y Chile entre sus valores de AF (Tabla 5.3). En los hombres, en cambio, Colombia es el país que se diferencia del resto de manera significativa ($p < 0.0001$). La distribución y proporción de la AF por países y sexos tiene una tendencia desigual entre los países (Figura 5.3). Las gráficas de caja, indican que para las mujeres, Chile presenta los mayores valores de la muestra. Los hombres en cambio muestran que tanto Brasil, México y Perú comparten altos valores de media.

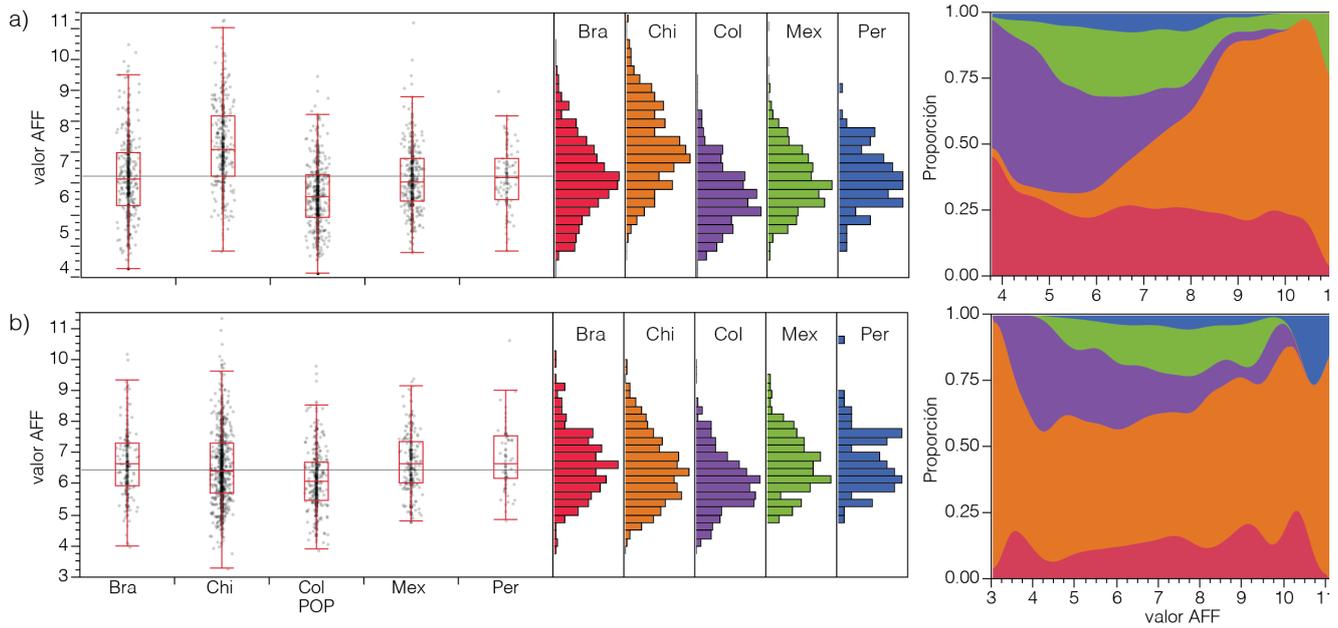


Figura 5.3 Distribución de los valores de AFF en la muestra analizada. a) mujeres b) hombres. Se presentan gráficos de cajas con su respectivo histograma de frecuencias (izq) y un gráfico de la proporción global de cada variable en relación a su valor de AFF (der).

Tabla 5.3 Resultados de las pruebas *post hoc* paramétrica y no paramétrica para los valores de AF entre países. Los valores significativos se muestran en color verde claro. a) resultados para el grupo de mujeres, b) grupo hombres. Columna izquierda: prueba Steel-Dwass, columna derecha: prueba Tukey-Kramer.

a)												
Iteración	Score medio	EE dif	Z	Limite inf	Limite sup	valor p	Iteración	Diferencia	EE dif	Limite inf	Limite sup	valor p
CHI BRA	197.405	17.967	10.987	0.673	1.087	<.0001	CHI COL	1.391	0.065	1.214	1.569	<.0001
MEX COL	140.523	18.630	7.543	0.286	0.600	<.0001	CHI MEX	0.942	0.069	0.754	1.129	<.0001
PER COL	108.153	20.265	5.337	0.259	0.761	<.0001	CHI PER	0.904	0.107	0.611	1.196	<.0001
PER MEX	12.685	17.107	0.742	-0.186	0.325	0.947	CHI BRA	0.882	0.067	0.700	1.064	<.0001
PER BRA	2.787	18.920	0.147	-0.271	0.295	1.000	BRA COL	0.509	0.062	0.340	0.679	<.0001
MEX BRA	-13.411	18.082	-0.742	-0.229	0.131	0.947	PER COL	0.488	0.105	0.202	0.773	<.0001
PER CHI	-123.753	16.715	-7.404	-1.171	-0.561	<.0001	MEX COL	0.450	0.065	0.274	0.626	<.0001
COL BRA	-149.177	19.134	-7.796	-0.661	-0.322	<.0001	BRA MEX	0.060	0.066	-0.120	0.240	0.896
MEX CHI	-208.120	17.246	-12.068	-1.126	-0.726	<.0001	PER MEX	0.038	0.107	-0.254	0.330	0.997
COL CHI	-325.594	18.533	-17.569	-1.559	-1.179	<.0001	BRA PER	0.021	0.105	-0.266	0.309	1.000

b)												
Iteración	Score medio	EE dif.	Z	Limite inf	Limite sup	valor p	Iteración	Diferencia	EE dif	Limite inf	Limite sup	valor p
MEX COL	107.501	15.580	6.900	0.333	0.746	<.0001	PER COL	0.671	0.136	0.299	1.042	<.0001
PER COL	93.626	17.997	5.202	0.318	0.992	<.0001	MEX COL	0.531	0.084	0.302	0.759	<.0001
PER CHI	83.741	35.962	2.329	-0.055	0.657	0.136	BRA COL	0.518	0.086	0.283	0.753	<.0001
MEX CHI	59.698	24.346	2.452	-0.021	0.385	0.102	CHI COL	0.385	0.063	0.212	0.557	<.0001
PER BRA	14.339	12.429	1.154	-0.216	0.511	0.778	PER CHI	0.286	0.130	-0.070	0.642	0.182
PER MEX	12.416	13.245	0.937	-0.236	0.470	0.882	PER BRA	0.153	0.143	-0.237	0.543	0.822
MEX BRA	4.127	13.281	0.311	-0.218	0.273	0.998	MEX CHI	0.146	0.074	-0.055	0.348	0.275
CHI BRA	-48.778	24.758	-1.970	-0.371	0.062	0.281	PER MEX	0.140	0.141	-0.246	0.526	0.860
COL BRA	-95.275	15.465	-6.161	-0.733	-0.290	<.0001	BRA CHI	0.133	0.077	-0.076	0.342	0.410
COL CHI	-131.103	23.288	-5.630	-0.526	-0.182	<.0001	MEX BRA	0.013	0.094	-0.244	0.270	1.000

Discusión

El objetivo de éste capítulo es generar una caracterización general de la AI en la muestra, en lo que respecta al país y al sexo. Al caracterizar la muestra, fue posible obtener los valores o scores de asimetría fluctuante que serán la base de los análisis en otros capítulos. De manera general, la hipótesis nula fue rechazada ya que los individuos presentaron diversos patrones de AF, entre sexos y países.

En primera instancia, aunque ya se ha señalado en el capítulo anterior debe mencionarse que el error, si bien contribuye a la varianza, lo hace de manera menor que la AF. Este hecho es uno de los puntos protocolares más importantes en el estudio de las asimetrías (ver Palmer y Strobeck, 1986, 2003; Klingenberg y McIntyre, 1998; Palmer, 1999, 2000). La posible fuente de error es baja comparada con las de variación analizadas en el Procrustes ANOVA, y en estas condiciones se puede señalar que los valores de AF son confiables.

En términos de tipo de asimetría, los datos indican que la asimetría direccional (AD) contribuye en mayor medida a la varianza en la muestra, lo que apoya trabajos previos que sugieren un mayor componente de AD en la variación normal asimétrica en el cráneo humano, la cara y la dentición (Schaefer et al., 2006; DeLeon, 2007; Ercan et al., 2008; Barrett et al., 2012; Claes et al., 2012), así como en muestras con dismorfologías (McIntyre y Mossey, 2002; Hennessy et al., 2004; Klingenberg et al., 2010). Las opiniones tradicionales establecen que la AD está más determinada genéticamente, por lo que no podría ser utilizada como un *proxy* para la inestabilidad de desarrollo (Palmer, 1994). Sin embargo, otros autores sugieren que la AD también podría ser indicativa de ciertos mecanismos que implican inestabilidad del desarrollo (Graham et al., 1993; Møller y Swaddle, 1997; Smith et al., 1997). Específicamente, Graham et al., (1993), utilizando el modelo de morfogénesis reacción-difusión Turing Rashevsky, demostraron que tanto la antisimetría (AA) como la AD pueden ser inducidas por un simple cambio de los niveles de retroalimentación y la inhibición en el modelo.

En el próximo capítulo se establecen las relaciones con la base genética del individuo, lo que será de ayuda en la comprensión de éstos patrones. Por ejemplo, si éstos se mantienen en grupos con ancestría genética europea, amerindia, o africana. Esta evidencia podría ser indicativa de que la condición basal para cualquier población dada no es la simetría perfecta, sino algún nivel variable de ambos, AD y AF, como se ha demostrado en una publicación reciente en mestizos mexicanos (Farrera et al., 2014) y en otras poblaciones europeas aparentemente sanas (Ercan et al., 2008).

Por otro lado, como ya se ha desarrollado a lo largo de la introducción, los patrones de AF han sido ampliamente asumidos como indicadores de inestabilidad del desarrollo (Palmer y Strobeck, 1986; Livshits y Kobylansky, 1991; Møller y Swaddle, 1997; Milne et al., 2003; DeLeon, 2007; Little et al., 2008; DeLeon y Richtsmeier, 2009; Özener, 2010abc; c; Özener y Fink, 2010; Weisensee, 2013). Nuestros resultados indican que, a pesar de que la AF explica una fracción más pequeña de la variación que la AD, su contribución a la cantidad total de la variación asimétrica es significativa. Otro aspecto importante cuando se trata de comparaciones entre AD y AF es que, por lo general, se supone que la expectativa normal o fenotipo óptimo para una

población es $AF=0$ o perfecta simetría, lo que no es necesariamente un fuerte hipótesis nula como Debat and David, (2001) sostiene y Farrera et al., (2014) demuestran.

Es interesante notar que la caracterización de la componente asimétrica, por medio del análisis de PCA, haya permitido conocer que los cambios de forma asociada a PC1 se concentran en el lóbulo de la oreja, la nariz y la boca. El PC2 refleja cambios en la barbilla y la boca, y una posición más basal del lóbulo de la oreja izquierda. El PC3 refleja cambios relacionados con la AD de las orejas, en cuanto a inserción y protuberancia (Figura 5.2). La dominancia del patrón de AD en la muestra se evidencia en este espacio multivariado.

Sobre las tendencias de variación facial, consideradas como normales se cuenta con el reporte de Ercan et al., (2008) que cita que las distancias lineales asimétricas entre los dos lados de la cara se encontraron con mayor frecuencia en el tercio medio de la cara (hueso maxilar, cigomático esquina y borde orbital inferior) en ambos sexos. De igual manera, (Farrera et al., 2014) muestran que los valores individuales de asimetría indican que todos los individuos incluidos en su análisis mostraron algún grado de asimetría fluctuante para todas las regiones faciales (por ejemplo, el labio superior, la nariz, los ojos y las regiones de la masticación, Figura 5.2). También, reportan una tendencia a la AD mayor en el lado derecho de la cara. Por otro lado, Farkas y Cheung, (1981) observan que la asimetría es muy común, con diferencias entre medias de los lados derecho e izquierda, donde las mediciones presentaron una fluctuación leve (3 mm o 3%), con el lado derecho siendo por lo general más grande. Las asimetrías más comunes y más grandes se encuentran en el tercio superior de la cara. También, Ferrario et al., (2001) no encontraron diferencias por sexo o relacionadas con la edad. Además, la asimetría máxima normal era ligeramente mayor en las mujeres que en los hombres. Para cada sexo, se encontraron los mayores valores en el grupo de los adolescentes. El tragion, gonion y zygon eran los puntos más asimétricos en todos los grupos, mientras que el menos asimétrico fue el endocanthion. Claes et al., (2012), resaltan que por lo menos una asimetría facial leve fue observada en los tejidos blandos faciales en sujetos normales, además de encontrar dimorfismo sexual en todas las variaciones (simétricas, asimétricas, y las interacciones), siendo más grandes en los hombres que en las mujeres. En otro reporte, los hombres y mujeres muestran DA significativa para toda la cara en general, pero no en la nariz. El patrón de DA entre hombres y mujeres era visualmente diferente (Ferrario et al., 1995). En cambio, la AF afectó significativamente la cara completa, pero los efectos mayores se encontraron principalmente en las características faciales específicas, tales como la nariz, tanto para los hombres y mujeres. Además, el patrón de AF también muestra asimetría en la barbilla y la parte superior de la cara. Por último, reporta que existen diferencias de lado entre las asimetrías, el lado derecho de la cara es más grande que el izquierdo, sin distinción de sexo concentrándose las diferencias en la región gonio-labial (Ferrario et al., 1995).

Wells et al., (2006) evaluó la relación de la AF y la tasa de desarrollo fetal, la tasa de desarrollo infantil temprano (relación del peso y la talla al nacer) y la tasa total de desarrollo post-natal (relación del peso y la talla a los 6 meses). Sus resultados no mostraron asociación entre la AF y el crecimiento fetal, no obstante encontraron que los niños obesos a los 6 meses mostraron mayor cantidad de AF que los no obesos.

Özener, (2010a) determinó las diferencias en los niveles de asimetría fluctuante facial

entre sexos bajo diferentes condiciones ambientales. El estudio incluyó a universitarios en condiciones de “estrés ambiental” (cursar el último año de estudio en escuela pública o privada). Sus resultados mostraron que los hombres tuvieron mayor cantidad de asimetría facial que las mujeres, esta diferencia mostró significación estadística en el grupo de nivel socioeconómico bajo (escuela pública) ($p < 0.001$).

El estudio llevado a cabo por Richtsmeier y DeLeon, (2009) intentó determinar si la craneosinostosis sagital prematura se encuentra asociada a la inestabilidad en el cráneo, analizando los niveles de asimetría fluctuante. Utilizando EDMA, encontraron que en contraste con lo esperado, los individuos con craneosinostosis no mostraron un incremento estadísticamente significativo de los niveles totales de asimetría, en comparación con el grupo control. Sin embargo sí pudieron distinguir de manera estadísticamente significativa asimetría fluctuante en el pterion y el proceso clinoides anterior ($\alpha = 0.05$). De igual manera, se halló una correlación significativa de la AF y la pertenencia al grupo con craneosinostosis o al grupo control.

Como se puede observar, la descripción de los patrones de AF es muy diversa y del todo alejada de un patrón establecido. En condiciones ideales, en donde el componente genético del individuo fuese el más adaptado a su ambiente, y éste tuviera un ambiente estable, las perturbaciones azarosas y microscópicas de los procesos biológicos producirían la aparición de la asimetría. La diferencia encontrada en los resultados en la bibliografía permite aseverar que la AF parece como una manifestación dialéctica de los procesos del desarrollo donde los programas genéticos tienden a la simetría. Los datos observados en la muestra permiten ver que existen diferencias entre los países y sexos, cuando éstos fueron caracterizados por el ANOVA, prueba de *Welch*, *Steel-Dwass* y *Tukey-Kramer*. Como en los datos presentados anteriormente, el sexo en el análisis resultó ser significativamente diferente respecto de los valores de AF ($p = 0.0001$). Las mujeres presentan una media superior que la del grupo de los hombres ($p = 0.019$). Tradicionalmente, se ha supuesto que los pómulos prominentes, mandíbulas grandes y mejillas más delgadas son rasgos dimórficos en caras masculinas humanas (Enlow, 1990). Little et al., (2008) prueban el dimorfismo sexual facial en europeos y cazadores-recolectores de África (Hadza) encontrando que el dimorfismo sexual y la simetría en caras son señales de “calidad”, y particularizando que estas diferencias tienen diverso patrón entre sexos y origen poblacional. Las mujeres tienden a valores más altos. Nuestros datos 3D no mostraron un marcado dimorfismo, pero sí un gradiente.

Koehler et al., (2004) evidencian que, en promedio, los varones tienen caras significativamente más grandes, con labios, mentón y pómulos anchos pero con mandíbulas y las fosas nasales más pequeños. Además, informan que los ojos no son sexualmente dimórficos en la muestra analizada.

Luego entonces, la estimación de la asimetría en estudios de variación facial humana es una necesidad importante, ya que aunque pareciera menor o secundaria, los patrones de AD hacen recordar que la asimetría debe ser caracterizada siempre, sin importar el modelo de análisis de variación craneofacial empleado. La clásica postura de utilización de un solo lado de la cara o cráneo puede obviar fuentes de variación importantes como lo describe Klingenberg, (2015) en su revisión de la asimetría como fuente de variación.

Asimetría facial y ancestría
genética

Introducción

Existe una gran cantidad de estudios que demuestran que el interés de los investigadores sobre la asimetría no solo está enfocado en su base genética, sino que está imbuido también de una visión más compleja, donde múltiples factores interactúan durante el desarrollo (Wilson y Manning, 1996; Ferrario et al., 2001; Ercan et al., 2008; Barrett et al., 2012; Claes et al., 2012; Djordjevic et al., 2013).

Los patrones de AI observados en la muestra describen que la AD y la AF son los efectos dominantes de la cara, como muchos otros trabajos han encontrado (Scheib et al., 1999; Gangestad et al., 2001, 2010; Gangestad y Thornhill, 2003; Little y Jones, 2003; Rhodes et al., 2009; Özener, 2010c; Zaidel y Hessamian, 2010; Neby y Ivar, 2013). Además, aunque la asimetría direccional (AD) ha sido reportada en humanos (McIntyre y Mossey, 2002a; Schaefer et al., 2006; DeLeon, 2007; Ercan et al., 2008; Klingenberg et al., 2010), usualmente es considerada como un efecto secundario. Los datos de algunas publicaciones parecen poner de manifiesto que la AD es una parte principal de la variación facial humana (ver DeLeon, 2007; Ercan et al., 2008; Klingenberg et al., 2010; Farrera et al., 2014; Quinto-Sánchez et al., 2015).

Recientemente, Bigoni et al., (2013) reportan una relación significativa de la AD/AF y la estructura socioeconómica. Su análisis identifica altos valores de AD en niveles de bajo estatus socioeconómico en la muestra. En general la AD es considerada como genéticamente determinada, ya que en principio se puede conocer la probabilidad de qué lado de la cara será más o menos desarrollada (Møller y Swaddle, 1997). Otros estudios en animales no humanos han encontrado consistentemente evidencia de AD en la forma de las alas de las abejas (Smith et al., 1997; Klingenberg et al., 2001), mandíbulas de ratón (Leamy et al., 1997) y moscas (Klingenberg et al., 1998).

Hasta la fecha, la forma en que ambas asimetrías faciales (direccional y fluctuante) están determinadas por los efectos genéticos y/o ambientales y su interacción putativa están lejos de ser completamente conocida, por ello la relación entre AF e ID es aun especulativa (Leamy y Klingenberg, 2005).

Una posible explicación para esta falta de precisión es que los datos disponibles para explorar la base genética de las asimetrías faciales es escasa. Además, algunas estimaciones de heredabilidad de AF son contradictorias, reportando valores bajos y no significativos para los caracteres mandibulares de ratones (Leamy, 1999), mientras que otros autores reportan una significativa heredabilidad de la AF en varias especies de moscas (Scheiner et al., 1991; Santos, 2002). De acuerdo a lo revisado, no hay reportes de casos que proporcionan valores de heredabilidad para la AF en rostros humanos. En cuanto a la base genética de la AD, Leamy et al. (2000) encontraron tres QTL significativos que afectan el tamaño de los caracteres mandibulares de ratones y representa el 1% de la variación fenotípica total en la AD, que es menor que el 3.6% obtenido en estimaciones anteriores realizadas en caracteres mandibulares (Leamy, 1984, 1999; Leamy et al., 1997).

El análisis de las asimetrías en las poblaciones mestizas es una vía intuitiva para la investigación, ya que las diferencias potenciales en el patrón y la magnitud de AD y AF en submuestras que llevan niveles variables de mestizaje podrían ser indicativas del impacto de un

genoma heterocigoto sobre la base del desarrollo de ambos tipos de asimetrías. Central a esta pregunta es el intento de comprender los tipos de efectos genéticos que pueden ser relevantes cuando las poblaciones mestizas están ampliamente separadas. Tal como lo ha detallado Ackermann, (2010), se espera una amplia gama de variación fenotípica al considerar las expectativas de variación cuantitativa durante la hibridación. En un modelo poligénico estándar, donde los genes con efectos aditivos son responsables de la expresión de los rasgos continuos en estudio, indicaría que tales rasgos en mestizos deben ser igual a la media de los taxones parentales (Falconer y Mackay, 1997). Esto incluye las poblaciones de seres humanos que recientemente divergieron y luego comenzaron a intercambiar migrantes durante cinco siglos, como es el caso que nos ocupa, en el que se esperan pequeñas diferencias en las frecuencias alélicas. En tales circunstancias, los híbridos F1 típicamente tienen rasgos fenotípicos con valores intermedios respecto a los taxones de los padres (Ackermann, 2010). Sin embargo, los individuos mestizos pueden desviarse de la media debido a muchos factores que pueden afectar a la variación fenotípica en una población híbrida, por ejemplo, cuando las diferencias de una población parental en las frecuencias alélicas combinadas con interacciones dentro (dominancia) y entre (epistasia) alelos en diferentes *loci* produce un efecto acumulativo que a menudo resulta en una variación sustancial (Falconer y Mackay, 1997; Ackermann, 2010), incluyendo una morfología híbrida que no es intermedia (Martínez-Abadías et al., 2006) y / o las asimetrías. En este contexto, la exploración de la expresión fenotípica de las asimetrías tanto a nivel individual como poblacional sería de máxima utilidad para caracterizar las asimetrías faciales individuales y los niveles poblacionales de AD y AF en contexto de mestizaje.

Entre la amplia gama de las poblaciones humanas que han experimentado un flujo génico masivo en su historia reciente, los latinoamericanos son el caso más interesante de triple hibridación en un periodo relativamente corto de tiempo. De hecho, la historia de América Latina ha sido profundamente marcada por la migración internacional (Pellegrino, 2000). Denevan (1992) estimó una población original de alrededor de 50 millones de nativos americanos cuando llegaron los europeos en 1492. La ascendencia genética de las poblaciones de latinos mestizos varía según la región (Wang et al., 2008; Reich et al., 2012; Moreno-Estrada et al., 2014; Ruiz-Linares et al., 2014), y la teoría predice que esto depende de la densidad de población de los grupos de inmigrantes y de los receptores, la relación de la migración, y una amplia gama de factores socioeconómicos (Relethford, 2012). Desde el punto de vista biológico, el proceso de mestizaje en América Latina puede ser considerado como un proceso poblacional generando patrones genéticos y fenotípicos complejos, no lineales (Wang et al., 2008). Por lo tanto, algunos autores denominan a este proceso como "un experimento natural" (Chakraborty y Weiss, 1988). Entre los muchos temas genéticos que deben abordarse, es particularmente interesante investigar si los patrones de flujo de genes, como el principal factor evolutivo de homogeneización en las Américas, dejaron un patrón observable de AD o AF indicando inestabilidad en el desarrollo. Como Klimentidis y Shriver,(2009) sugieren son necesarios más estudios que intenten estudiar la variación de la cara respecto del gradiente de ancestría que cada muestra posea.

En cuanto a la influencia del mestizaje en la AF, no hay acuerdo sobre el tema. Por ejemplo, algunos autores encontraron una correlación negativa entre la heterocigosis y AF (Soulé, 1979; Vrijenhoek y Lerman, 1982; Biémont, 1983; Leary et al., 1984; Livshits y

Kobyliansky, 1985; Mitton, 1993), pero esta visión es cuestionada por otros estudios que reportan correlaciones ausentes o débiles (Beacham, 1991; Clarke y Oldroyd, 1996; Vøllestad y Hindar, 1997). Un meta-análisis realizado por Vøllestad y Hindar (1997) en 118 muestras individuales de animales ectotérmicos y endotérmicos, concluyó que la relación entre la heterocigosis y la AF sólo está débilmente apoyada por los datos disponibles, y que la heterocigosis explica una cantidad muy pequeña de la variación en la inestabilidad del desarrollo entre los individuos y las poblaciones. En los seres humanos, Livshits y Smouse (1993) no encontraron ninguna relación entre la AF y la heterocigosis.

Teniendo en cuenta todo lo antes expuesto, el objetivo es caracterizar la asociación entre la ascendencia genética y la asimetría individual en una muestra de poblaciones mestizas de América Latina. En particular, se pondrá a prueba la hipótesis de que la asimetría individual no está relacionada con la composición genética del individuo. Además, nuestro objetivo es comparar los niveles de AF en la población a través de estimaciones de heterocigosis en todo el genoma, con el fin de probar la hipótesis de que los individuos más heterocigotos tienen valores más altos de AF.

Sujetos y métodos

La muestra

Para éste análisis se emplean los datos del Capítulo V, con un total de 4.104 voluntarios para referencia puede verse la Tabla 4.1. Las pautas metodológicas de la obtención de los patrones de variación asimétrica pueden ser consultadas en el Capítulo V. De igual manera para el caso del protocolo fenotipificación y su digitalización por fotogrametría.

Estimación de la ancestría genética

En cada individuo, se tomó una muestra de sangre de aproximadamente 10 ml en dos *vacutainers* para su almacenamiento en frío. La extracción de ADN se realizó siguiendo los procedimientos estándar de laboratorio (ver Anexo 3). Sobre estas muestras, se obtuvieron datos genómicos en el orden de los 730.525 SNPs contenidos en el chip Illumina's Omni Express BeadChip (ver más detalles en Ruiz-Linares et al., 2014). Todos los SNPs utilizados fueron sometidos a un análisis de equilibrio de ligamiento, y después de eliminar la correlación, 90.000 SNPs fueron válidos para el análisis. La estimación de ancestría se realizó con estos datos de SNPs. La heterocigosis promedio de todo el genoma (*Genome-wide average heterozygosity*) se estimó a partir de estos datos utilizando Plink (Purcell et al., 2007; Yang et al., 2011). La heterocigosis se calcula como: $1 - \text{homocigosis}$, mientras que la homocigosis se estima utilizando el coeficiente de endogamia como el promedio de alelos homocigotos a través de todos los SNPs para un individuo en comparación con el grupo global. Utilizando los datos de SNPs, se calculó la relación de a pares de todos los individuos para construir la matriz de relación genética (*genetic relatedness matrix*), donde la relación se define como la presencia de alelos compartidos entre dos individuos en comparación con el grupo global, a través de un

promedio de todos los SNPs.

Correlación y regresión de los valores de asimetría fluctuante facial sobre covariables

Como se mencionó anteriormente, los valores de asimetría fluctuante facial (AF) se estimaron a partir del ajuste de Procrustes descrito en Klingenberg y McIntyre, (1998) bajo un modelo no isotrópico, evitando así el supuesto de homogeneidad, y utilizando como estimador la distancia de Mahalanobis. Los valores de AF se consideran el rasgo de interés, por lo que se evaluó su regresión lineal contra todas las covariables. La lista de covariables incluye edad, sexo, índice de masa corporal, peso, altura, índice de melanina, heterocigosidad, y el porcentaje de cada ancestría continental. En el caso del índice de masa corporal (IMC), es importante mencionar que algunos estudios anteriores han encontrado una relación entre la AF y el IMC (Milne et al., 2003; Windhager et al., 2013).

Como las tres variables de ancestría suman necesariamente el 100%, para evitar problemas de colinealidad, se mantuvo la ancestría amerindia como la línea de base, incluyendo a la ancestría africana y europea en la regresión (Ruiz-Linares et al., 2014). Todos los cambios en la forma se visualizaron utilizando *morphings* (superficies deformadas) de acuerdo a los procedimientos descritos en Wiley et al., (2005). Además, los cambios en la forma representados por la regresión del componente asimétrico sobre ancestría genética (después de la eliminación de los efectos de las covariables) se combinaron en un gráfico *triplet* obtenido a partir de la distribución de las estimaciones de ascendencia para los tres grupos parentales (americano, africano y europeo). Esto permite observar en un único gráfico la asociación entre la variable de interés (AF) y la proporción de ancestrías en un modelo tri-híbrido como el estudiado aquí.

Resultados

El triplot que muestra la ancestría genética y los cambios en la forma asimétrica indica que los individuos con mayor proporción de ancestría amerindia exhiben un patrón de asimetría direccional derecho relacionado con la implantación de la oreja en la cabeza, pero también con el desplazamiento de la barbilla, la nariz y la parte inferior del frontal (nasion). Por el contrario, los cambios asimétricos asociados al vértice europeo describen variaciones en el lado izquierdo de la cara (Figura 6.1). Finalmente, el vértice africano describe los cambios asociados a la inserción de las orejas a la cabeza y su protrusión lateral en el lado izquierdo, acompañada de cambios en la nariz y el lado izquierdo del frontal (Figura 6.1).

Correlación y regresión de los valores de asimetría fluctuante facial sobre covariables

Como se muestra en las Tablas 6.1 y 6.2, casi la totalidad de las correlaciones fueron significativas ($p < 0.00001$). El sexo, la altura, la melanina, la ancestría africana y la heterocigosidad tienen correlaciones negativas con los valores de AF. Por el contrario, el peso (masa), la edad, el IMC y la ancestría americana mostraron correlaciones positivas. Los

resultados de la regresión múltiple (Tabla 6.2) muestran que los valores de AF dependen en gran medida de la edad, el sexo, la ancestría y la heterocigidad (r^2 modelo general=1.54, $p<0.00001$). Cabe destacar que la asimetría aumenta con la edad (Figura 6.2a), mientras que la AF es menor en varones. Además, la AF muestra una correlación negativa con la heterocigidad (Figura 6.2b). Las ancestrías europea y africana se asocian negativamente con los valores de AF, mientras que la ascendencia indígena se correlaciona positivamente. La altura y el IMC no parecen estar asociados a los valores de AF.

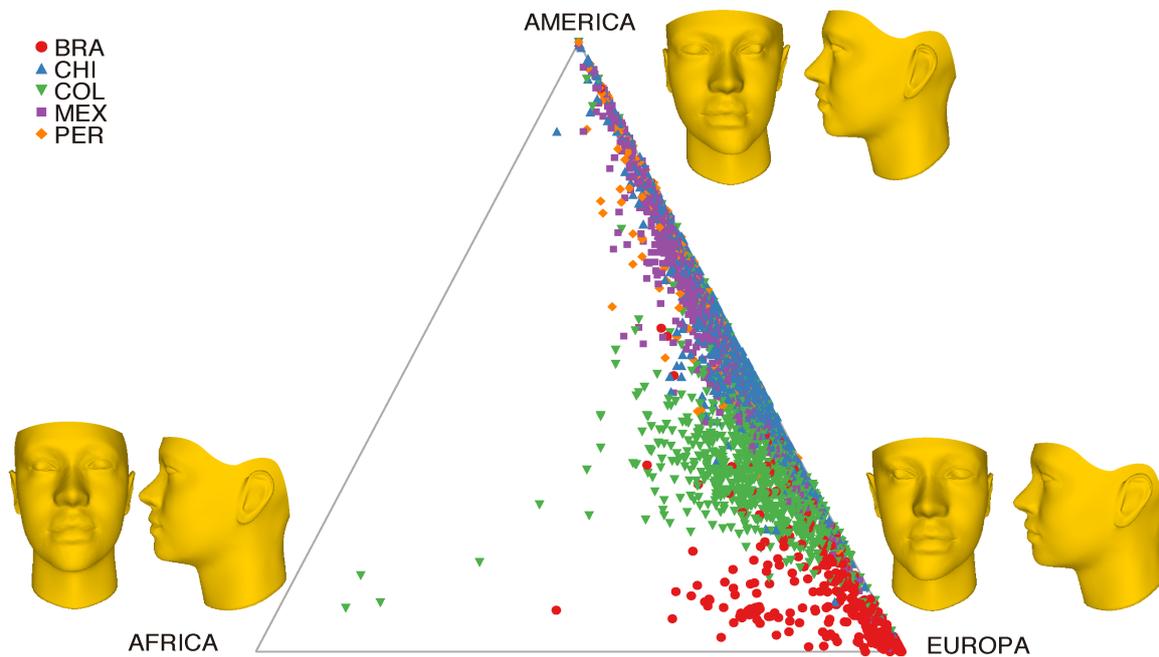


Figura 6.1. *Triplot* de las estimaciones de ancestría genética realizadas sobre el genoma completo y su respectivo cambio asimétrico de la forma, obtenido de la regresión del componente asimétrico de la forma sobre cada eje de ancestría. Los puntos coloreados hacen referencia a los países.

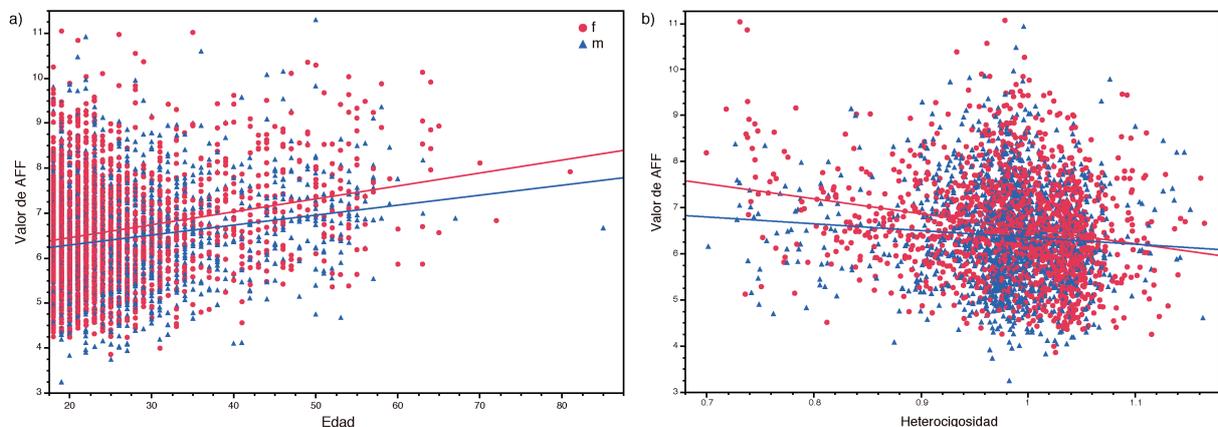


Figura 6.2. Gráficas de las regresiones de los valores de asimetría fluctuante (AF) sobre la edad (a) y la heterocigidad (b). Las líneas representan el ajuste de regresión por sexos (azul-triángulos=hombres, magenta-círculos= mujeres).

Tabla 6.1 Resultados de las correlaciones de los valores de AF sobre las covariables (r^2 modelo general=1.54, $p<0.00001$).

Variable	Correlación	Valor p
Edad	-0.073	3.00E-06
Sexo	0.23-	6.30E-5-
Peso	0.038	-.50E-02
Altura	-0.07	6.40E-06
BMI	0.096	6.90E-- 0
Melanina	-0.045	4.- 0E-03
Ancestría Africana	-0.094	-.40E-07
Ancestría Europea	-0.- -	6.- 0E-- 0
Ancestría Americana	0.- 29	3.30E-- 3
Heterocigosidad	-0.- 46	4.00E-- 6

Tabla 6.2 Resultados de la regresión múltiple realizada con los valores de AF y las covariables (r^2 modelo general=1.54, $p<0.00001$)

Variable	Estimación	EE	t	Valor p
Edad	. 27281	. 199	13.712	2. E-16
Sexo	-.23666	. 52547	-4.5 4	6.88E- 6
Peso	. 19 712	. 122 82	1.56	.1183
Altura	. 1826	. 29 5	.629	.53
BMI	. 5 72	. 4592	1.1 5	.269
Melanina	-. 82 1	. 287882	-2.85	. 44
Ancestría Africana	-1.66279	.347125	-4.79	1.75E- 6
Ancestría Europea	-. 7 41 1	. 98411	-7.155	1. 4E-12
Heterocigosidad	-2.76366	.3 87 6	-8.952	2. E-16

Discusión

Un objetivo central de muchos estudios de hibridación es medir el grado en que éste fenómeno produce la introgresión de material genético entre poblaciones (Strasburg y Rieseberg, 2013). Con la idea de Mayr en mente (Mayr, 1963) de que la divergencia fenotípica a menudo se correlaciona con el grado de aislamiento, el flujo génico tiene el efecto de homogeneizar la composición genética de una población y por lo tanto puede ser visto como una fuerza evolutiva de restricción (Slarkin, 1985), con un efecto contrario al de la diversificación de la selección natural. Además, la migración tiene dos efectos principales: reduce las diferencias entre los grupos, y aumenta las variaciones dentro de los *demes* (Königsberg, 2000; Hamilton, 2009). El análisis de muestras de mestizos humanos contribuye, mediante la identificación de los efectos morfológicos de la hibridación, a la variación de las poblaciones que se han ido distanciando durante la diáspora humana en el Pleistoceno y el Holoceno Temprano. En este contexto, los resultados dan evidencia sobre algunos aspectos relacionados con la dominancia/epistasia explorando si los individuos mestizos son una mezcla equilibrada de rasgos parentales (asimetrías, en este caso), o antes bien un intermedio entre las poblaciones parentales. Como se ha mencionado anteriormente (Ackermann et al., 2006; Ackermann, 2010), los individuos mestizos pueden mostrar una amplia gama de morfologías, asemejándose a un grupo parental u otro, o exhibiendo nuevos fenotipos, dependiendo de las interacciones de dominancia y epistasia entre alelos fijados o predominantes en cualquiera de los grupos parentales. En este contexto, se esperan asimetrías en los individuos altamente mestizos, debido a las alteraciones en el desarrollo introducidas por hibridación a los niveles genéticos y ambientales. En general, esta sección tuvo como objetivo probar empíricamente estas predicciones, y se ha centrado en la detección de variaciones craneofaciales en tamaño y forma en el contexto de un mestizaje genético variable. Existen algunos antecedentes de éste enfoque, por ejemplo, Wijsman y Cavalli-Sforza, (1984) examinaron las consecuencias del flujo de genes en las poblaciones humanas mostrando que, en teoría, en presencia de grandes eventos migratorios, los migrantes producen una

población híbrida por el apareamiento con la población nativa (Wijsman y Cavalli-Sforza, 1984). En su comparación entre las muestras de cráneos coloniales mexicanos, Martínez-Abadías et al., (2006) demostraron que los fenotipos craneofaciales resultantes del mestizaje español-amerindio muestran una posición no intermedia en el morfoespacio entre grupos parentales, lo que sugiere que los fenómenos de heterosis subyacen a la tendencia de fenotipos craneofaciales en poblaciones mestizas. En la misma línea, en su estudio sobre los individuos híbridos de babuino en cautiverio y en poblaciones naturales, Ackermann et al., (2006) verificaron señales significativas de heterosis craneofacial, lo que sugiere cautela ante la suposición de que los individuos híbridos simples mostrarán el promedio de los fenotipos parentales (Ackermann, 2010).

Además de estos y otros estudios similares centrados en diferencias de forma absoluta, la relación entre el mestizaje y las asimetrías craneofaciales en los seres humanos u otros primates ha recibido menos atención. En este contexto, las desviaciones de las condiciones ideales durante la ontogenia (es decir, el estrés ambiental o genético) pueden reducir la "eficiencia" de los procesos normales de desarrollo y aumentar el nivel de AF (Palmer y Strobeck, 1986; Parsons, 1990; Clarke, 1993; Møller y Swaddle, 1997) y/o DA (McIntyre y Mossey, 2002b; Hennessy et al., 2004; Schaefer et al., 2006; DeLeon, 2007; Ercan et al., 2008; Klingenberg et al., 2010; Barrett et al., 2012; Claes et al., 2012). Las asociaciones entre la heterocigosidad y AF se han reportado en mamíferos y otras especies (Soulé, 1979; Biémont, 1983; Leary et al., 1984; Palmer y Strobeck, 1986; Mitton, 1993; Vøllestad, 1999; Leamy et al., 2001), con algunas excepciones (Wooten y Smith, 1986; Patterson y Paton, 1990; Beacham, 1991; Britten, 1996; Gilligan et al., 2000). Además, la AF parece aumentar con el aumento de la homocigosis, la hibridación, la endogamia y la mutación (Palmer y Strobeck, 1986, 1992; Clarke, 1992; Møller y Swaddle, 1997). En un meta-análisis de la AF en relación con la heterocigosidad, Vøllestad, (1999) encontró una correlación negativa global entre heterocigosidad y AF, lo que sugiere que la heterocigosidad parece explicar sólo una cantidad muy pequeña de la variación de inestabilidad en el desarrollo entre los individuos y poblaciones. En la misma línea, Windhager et al., (2014) muestran la falta de correlación entre la heterocigosidad y los valores de asimetría fluctuante facial, aunque se reconoce una limitación en sus resultados debido al relativamente pequeño número de SNPs (102) que se utiliza, lo que puede enmascarar el valor representativo en términos de heterocigosidad total del individuo (ver Capítulo X para una discusión más amplia).

Los resultados de esta tesis indican que tanto AD como AF están presentes en la muestra analizada, con diferentes expresiones en los tres grupos parentales, y sugiere que las asimetrías faciales tienden a disminuir en los individuos mestizos latinoamericanos (Figura 6.2). En general, estos resultados refuerzan lo sugerido anteriormente sobre la falta de asociación entre heterocigosidad en los humanos modernos y la inestabilidad en el desarrollo, al menos asumiendo que esta inestabilidad

es estimada en términos de AF. Además, estos resultados apoyan la idea de que la base genética de tales asimetrías puede ser vista como aditiva, en lugar de dominante / epistática (Ackermann et al., 2006; Ackermann, 2010), y que el paisaje genético y ambiental de los individuos mestizos en América Latina pareciera no representar un caso de inestabilidad en el desarrollo suficiente para desencadenar la expresión de fenotipos asimétricos.

En términos de tipo de asimetría, los datos indican que la AD es más importante que la AF como una fuente de asimetrías faciales, lo que apoya trabajos previos que sugieren un mayor componente de AD en la variación normal asimétrica en el cráneo humano, la cara y la dentición (Schaefer et al., 2006; DeLeon, 2007; Ercan et al., 2008; Barrett et al., 2012; Claes et al., 2012), así como en muestras con dismorfologías (McIntyre y Mossey, 2002b; Hennessy et al., 2004; Klingenberg et al., 2010). Las opiniones tradicionales establecen que AD está más determinada genéticamente, por lo que no podría ser utilizada como un proxy para la estabilidad de desarrollo (Palmer, 1994). Sin embargo, otros autores sugieren que la AD también podría ser indicativa de ciertos mecanismos que implican inestabilidad del desarrollo (Graham et al., 1993; Møller y Swaddle, 1997; Smith et al., 1997). Más específicamente, Graham et al. (1993), utilizando el modelo de morfogénesis reacción-difusión Turing Rashevsky, demostraron que tanto antiasimetría (AA) como AD pueden ser inducidas por un simple cambio de los niveles de retroalimentación y la inhibición en el modelo. Por desgracia, los datos de esta tesis no son apropiados para probar la hipótesis de AD como un *proxy* para la inestabilidad del desarrollo, pero es interesante observar cómo los niveles de AD y AF difieren entre los grupos parentales (por ejemplo, entre las personas que llevan alto porcentaje de ancestría europea, amerindia, o africana). Esto podría ser indicativo de que la condición basal para cualquier población dada no es la simetría perfecta, sino que algún nivel variable de ambos, AD y AF, como se ha demostrado en una publicación reciente en mestizos Mexicanos (Farrera et al., 2014).

Por otro lado, los patrones de AF han sido ampliamente asumidos como indicadores de inestabilidad del desarrollo (Palmer y Strobeck, 1986; Livshits y Kobylansky, 1991; Møller y Swaddle, 1997; Milne et al., 2003; DeLeon, 2007; Little et al., 2008; DeLeon y Richtsmeier, 2009; Özener, 2010a; c; Özener y Fink, 2010; Weisensee, 2013). Los resultados obtenidos aquí indican que, a pesar de que la AF explica una fracción más pequeña de la variación respecto de la AD, su contribución a la cantidad total de la variación asimétrica es significativa. Curiosamente, las pruebas de comparación de la matriz de covarianza produjeron importantes grados de proporcionalidad entre las estructuras de covarianza individuales y asimetría, lo que sugiere que los mismos procesos de desarrollo son la base de la expresión de la variación de la forma en ambos niveles (Klingenberg y McIntyre, 1998). Otro aspecto importante cuando se trata de comparaciones entre AD y AF es que, por lo general, se supone que la expectativa "normal", o fenotipo óptimo para una población es $AF=0$ o perfecta

simetría, que no es necesariamente un fuerte hipótesis nula como Debat y David, (2001) sostiene y Farrera et al., (2014) demuestran para una muestra de estudiantes mexicanos.

Por último, es importante contextualizar que una gran cantidad de investigación sobre las asimetrías faciales está dirigido a probar una potencial dependencia de los índices de estatus socioeconómico, educativo, o nutricionales de una amplia gama de poblaciones y contextos culturales (DeLeon, 2007; Gawlikowska et al., 2007; Gray y Marlowe, 2009; Özener, 2010abc, 2011; Bigoni et al., 2013; Hope et al., 2013). En general, estos análisis parten de la premisa de que la exposición a estrés nutricional o psicosocial durante la gestación y el desarrollo prenatal podría derivar en una alteración de las vías de desarrollo "normales" (simetría perfecta) que conducen a una AD, pero principalmente a AF. Sin embargo, estas comparaciones no suelen ponderar el posible efecto de la composición genética en sus muestras. Por ello, el análisis de regresión de la forma de la cara asimétrica en la ancestría genética, que reveló que su magnitud tiende a disminuir con el mestizaje, brinda un contexto clave para las comparaciones que se presentan en los siguientes capítulos. Aquí se verifica que los individuos con mayores proporciones de un bagaje genético parental son más asimétricos, y sus rasgos asimétricos varían en función de la población parental. Este resultado parece ser concordante con los análisis previos que sugieren que no existe un patrón único de asimetría en nuestra especie (Farkas y Cheung, 1981; Ras et al., 1994; Ferrario et al., 1995; Shaner et al., 2000; Smith, 2000; Ercan et al., 2008; Klingenberg et al., 2010; Özener, 2010c).

Asimetría facial y estatus
socioeconómico

Introducción

La cara humana es una estructura bilateral compleja compuesta de una combinación de estructuras que varían simultáneamente de manera integrada y modular. Como parte del cráneo, la cara depende de la integración de la base del cráneo (Enlow, 1990; Lieberman et al., 2000a; b; Rosas y Bastir, 2002; Goodrich, 2005; Bastir y Rosas, 2008), pero también está íntimamente ligada a la variación en el crecimiento del cerebro (Cordero et al., 2011; Marcucio et al., 2011). Desde un punto de vista evolutivo, la cara es un carácter altamente derivado (Trinkaus, 2003), es la parte más compleja de la cabeza en términos arquitecturales (Lieberman, 2011), y es la estructura esquelética donde se extiende mucho el proceso de maduración (Bastir et al., 2007). Todos los hechos mencionados anteriormente son resultado o consecuencia de un desarrollo complejo, donde los patrones de covariación emergen desde diferentes procesos de generación de varianza que se superponen paulatinamente y que se suman o integran secuencialmente durante el proceso de ontogenia individual (Hallgrímsson et al., 2007).

Además de estos efectos netamente biológicos, las caras de primates han jugado un rol importante en procesos como sociabilización, expresiones, comunicación y selección sexual (Thornhill y Gangestad, 1999; Fink y Penton-Voak, 2002; Luxen y Van De Vijver, 2006).

También, se ha evidenciado que la información proporcionada por la cara juega un papel importante en las interacciones sociales (e.g. Bruce y Young, 1986), categorización (e.g. Hugenberg y Bodenhausen, 2003; Mason et al., 2006), y el proceso de identificación de otras personas (e.g. Hancock et al., 2000). La psicología evolutiva define que algunos caracteres faciales pueden influir en la elección de pareja por lo que podrían ser considerados como verdaderos signos de calidad genética individual (Møller y Swaddle, 1997; Møller y Thornhill, 1997b; Thornhill y Møller, 1997; Gangestad y Simpson, 2000). Sin embargo, el establecimiento de los rasgos faciales humanos o expresiones en tanto adaptaciones biológicas requiere la formulación y comprobación de hipótesis evolutivas. La noción de forma de la cara como señal de niveles sociales o interacciones es todavía un concepto muy crítico (Schmidt y Cohn, 2001). En este contexto, la simetría facial se ha propuesto como un proxy para la calidad fenotípica y genética (Swaddle y Cuthill, 1995; Rhodes et al., 1998, 1999; Scheib et al., 1999; Zaidel y Cohen, 2005; Zaidel y Deblieck, 2007). La AF ha sido relacionada con la selección sexual y el atractivo (Scheib et al., 1999; Gangestad et al., 2001; Gangestad y Thornhill, 2003; Little y Jones, 2003; Rhodes et al., 2009; Zaidel y Hessamian, 2010; Neby y Ivar, 2013), aunque también existen reportes en contra de esa idea y defendiendo una visión de un carácter no necesariamente selectivo cuando la AF se encuentra dentro del rango normal de variación poblacional (Farrera et al., 2014). Dentro de la gama de relaciones descritas para la AF, algunos otros investigadores reportan asociación con el estatus socioeconómicos (SES) (DeLeon, 2007; Gawlikowska et al., 2007; Özener, 2010a; b, 2011; Bigoni et al., 2013). Asimismo, algunos estudios reportan valores significativos más altos de AF en grupos con SES bajos, donde los hombres muestran los valores más altos de AF que las mujeres (Özener, 2010a), o relativamente valores más altos de AF en muestras relacionadas con altos niveles de estrés (DeLeon, 2007). Desde una perspectiva diacrónica, hay evidencia de que los cráneos modernos presentan valores más altos de AF cuando éstos son comparados con muestras medievales de una población de Polonia

(Gawlikowska, 2007). Por otro lado, un reciente trabajo que analiza 129 cráneos de una colección del medievo temprano, divididas en una clase socioeconómica alta y otra de una clase media o baja, El estudio detecta AD en la colección de bajo estrato socioeconómico (Bigoni et al., 2013). Además, encontró diferencias entre los sexos respectivo a la AF, donde las mujeres presentaron significativamente valores más altos de AF, controversialmente, para la muestra de mejor posición socioeconómica (Bigoni et al., 2013). La idea anterior da cuenta de la diversidad de patrones referentes de la asimetría individual facial humana. Finalmente, la AF se ha asociado con el estado de salud y hay alguna evidencia de mayores tasas de AF en las personas que murieron a causa de enfermedades degenerativas respetan a los que murieron a causa de enfermedades infecciosas, los hombres exhiben valores de AF más altos que las mujeres (Weisensee, 2013). Todo lo anterior se demarca dentro de un programa científico denominado biología de la pobreza o de la desventaja (Tomas, 1998; Conley y Bennett, 2000; Shonkoff et al., 2009; Boyce, 2012), que es definida como la dinámica de cómo las personas ajustan sus constricciones alrededor de ellos usando su biología organización social e ideología (Tomas, 1998). Algunas publicaciones han relacionado determinantes sociales de la salud (Marmot y Wilkinson, 2005) Aunque tradicionalmente se asociaba que la salud seguía un gradiente relacionado con la posición social, en la actualidad se reconoce que es un proceso más complejo (Marmot y Wilkinson, 2005).

El punto básico del planteamiento de la psicología evolucionista (PE) es que las asimetrías y el ruido en el desarrollo al estar fuertemente determinadas linealmente son una evidencia tangible de la sumatoria de estrés acumulada en el rostro (Møller, 1990, 1992; Møller y Thornhill, 1997a; b), sin embargo, esta aseveración ha sido desafiada por algunos trabajos (McKenzie y Clarke, 1988; Graham et al., 1993; Bjorksten et al., 2000; Lens et al., 2002a). El primer punto en contra del la PE es que las bases genéticas y del desarrollo de la AF son pobremente entendidas (Bjorksten et al., 2000), y solo algunos pocos precedentes dan luz de la compleja estructura de genes responsables de la expresión de los rasgos faciales (Mezey et al., 2000; Liu et al., 2012; Paternoster et al., 2012; Peng et al., 2013; Adhikari et al., 2015, 2016) y la evidencia de la presente tesis con la publicación asociada (Quinto-Sánchez et al., 2015). Algunos puntos importantes deben ser considerados antes de establecer hipótesis evolutivas con el objetivo de relacionar la AF y la estabilidad de desarrollo son: 1) un cierto grado de asimetría facial no es poco común en individuos sanos “normales”, más bien, puede ser visto como una regla (Ercan et al., 2008; Farrera et al., 2014); 2) la utilidad de la AF como un indicador de la estabilidad del desarrollo individual es pobre a menos de que la varianza de la estabilidad de desarrollo sea extremadamente grande (Houle, 2000); 3) no necesariamente los valores bajos de SES potencialmente pueden desencadenar acontecimientos de inestabilidad en el desarrollo que se deriven en niveles de AF altos (Conley y Bennett, 2000; Debat y David, 2001; Ercan et al., 2008; Bigoni et al., 2013; Farrera et al., 2014); y 4) el análisis de las asimetrías en las poblaciones mezcladas merece especial atención ya que las diferencias potenciales en el patrón y la magnitud de la AF en sub-muestras que transportan niveles variables de mezcla podría ser un indicativo del impacto en la arquitectura genómica del heterocigoto sobre la base del desarrollo de las asimetrías. Teniendo en cuenta todo lo anterior, la exploración de las asimetrías en el morfoespacio ocupado por individuos mezclados diferentes en su estatus socioeconómico sería de ayuda para estimar si la AF se asocia a SES sobre las poblaciones humanas naturales.

En éste capítulo, se intenta contrastar si, además de los efectos potenciales del mestizaje sobre ella, la AF está vinculada a la desigualdad socioeconómica en una muestra de individuos mestizos pertenecientes a cinco poblaciones latinoamericanas. Se debe tener en cuenta que, este enfoque se concentra en poblaciones “normales” (Debat y David, 2001; Farrera et al., 2014), en lugar de concentrarnos en condiciones de extrema pobreza/desventaja, es decir observar el rango de variación observada en la AF respecto del SES en población urbana moderna latinoamericana. Se espera que si la AF es un indicador de la ID aquellos individuos con menor educación, menor ingreso de dinero por mes y menos bienestar, deberán ser aquellos que presenten tasas de AF mayores.

Sujetos y método

La muestra

Para éste capítulo el criterio de inclusión/exclusión fue que cada individuo tuviera los datos de su educación, ingreso mensual fijo y frecuencia de electrodomésticos, obtenidas en la encuesta socioeconómica realizada por el proyecto CANDELA durante la toma de datos. De esta manera, solo 2019 individuos, entre 18 y 63 años (media=25.73 de=6.64; mujeres=850 media=25.05 de=6.23; hombres=1165 media=26.22 de=6.88), tuvieron toda la información completa o coincidente. Igualmente, se siguieron los criterios generales de inclusión/exclusión sobre antecedentes de dismorfologías craneofaciales, tratamientos de ortodoncia y hormonales, así como trauma facial severo. La tabla 7.1 detalla la información antes presentada y contextualiza el sexo la edad y el país.

Tabla 7.1 Detalles de la muestra concernientes a la edad, sexo y país para un total de 2019 voluntarios.

País	Edad							
	Adulto joven (18-20)		Adulto (20-40)		Adulto medio (40-60)		Adulto mayor (60-más)	
	f	m	f	m	f	m	f	m
Brasil	28	13	129	65	5	7	0	0
Chile	3	115	104	525	6	40	1	0
Colombia	106	60	208	173	0	0	0	0
México	93	40	144	111	0	0	0	0
Perú	1	3	24	15	0	0	0	0
Totales	231	231	609	889	11	47	1	0

El fenotipo facial se fijó como se describe en el capítulo Sujetos, Materiales y Método, de igual manera para el caso de la ancestría genética y heterocigosidad (He) ver el Capítulo III. Finalmente, la obtención de la asimetría individual puede referirse en el Capítulo II.

Construcción de los indicadores SES: acercamiento multivariado.

En primera instancia, se reconoce el carácter complejo y multifactorial (no lineal) intrínseco a la “naturaleza” del estatus socioeconómico (SES, Braveman et al., 2005). Es así que,

el modelo que se plantea aquí está integrado por la asociación de tres variables: el grado de educación al momento de la toma de datos, el salario fijo mensual (SFM) y un índice de bienestar (IB). Se siguieron los estándares generales de la medición del SES (e.g. Vyas y Kumaranayake, 2006), la variable educación se tomo como el máximo nivel de estudios a la toma de la muestra, se incluyó como variable merística con cuatro categorías: primaria (1), secundaria (2), universidad (3) y posgrado (4). En algunos países la secundaria es dividida en dos categorías, sin embargo dicha clasificación fue unificada ya el periodo de tiempo es incluido por ésta (e.g. preparatoria en México). El SFM fue medido en la moneda de cada país y estandarizado por medio de su conversión a dólares para hacer conmensurable su valor. Se tomo como referencia de cambio el día 18 de octubre del 2014 bajo los siguientes valores por un dólar EEUU: Chile= 497.5, Colombia= 1881.9, México=12.8, Brasil=2.1, Perú= 2.7. El IB fue definido, mediante el uso de técnicas multivariadas, como los valores del primer componente principal resultante de una análisis de componentes principales (PCA) realizado sobre los datos reportados para las frecuencias de electrodomésticos (e.g. numero de autos, radio, TV's, etc). Los resultados de la construcción de este índice se detallan a continuación. La matriz de correlaciones de éstos datos muestra bajos niveles de correlación entre variables, lo que le da certidumbre a la construcción del índice (Tabla 7.2). Además, mediante el análisis de las cargas de cada componente principal es posible decir, que una buena proporción de la varianza es capturada por el PC1 (Figura 7.1a), todo ellos para el extremo positivo (Tabla 7.3, Figura 7.1b). El PC1 recobró el 29.7% de la varianza de los datos (7.4). Finalmente, se optó por no modificar la naturaleza continua de los datos, de esta manera las variables socioeconómicas no fueron discretizadas.

Tabla 7.2 Matriz de correlaciones entre las variables base para el IB.

	TV	Radio	Baño	Auto	Serv domes	Aspiradora	Lavadora	DVD	Nevera	Freezer	PC	Lavaplatos	Motocicleta
Radio	0.512												
Baño	0.458	0.399											
Auto	0.400	0.295	0.387										
Serv domes	0.162	0.156	0.408	0.316									
Aspiradora	0.267	0.220	0.175	0.396	0.133								
Lavadora	0.374	0.319	0.302	0.247	0.122	0.259							
DVD	0.575	0.477	0.334	0.373	0.177	0.269	0.326						
Nevera	0.275	0.248	0.325	0.138	0.133	0.091	0.268	0.224					
Freezer	0.260	0.214	0.253	0.100	0.110	0.043	0.203	0.195	0.164				
PC	0.457	0.366	0.482	0.400	0.315	0.209	0.243	0.412	0.261	0.201			
Lavaplatos	0.144	0.099	0.127	0.167	0.090	0.170	0.120	0.143	0.079	0.108	0.080		
Motocicleta	0.071	0.084	0.094	0.067	-0.003	-0.048	0.048	0.070	0.106	0.112	0.117	-0.016	
Bicicleta	0.288	0.276	0.155	0.201	0.083	0.185	0.212	0.285	0.096	0.106	0.210	0.115	0.076

Tabla 7.3 Cargas de las variables integradoras del IB sobre cada uno de los PC.

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10	PC11	PC12	PC13	PC14
TV	0.763	0.033	0.190	-0.093	-0.130	-0.109	-0.044	-0.219	-0.025	-0.089	0.035	-0.096	-0.290	0.436
Radio	0.672	0.091	0.222	-0.138	-0.153	-0.133	0.055	-0.182	-0.113	0.481	-0.243	0.013	0.302	0.015
Baño	0.694	0.174	-0.370	0.049	-0.065	-0.024	0.061	-0.005	-0.078	0.017	-0.353	-0.114	-0.357	-0.263
Auto	0.630	-0.333	-0.225	-0.149	0.222	0.102	-0.186	-0.047	0.072	-0.143	0.027	-0.491	0.235	-0.022
Serv domes	0.422	-0.069	-0.707	0.027	0.083	-0.135	0.148	0.270	-0.168	0.239	0.280	0.113	0.020	0.146
Aspiradora	0.451	-0.577	0.087	-0.020	0.081	0.317	-0.337	0.155	0.279	0.213	-0.072	0.250	-0.142	-0.002
Lavadora	0.553	0.005	0.250	0.169	-0.225	0.305	-0.137	0.362	-0.513	-0.191	-0.005	0.040	0.089	-0.007
DVD	0.703	-0.052	0.227	-0.161	-0.075	-0.128	-0.009	-0.265	-0.055	-0.003	0.472	0.082	-0.084	-0.307
Nevera	0.445	0.370	-0.029	0.230	-0.267	0.524	0.320	0.013	0.360	0.051	0.139	-0.079	0.061	0.020
Freezer	0.379	0.403	0.084	0.450	0.015	-0.406	-0.445	0.233	0.242	0.014	0.056	-0.037	0.058	-0.018
PC	0.679	0.104	-0.243	-0.185	0.032	-0.074	0.033	-0.125	0.147	-0.406	-0.158	0.388	0.221	0.020
Lavaplatos	0.262	-0.330	0.080	0.726	0.349	-0.026	0.243	-0.302	-0.103	-0.029	-0.042	0.055	0.030	0.010
Motocicleta	0.148	0.542	0.106	-0.168	0.720	0.287	-0.113	-0.042	-0.117	0.091	0.031	0.054	-0.050	0.024
Bicicleta	0.424	-0.130	0.412	-0.167	0.252	-0.249	0.472	0.474	0.150	-0.057	-0.044	-0.057	-0.036	-0.024

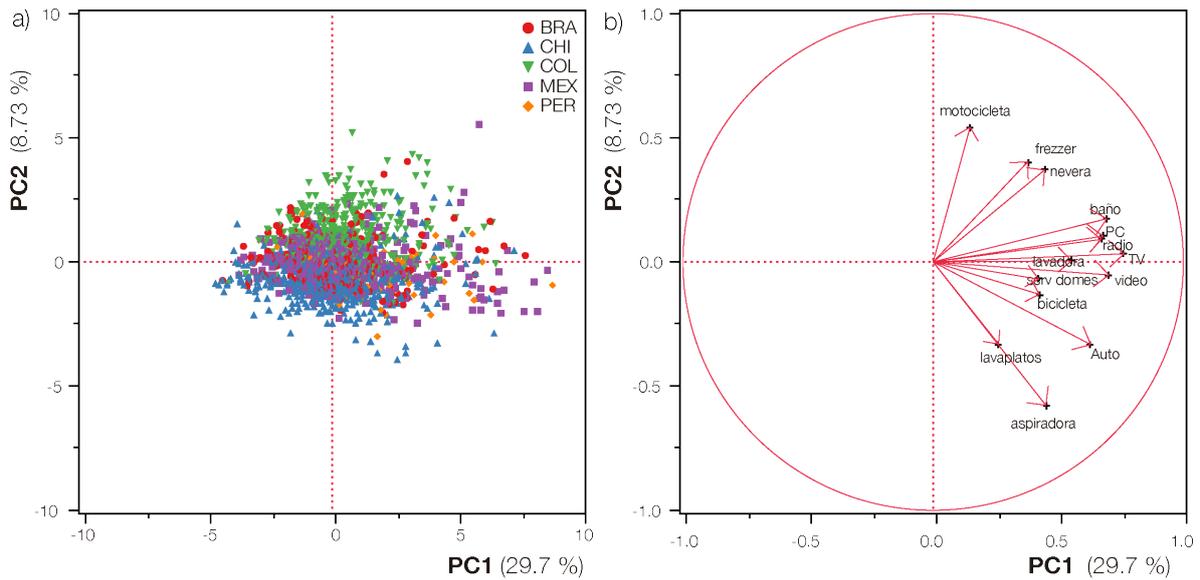


Figura 7.1 Gráficos resultantes del análisis de componentes principales (PCA) sobre las frecuencias de electrodomésticos coledigas en la encuesta socioeconómica realizada a cada voluntario CANDELA. a) Gráfico de dispersión del PC1 y PC2, los colores y forma de cada punto indican la asignación de país. b) Cargas de las variables sobre el PC1 y PC2 en el análisis (ver Tabla 7.3 y 7.4 como referencia).

Tabla 7.4 Eigenvalores, porcentajes de varianza, estadístico χ^2 , de y valor p, resultantes del PCA del IB.

PC	eigenvalor	%	% acumulado	χ^2	de	p
1	4.164	29.745	29.745	6003.313	104	<.0001
2	1.222	8.728	38.473	1555.697	90	<.0001
3	1.149	8.204	46.677	1248.363	77	<.0001
4	0.981	7.005	53.683	951.089	65	<.0001
5	0.941	6.719	60.402	774.865	54	<.0001
6	0.859	6.132	66.534	592.242	44	<.0001
7	0.794	5.669	72.203	447.126	35	<.0001
8	0.769	5.492	77.695	324.705	27	<.0001
9	0.653	4.662	82.357	180.049	20	<.0001
10	0.578	4.131	86.488	110.586	14	<.0001
11	0.544	3.887	90.375	76.464	9	<.0001
12	0.515	3.678	94.053	47.702	5	<.0001
13	0.454	3.243	97.295	16.592	2	0.0002
14	0.379	2.705	100	0	0	

Análisis de regresión multivariante entre las variables SES y la asimetría facial.

La exploración de la asociación entre los valores de asimetría fluctuante facial (vAF) y el modelo SES se evaluó mediante el uso de una regresión multivariada incluyendo la edad, el BMI, melanina, país y la He como covariables. En el capítulo IV ya se ha descrito el efecto de la He y la ancestría genética, respecto de los vAF. Por lo tanto, en éste capítulo se presentan los resultados con los datos crudos y sobre los residuales entre los vAF y la He, como forma de estandarizar dicho efecto en la muestra. Todos los datos son presentados por país y sexo, ya se ha reportado la estructura poblacional de los vAF en la muestra (ver Tabla 5.3, Capítulo V) debido a que se identificaron diferencias en un diseño ANOVA de una vía con una prueba *pos hoc* Tukey-Kramer para los vAF, SFM y IB; y χ^2 . Para educación se presentan todos los resultados por sexo y país (Tabla 7.5 y 7.7). Además, se correlacionaron los vAF con y sin efecto de la He y las diferentes variables SES (que también se pueden ver en la Gráfica 7.2) para

conocer la intensidad de la relación de dichas variables (Tabla 7.6).

Figura 7.5 Resultados del Anova de una vía y χ^2 entre los vAF y las variables incluidas en el análisis SES.

Variable	gl	ss	ms	f	p
SFM	4	129060056.5	32265014.11	73.5394	<.0001
IB	4	387.9702	96.9925	25.9985	<.0001
	df	Log	R ²	X ²	p
Educación	12	79.897239	0.0484	180.248	<.0001

Tabla 7.6 Correlaciones, por sexo, entre los valores de AF y las variables SES, corregido para la heterocigosidad (vAF He) y sin corregir (vAF). Para cada valor un de correlación una valor p.

Sexo	SES	vAF		vAF He	
		Correlación	Valor-p	Correlación	Valor-p
Mujeres	Educación	0.1026	0.0026	0.1153	0.0007
	SFM	0.1337	<.0001	0.1447	<.0001
	IB	0.0126	0.7128	0.0162	0.6355
Hombres	Educación	0.0658	0.0245	0.0809	0.0057
	SFM	0.0634	0.0302	0.0664	0.0232
	IB	0.0653	0.0256	0.0778	0.0078

Tabla 7.7 Pruebas *pos hoc* de las variables incluida en el modelo SES y los vAF entre países.

Variable	Iteración	Diferencia	ES dif	Valor p	
	BRA	COL	713.886	50.778	<.0001
	BRA	PER	545.251	109.452	<.0001
	CHI	COL	539.973	36.806	<.0001
	CHI	PER	371.338	103.711	0.0032
SFM	BRA	MEX	370.838	53.810	<.0001
	MEX	COL	343.049	43.833	<.0001
	CHI	MEX	196.924	40.888	<.0001
	MEX	PER	174.414	106.408	0.4724
	BRA	CHI	173.913	48.258	0.003
	PER	COL	168.635	104.907	0.4927
	PER	CHI	2.566	0.302	<.0001
	PER	BRA	2.261	0.319	<.0001
	PER	COL	2.097	0.306	<.0001
	PER	MEX	1.787	0.310	<.0001
IB	MEX	CHI	0.779	0.119	<.0001
	MEX	BRA	0.474	0.157	0.0216
	COL	CHI	0.469	0.107	0.0001
	MEX	COL	0.310	0.128	0.1088
	BRA	CHI	0.305	0.141	0.1918
	COL	BRA	0.164	0.148	0.8041
		PER	COL	0.994	0.160
	PER	CHI	0.716	0.158	<.0001
	PER	MEX	0.617	0.162	0.0013
	PER	BRA	0.579	0.166	0.0047
vAF	BRA	COL	0.415	0.077	<.0001
	MEX	COL	0.377	0.067	<.0001
	CHI	COL	0.278	0.056	<.0001
	BRA	CHI	0.137	0.073	0.3376
	MEX	CHI	0.099	0.062	0.5047
	BRA	MEX	0.038	0.082	0.9905
			Std Err Dif	Z	p-Value
	PER	CHI	28.051	7.233	<.0001
	PER	COL	22.429	4.645	<.0001
	MEX	CHI	16.196	5.588	<.0001
	COL	CHI	16.274	4.413	<.0001
Edu	PER	MEX	17.390	4.089	0.0004
	PER	BRA	12.829	1.436	0.6045
	MEX	COL	14.814	1.236	0.7301
	MEX	BRA	13.223	-3.725	0.0018
	COL	BRA	15.085	-4.757	<.0001
	CHI	BRA	17.325	-8.673	<.0001

Resultados

Las correlaciones, producto del modelo de regresión, muestran que los vAF presentan algunas asociaciones, aunque muy bajas (0.3 como máximo) (Tabla 7.6). Todo el modelo tiene una correlación del 2.3% para mujeres y 1.7% para hombres con el efecto de la He, cuando éste efecto es “estandarizado” la correlación es aun mas baja. De manera general hay correlaciones

para la edad, melanina, ancestría europea, educación y SFM. Cabe aclarar que éstos valores tienen una patrón diferencial por país. En adición la regresión múltiple muestra valores de significancia para la edad, BMI, país y ancestría europea (Tabla 7.7) pero ninguna asociación son las variables del modelo SES. Específicamente, se puede decir que la AF aumenta con la edad, en ambos sexos y sin tener un cambio por estandarización de la He. Adicionalmente, se identifica una asociación con el BMI, independiente de la He, donde a mayor AF mayor valor de BMI, se comporta así en ambos sexos pero es más significativo en hombres. Los detalles de la asociación con la ancestría europea se pueden revisar en el Capítulo III. En el caso del modelo SES, ninguna de las variables incluidas exhiben una asociación con los vAF (Tabla 7.7). Las gráficas univariadas de las comparaciones pareadas de los vAF y SES define patrones opuestos a los esperados en función de la teoría establecida por el programa de investigación de la biología de la pobreza.

Tabla 7.6 Correlaciones de las covariables y los valores de AF en la muestra. Se presentan los datos por país, sexo y con y sin el efecto de la heterocigosidad/ancestría. Las correlaciones más altas están señaladas en color y las celdas con recuadro son significativas.

Sexo	Pais	Modelo general				Brasil				Chile				Colombia				México				Perú			
		f	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f	m		
Covariable		cHe	sHe	cHe	sHe	cHe	sHe	cHe	sHe	cHe	sHe	cHe	sHe	cHe	sHe	cHe	sHe	cHe	sHe	cHe	sHe	cHe	sHe	cHe	sHe
Edad		0.2035	0.2052	0.1556	0.1546	0.2152	0.2069	0.2344	0.2250	0.0080	0.0257	0.2031	0.2070	0.0752	0.0709	0.0252	0.0190	-0.0283	0.0060	0.0597	0.0753	0.3877	0.3513	-0.0691	-0.0936
BMI		0.0777	0.0656	-0.0033	-0.0166	0.0850	0.0884	0.0506	0.0495	-0.0325	-0.0226	0.0185	0.0214	-0.0182	-0.0246	-0.1073	-0.1128	-0.0179	-0.0274	-0.0748	-0.0961	-0.0895	-0.1823	0.1277	0.1230
Melanine		-0.0280	-0.0669	-0.0267	-0.0711	-0.0699	-0.0445	0.1070	0.1330	0.0644	0.0153	-0.0549	-0.0862	-0.0941	-0.0779	-0.0423	-0.0565	0.0267	-0.0197	0.0309	-0.0384	-0.2323	-0.1956	-0.4459	-0.4896
Africa		-0.1394	-0.0565	-0.0062	0.0604	-0.0578	-0.0034	0.2106	0.2755	0.0393	0.0972	0.0326	0.0651	-0.0443	0.0231	-0.0829	-0.0300	0.0269	0.1103	0.0770	0.1395	-0.0109	0.0930	0.0791	0.1948
America		0.1012	-0.0357	0.0647	-0.0561	0.0189	-0.0073	0.1091	0.1024	0.2216	0.1083	0.0345	-0.0614	-0.0331	-0.0868	0.0103	-0.0613	0.0660	-0.1041	0.0172	-0.1313	-0.2110	-0.3598	-0.1272	-0.3190
Europa		-0.0696	0.0508	-0.0661	0.0419	0.0144	0.0073	-0.2051	-0.2414	-0.2351	-0.1265	-0.0387	0.0547	0.0550	0.0629	0.0347	0.0688	-0.0719	0.0926	-0.0266	0.1179	0.2320	0.3619	0.1191	0.2993
Educación		0.1026	0.1153	0.0658	0.0809	-0.0119	-0.0124	0.0615	0.0625	0.0031	0.0287	0.0870	0.0901	0.1119	0.1130	-0.0522	-0.0558	0.0115	0.0468	0.0694	0.0830	0.3633	0.2839	-0.1076	-0.1222
SFM		0.1337	0.1447	0.0645	0.0642	0.1057	0.1123	0.0434	0.0555	-0.1221	-0.0962	0.1696	0.1769	0.0658	0.0659	-0.0634	-0.0668	-0.0810	-0.0468	0.0126	0.0306	0.2570	0.2359	-0.0565	-0.0996
IB		0.0126	0.0162	0.0653	0.0778	-0.0118	-0.0107	-0.0329	-0.0365	-0.1169	-0.0866	0.0660	0.0744	0.0471	0.0512	0.1316	0.1297	-0.0099	0.0321	-0.1354	-0.0941	-0.0353	-0.0112	-0.1208	-0.0320

cHe= con efecto de la He, sHe= sin el efecto de la He

Tabla 7.7 Resultados de la regresión multivariada entre las covariables y los valores de AFF. Se presentan los valores generales, por sexo y con y sin el efecto de heterocigosidad/ancestría. En colores se señalan los valores de significación más altos (verde) y aquellos de menor intensidad (rojo).

Sexo	Modelo general								Mujeres								Males							
	Estimación		DE		t	p			Estimación		DE		t	p			Estimación		DE		t	p		
Covariate	sHe	cHe	sHe	cHe	sHe	cHe	sHe	cHe	sHe	cHe	sHe	cHe	sHe	cHe	sHe	cHe	sHe	cHe	sHe	cHe	sHe	cHe	sHe	cHe
Edad	0.024	0.023	0.004	0.004	5.990	5.840	<.0001	<.0001	0.025	0.025	0.007	0.007	3.720	3.650	0.000	0.000	0.025	0.025	0.005	0.005	5.150	5.060	<.0001	<.0001
BMI	-0.016	-0.017	0.006	0.006	-2.520	-2.670	0.012	0.008	-0.003	-0.004	0.009	0.009	-0.300	-0.420	0.765	0.675	-0.018	-0.018	0.009	0.009	-2.000	-2.030	0.046	0.043
Melanina	-0.011	-0.011	0.005	0.005	-2.080	-2.090	0.0373	0.0368	-0.007	-0.007	0.008	0.008	-0.820	-0.840	0.414	0.403	-0.008	-0.008	0.006	0.006	-1.210	-1.170	0.228	0.244
Pais	-0.026	-0.041	0.029	0.029	-0.880	-1.380	0.377	0.168	-0.233	-0.252	0.045	0.045	-5.220	-5.640	<.0001	<.0001	0.083	0.071	0.041	0.041	2.020	1.720	0.043	0.085
Europa	-0.080	-0.693	0.154	0.154	-0.520	-4.490	0.606	<.0001	-0.772	-1.377	0.230	0.230	-3.360	-5.990	0.001	<.0001	0.178	-0.460	0.208	0.208	0.850	-2.210	0.393	0.027
Africa	0.831	-0.572	0.436	0.437	1.910	-1.310	0.057	0.191	-0.580	-2.118	0.626	0.627	-0.930	-3.380	0.354	0.001	1.194	-0.115	0.619	0.619	1.930	-0.190	0.054	0.853
Educación	0.065	0.075	0.041	0.041	1.570	1.830	0.116	0.067	-0.002	0.000	0.062	0.062	-0.040	0.000	0.970	1.000	0.018	0.031	0.057	0.057	0.310	0.540	0.756	0.588
SFM	0.000	0.000	0.000	0.000	0.670	0.570	0.503	0.569	0.000	0.000	0.000	0.000	0.880	0.870	0.377	0.382	0.000	0.000	0.000	0.000	0.480	0.350	0.631	0.723
IB	0.021	0.021	0.012	0.012	1.710	1.720	0.087	0.086	0.017	0.016	0.019	0.019	0.880	0.810	0.377	0.418	0.016	0.016	0.016	0.016	1.000	1.030	0.317	0.305

sHe=sin efecto de la He, cHe= con efecto de la He

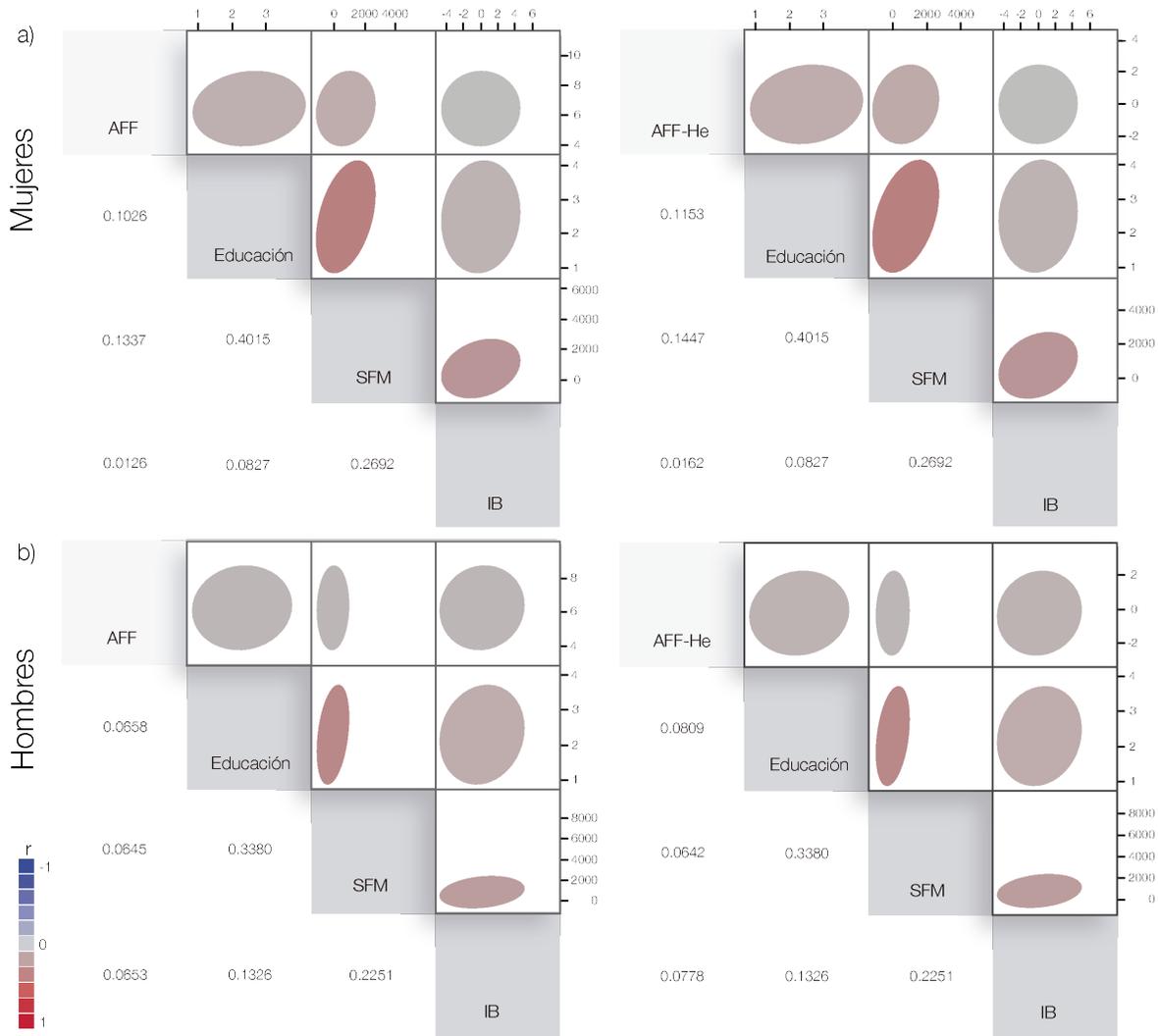


Figura 7.2 Gráficas de regresiones multivariadas entre los valores de AFF y las variables sociales. Triángulo superior de la matriz indican la naturaleza de la dispersión de los datos, la elipse representa el 95% de la varianza, su color el valor de ajuste del modelo (valor r, con referencia en el extremo inferior izquierdo del gráfico). El triángulo inferior de la matriz indica la correlación de las variables. a) Valores de mujeres y b) valores para hombres.

Discusión

Esta sección de la tesis estuvo diseñada para explorar las potenciales asociaciones entre las asimetrías faciales e indicadores socioeconómicos en una muestra grande de mestizos de cinco países latinoamericanos. El modelo contrastado aquí da evidencia de una fuerte correlación de la AF, la edad y el sexo; menormente también se encontró una relación con el BMI y la ancestría europea. Estudios previos han ya identificado la relación de la edad y la asimetría facial, para el caso de macacos Rhesus y humanos en muestras ontogenéticas (Farkas y Cheung, 1981; Wilson y Manning, 1996; Hallgrímsson, 1999). Asimismo, la AF depende del sexo, presentando mayores valores en mujeres. Estimaciones previas de la dependencia de estas variables son contradictorias, algunas reportan significaciones estadísticas (Ferrario et al., 1995; Smith, 2000; Koehler et al., 2004; Bigoni et al., 2013) y otras nula o una leve asociación con el sexo (Ferrario et al., 2001; Ercan et al., 2008; Little et al., 2008). De igual manera, algunos análisis han sugerido valores de AF más altos para hombres (Farkas y Cheung, 1981; Özener, 2010a; Claes et al., 2012), y otros análisis son concordantes con el resultado de esta tesis, mostrando asimetrías faciales mas fuertes en mujeres (Ercan et al., 2008; Bigoni et al., 2013). En resumen, la mayor asociación de los vAF son con datos biológicos del individuo.

En el capítulo III se dio cuenta de la asociación de los patrones de asimetría facial con la ancestría amerindia y europea, curiosamente representada por patrones direccionales característicos a cada parental (Quinto-Sánchez et al 2014). También se pudo identificar un patrón de correlación negativa de los vAF y la He (ver discusiones Capítulo VI). Asimismo, se pudo identificar alguna estructuración por país, aunque asignar una relación causal directa es imposible. Colombia presentan los valores de AFF mas bajos y Perú los más altos (Figura 5.3, Capítulo V). Finalmente, de manera general en la muestra aparece como si el BMI tuviera un efecto importante. Sin embargo el modelo presentado aquí por país y sexo, con el efecto de la heterocigosidad permite ver que solo se significa el grupo de hombres (Tabla 7.7), lo que está en relación con lo reportado con otro trabajo (Milne et al., 2003).

Contraste de los vAF y el modelo SES.

Contrario a lo esperado, no se encontró la relación de la asimetría facial y las variables socioeconómicas, concretamente las personas con bajos niveles socioeconómicos no necesariamente presentan mayores valores de AF como otras publicaciones han defendido (DeLeon, 2007; Gawlikowska et al., 2007; Özener, 2010a, 2011; Özener y Ertuğrul, 2010; Bigoni et al., 2013). El patrón observado demuestra que la asimetría facial tiene un rango de expresión-variación amplio en los diversos niveles de las variables SES, no es exclusivo que un grupo, pobre o rico, presente más o menos AF. Si bien la muestra base en esta tesis no incluye valores extremos para las variables sociales (los límites de ingreso serían 65 dólares por mes), si el patrón descrito

por otros autores estuviera presente, debería ser observable la tendencia o pendiente de asociación, misma que debería ser positiva y no negativa e inclusive por tener individuos extremos en el lado opuesto (muchos ingresos), los valores servirían para estimar el fenómeno. La realidad es que en ambos extremos, ricos y pobres, se comporta de igual manera. Además, tenemos que el grupo con valores de SES altos también presentan valores altos de AF, contradiciendo lo esperado por estudios previos.

Detallando, el SFM presenta una nula relación con los valores de asimetría facial, individuos con menor ingreso de dinero al mes no presentan valores de AF altos y viceversa. En sentido estricto la tendencia de la recta es contraria a lo esperado por la teoría y evidencias ya publicadas, la pendiente es positiva (Figura 7.3). La realidad es que ambos extremos de la variación pueden presentar asimetrías y aunque no es significativa la asociación la tendencia es a que la AF aumente con los ingresos económicos, esto independiente de la componente ancestral estandarizada en la muestra. Parece ser que los valores más altos de asimetría no están en los grupos extremos. Entonces, esto permite asegurar que los valores altos de AF no son característicos o intrínsecos a grupos con menos SMF y presumiblemente con peor estabilidad en el desarrollo, ni siquiera una tendencia clara. El bajo ajuste del modelo nos hace pensar en el carácter multivariado/hiperdimensional/no-lineal de la variable en estudio, la relación causal de la AF respecto de los niveles de estrés ha sido sobredimensionada.

En el caso del índice de bienestar (IB) obtenido desde una perspectiva multivariada, describe un patrón similar, ninguno de los extremos de la variación respecto de esta variable muestra un patrón característico o clara tendencia. Asimismo, no fue encontrada la correlación negativa esperada, además de que el ajuste obtenido no fue significativo. De esta manera, tener una gran cantidad de electrodomésticos en casa, implicando mejor potencial de vida (e. g. acceso a electricidad, alimentos en mejor estado, procesado de los mismos, etc.) no muestra valores menores de AF, por ende una mejor estabilidad en el desarrollo.

La educación, no presentó una asociación significativa. De hecho la tendencia encontrada se puede parecer significativa limítrofe porque la educación esta altamente correlacionada con la edad ($r^2= 0.125$, estimador=3.746, de=0.220 t=16.99, $p<.0001$), y que ha sido reportada preliminarmente en (Ruiz-Linares et al., 2014; Quinto-Sánchez et al., 2015). Haciendo un análisis más detallado no se encuentra asociación negativa, los valores de Educación altos no resultan en valores bajos de AF.

Solo un reporte da evidencia de la relación directa de que la asimetría facial esta asociada a bajos ingresos o estatus socioeconómico desventajoso Özener, (2011), analizando siete medidas corporales dice que:

“according to the results, FA is higher in individuals who have lower socioeconomic status, and who, in turn, are subject to environmental stresses”.

Aquí denotamos que los valores bajos de AF que Özener reporta para las orejas pueden ser la explicación del reporte inesperado de nuestros datos ya que la asimetría en el pie, codo y rodilla se reportan como los caracteres con mas AF (Özener, 2011).

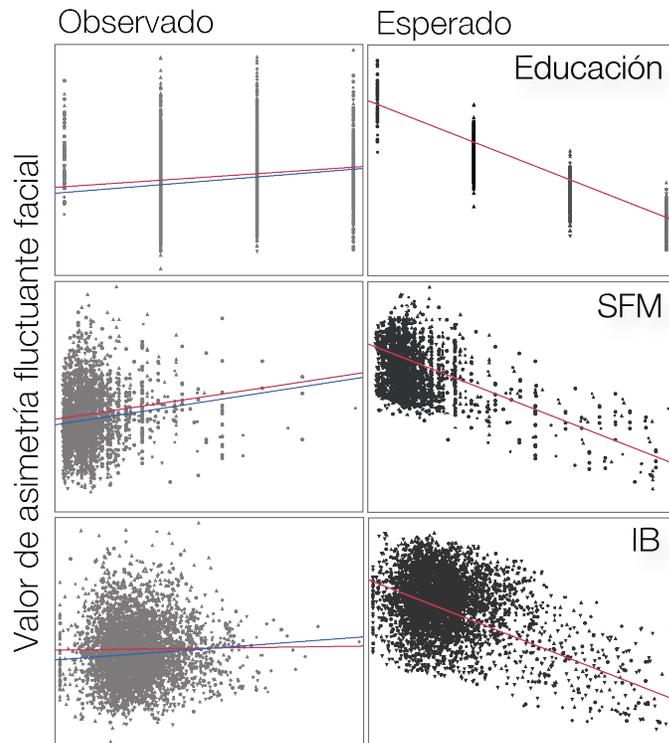


Figura 7.3 Comparación entre el modelo observado y esperado de los valores de AFF y las variables SES. La columna izquierda muestra los valores observados en la muestra y la columna derecha una representación de lo esperado bajo el supuesto de ID. Las líneas azul y rojas de la columna izquierda representan el ajuste de regresión para cada sexo (azul=hombres, rojo=mujeres). La línea roja en la columna derecha es la tendencia esperada según la idea de que a mayor SES, medido con las variables educación, SFM y IB, menor cantidad de AFF.

Algunos reportes encuentran una relación significativa de los valores de AF del cráneo femenino con una estructura socioeconómica menor en poblaciones más estresadas (Bigoni et al., 2013). Controversialmente, algunos autores encuentran valores de AFF significativos en grupos de bajos SES, con los hombres mostrando valores más altos respecto de las mujeres (Özener, 2010a). Otro estudio evidencia que los cráneos modernos presentan valores de AF más altos que los cráneos de una muestra medieval (Gawlikowska, 2007). En adición, un reporte encuentra relativamente valores más altos de AF en una muestra con niveles de estrés más altos (Deleon, 2007). Finalmente, FA ha estado asociada al nivel de salud del individuo, hay alguna evidencia que describe valores mayores de AF en individuos que murieron de enfermedades degenerativas respecto de quien murió de enfermedades infecciosas, los hombres muestran valores más altos de AF que las mujeres (Weisensee, 2013).

La desigualdad generalizada inherente a América Latina (LA) (Azevedo et al., 2013), marcada por una continua, diferencial y diversa migración internacional (Pellegrino, 2000) y un desarrollo combinado y desigual (Trotsky, 1932), debería representar un escenario de valores extremos de AF, como indicador de ID. Es claro que la cara no responde al mismo patrón de desarrollo que las extremidades, por ello los valores de AF cambian entre estudios. Las evidencias de la “biología de la pobreza” parecen no operar como se ha descrito en la bibliografía, la señal en

los caracteres faciales no es la esperada, como pudiera ser para otros caracteres como enfermedades generales o infecciosas (Ramachandran et al., 2005; Chen et al., 2006; Evans y Kim, 2007; Piot et al., 2007; Shonkoff et al., 2009). La inferencia de la posible dependencia de los índices socioeconómicos con caracteres extremos, como la cara, es cuestionable. Y así mismo, hay que revisar la ya aceptada visión de la importancia de la cara en procesos como sociabilización, expresiones y comunicación, con un propósito selectivo-sexual, idea central o argumento que la psicología evolucionista retoma para defender que, al estar implicadas en la selección de pareja, representan un signo de buenos genes de los individuos (Møller y Swaddle, 1997; Møller y Thornhill, 1997b; Thornhill y Møller, 1997; Thornhill y Gangestad, 1999; Gangestad y Simpson, 2000; Fink y Penton-Voak, 2002; Luxen y Van De Vijver, 2006). De igual manera, se tiene que tener cautela en las interpretaciones directas de la asimetría facial respecto de la inestabilidad en el desarrollo (Palmer y Strobeck, 1986; Leary y Allendorf, 1989; Clarke, 1993; Møller, 1996; Allenbach et al., 1999; Milne et al., 2003; Lens y Van Dongen, 2008; Little et al., 2008, 2012; Özener y Fink, 2010; DeLeon y Richtsmeier, 2010; Özener, 2010abc; Weisensee, 2013), ya que como es común a la biología, los patrones siempre tienen una excepción y refuerzan visiones más integrativas (McKenzie y Clarke, 1988; Graham et al., 1993; Bjorksten et al., 2000; Lens et al., 2002a). Los datos aportados aquí, muestran razones plausibles para un significado neutro de la AF.

Se tiene detallar que aunque en las poblaciones mestizas o híbridas tienen una mejor respuesta al estrés (Lynch y Walsh, 1998), como ya se detalló en el capítulo anterior. Por este motivo, sabiendo que la heterosis puede ser un factor importante en la observación de valores de AF bajos, los datos fueron analizados con y sin éste escenario posible, sin observarse cambios entre modelos. Lo anterior obliga a resaltar que únicamente los datos biológicos de primer orden como edad, ancestría y heterocigosidad muestran una relación importante en el modelo.

En resumen, la tradicional aceptación de la relación entre la ID y la AF parece no ser una regla. Pertenecer a grupos vulnerables parece no estar relacionado con los vAF. Además, los valores de asimetrías en poblaciones con un SES alto muestran un patrón diferente a la hipotética visión de la AF=0 como nivel base en poblaciones humanas (Ercan et al., 2008; Farrera, 2011; Farrera et al., 2014). Los datos aportados aquí permiten tener evidencia poblacional a larga escala. La varianza observada en los niveles de SES altos significan que la estabilidad del desarrollo no está determinada de manera mecanicista, por el contrario, parece ser responder a factores no lineales, quizás no incluidos en éste análisis.

Asimetría facial, modularidad e
integración morfológica

Introducción

La mayoría de los organismos se componen de partes reconocibles y coherentes en relación a su origen en el desarrollo, estructura y función (Klingenberg, 2008), estas partes o estructuras complejas exhiben una propiedad denominada modularidad, ya que conceptualmente y experimentalmente son separables en subestructuras integradas conocidas como módulos (Simon, 1962), estructuras reconocidas como entidades biológicas con una mayor integración interna que externa (Bolker, 2000). Así, los módulos de un sistema biológico integrado, como el caso de la cara, consecuentemente exhiben algún grado de independencia, ya que éstos varían en su desarrollo, evolución, población o condiciones inducidas experimentalmente (Mitteroecker y Bookstein, 2007). Sobre estas características de la variación fenotípica, es decir la relativa interdependencia modular e integración morfológica es que el contraste de posibles señales de inestabilidad en el desarrollo (ID) es plausible, por medio del empleo de la asimetría fluctuante facial como un marcador de inestabilidad acumulada en el rostro de los individuos mestizos en estudio.

La cara como fenotipo modular e integrado

La cara humana es una estructura compleja bilateral compuesta de una combinación de estructuras que varían simultáneamente de manera integrada y modular. Por ejemplo, se ha descrito que como parte del cráneo, la cara depende de la integración de la base del cráneo (Enlow, 1990; Lieberman et al., 2000ab; Rosas y Bastir, 2002; Goodrich, 2005; Bastir y Rosas, 2008) e igualmente, otros autores han sugerido que está íntimamente ligada a la variación en el crecimiento del cerebro (Cordero et al., 2011; Marcucio et al., 2011). Sin embargo, el carácter modular de la cara ha sido poco analizado, y sólo recientemente se ha hecho un abordaje desde la teoría de redes, analizando la distribución modular de la misma (Esteve-Altava y Rasskin-Gutman, 2014; Esteve-Altava et al., 2015). De igual manera, la cara presenta un proceso de desarrollo complejo, donde los patrones de covariación emergen desde diferentes procesos de generación de varianza, mismos que se superponen paulatinamente y que se suman o integran secuencialmente durante el proceso de ontogenia individual (Hallgrímsson et al., 2007). Esta característica es la que define a la cara como un fenotipo complejo, modular e integrado.

Se han caracterizado de manera general cuatro tipos de módulos (Figura 8.1): del desarrollo, genéticos, funcionales y evolutivos (Klingenberg y Leamy, 2001; Klingenberg et al., 2003, 2004). Examinando las relaciones entre estos diferentes tipos de módulos se pueden explorar los procesos biológicos subyacentes en los patrones de variación analizados (Breuker et al., 2006). Por ejemplo, frecuentemente los módulos morfológicos se corresponden con órganos reconocidos en la anatomía comparada y que también pueden corresponder a campos de desarrollo (Davidson, 1993; Gilbert et al., 1996). De éste modo, si los módulos genéticos o de desarrollo coinciden con la subdivisión de un organismo o estructura en módulos funcionales, entonces la correspondencia o falta de ella en los módulos puede proporcionar información sobre el origen de la modularidad (Cheverud, 1996; Wagner y Altenberg, 1996) y de igual manera, sobre los patrones de inestabilidad en el desarrollo (Klingenberg, 2003a).

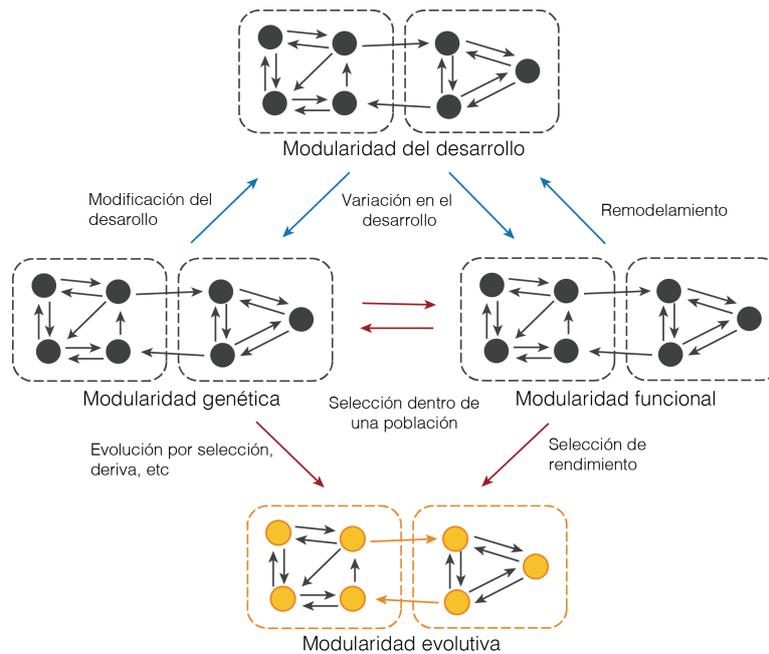


Figura 8.1 Tipos de modularidad para la variación morfológica y sus conexiones. Modularidad del desarrollo (MD), genética (MGe), funcional (MF) y evolutiva (ME, que no se evalúa en la tesis pero para referencia consultar Klingenberg 2008), no incluida en ésta tesis. Estos tipos de modularidad influyen mutuamente a través de diversos procesos dentro de los individuos (flechas azules) o dentro de las poblaciones (flechas rojas). La MD tiene un efecto tanto en la modularidad genética como en la funcional mediante la modulación de la variación morfológica disponible. La MGe retroalimenta a la MD a través del control genético del desarrollo, mientras que los procesos de remodelación de tejidos (por ejemplo, la remodelación ósea bajo carga mecánica) proporcionan una retroalimentación de la función de los procesos de desarrollo. A nivel de la población, el proceso de la selección natural establece una interacción de dos vías entre la MGe y MF. Estos efectos de la selección, junto con el efecto adicional de la MGe en los cambios debidos a la deriva, se acumulan en el tiempo para constituir la ME de un linaje o clado (Tomado de Klingenberg, 2008).

En esta sección de la tesis, se retoma la discusión de Klingenberg, (2008) sobre el enfoque de explorar módulos de desarrollo (MD), funcionales (MF) y genéticos (MGe) (ver Figura 8.1). Los MD se definen por las interacciones entre los precursores del desarrollo que finalmente formarán las partes de la estructura adulta, también llamadas epigenéticas (Hall, 1999; Hallgrímsson et al., 2007). De esta manera se puede abarcar una amplia gama de procesos tales como interruptores (*developmental switches*) de desarrollo, que conducen a bifurcaciones de las vías del desarrollo o de señalización entre los tejidos a través de diversos mecanismos moleculares (Wilkins, 2002). La característica común de la estabilidad en el desarrollo es que es el medio por el que los procesos de desarrollo (e.g. división celular, diferenciación tisular, estresores, etc) pueden influir mutuamente entre sí y, por tanto, lograr un desarrollo coordinado de los tejidos, órganos y todo el organismo (Figura 8.1). Asimismo, la relación dialéctica entre estabilidad-inestabilidad del desarrollo puede mediar en la expresión de la variación genética y ambiental mediante la transmisión de sus efectos a través de diferentes características en las rutas del desarrollo. Por lo tanto, la MD contribuye a los patrones de todos los componentes de covarianza fenotípica entre los rasgos (Klingenberg, 2009) y de esta contribución y de su relación con la estabilidad-inestabilidad del desarrollo, es que resulta importante su análisis en ésta sección de la tesis.

Por otro lado, la MF hace referencia a aquellas interacciones de rasgos pertinentes a la realización de una o más funciones (Klingenberg, 2008). Por ejemplo, las interacciones de

fuerzas mecánicas directas producidas durante la masticación en el cráneo o procesos tales como la captura de presas, la respiración y/o vocalización. Debido a que durante los procesos de desarrollo se forman las estructuras que realizan funciones, se espera que la MD pueda influir en la morfología funcional, a pesar de que no es claro qué tan fuerte es esta relación (Breuker et al., 2006a). En sentido inverso, la MF puede tener una influencia en la MD por procesos tales como la remodelación ósea y otras formas de plasticidad, donde los mecanismos de carga influyen en las tasas y dirección del crecimiento del tejido (Enlow, 1996; West-Eberhard, 2003). Es importante destacar que algunos análisis teóricos han planteado la hipótesis de que la selección natural hace que la modularidad funcional y genética converjan (Cheverud, 1996; Wagner y Altenberg, 1996), con algunos estudios empíricos que proporcionan cierto apoyo a esta idea (Leamy et al., 1997; Mezey et al., 2000; Klingenberg, 2004b). En contraste, otros estudios indican que diferentes estructuras morfológicas pueden realizar funciones equivalentes y, por tanto, que puede existir una considerable flexibilidad para la divergencia neutral (Wainwright et al., 2005; Young et al., 2007) o que su conectividad responde a otros niveles de explicación, independientes de la funcionalidad (Esteve-Altava y Rasskin-Gutman, 2014; Esteve-Altava et al., 2015).

Finalmente, la MGe se refiere a los patrones de efectos conjuntos entre genes en los rasgos, que pueden ser representados como una red de relaciones entre rasgos pleiotrópicos (Nadeau et al., 2003). La MGe ha sido discutida ampliamente en el contexto del mapa de genotipo-fenotipo (Wagner, 1996; Wagner y Altenberg, 1996; Mezey et al., 2000). Debido a que los procesos de desarrollo median la expresión de la variación genética en rasgos fenotípicos, la MD y la MGe están muy relacionadas, aunque la relación no es una congruencia perfecta, ya que la expresión de la variación genética no está controlada exclusivamente por las interacciones del desarrollo. Igualmente, los cambios genéticos pueden influir en la MD al causar alteraciones en las interacciones entre las vías de desarrollo que afectan a las características de interés (Klingenberg, 2005). De esta manera, se tienen tres niveles de análisis mediante las hipótesis modulares. La exploración del espacio modular de la variación fenotípica proporcionará evidencias de señales de estos tipos de variación fenotípica antes señalada, sobre todo la que refiere a esta disertación, el espacio asimétrico de la variación morfológica.

Hasta este punto el lector habrá notado que hablar de modularidad y sus diversas escalas implica también hablar y definir la integración morfológica (IM). Básicamente la IM se infiere a partir de datos de covariación de múltiples rasgos o módulos. Otros autores refieren la IM como integración fenotípica (IF) o relaciones biológicas entre múltiples caracteres de un fenotipo complejo (Schlichting, 1989; Pigliucci y Preston, 2004). Se ha sugerido que el correcto funcionamiento de los fenotipos complejos requiere que los rasgos cumplan su función de manera conjunta, es decir de manera integrada como un módulo (Murren, 2012). Debido a que la fuerza de integración está relacionada con la distribución de la variación en las dimensiones del espacio fenotípico (Klingenberg, 2008) y que las interacciones entre los caracteres pueden cambiar a través del desarrollo y en diversos ambientes (Murren, 2012), es que las perturbaciones ambientales o genéticas pueden modelar o influir las vías de desarrollo, a menudo resultando en cambios fenotípicos (Murren, 2012), como es el caso de las asimetrías. Del mismo modo, si existe una posible influencia del desarrollo, mismo que puede estar compartido, esta puede ser detectada analizando si las covarianzas entre las inestabilidades del

desarrollo, producto del ambiente y la genética, se mantienen constantes (Murren, 2012). Por ejemplo, durante el embarazo, una perturbación ambiental como la reducción de la calidad de nutrientes en la dieta influyó a través de la ontogenia en los patrones de integración del cráneo de la rata (Gonzalez et al., 2011ab). Además, en otro experimento realizado en dos especies de peces cíclidos del lago Malawi, que difieren en el modo de búsqueda de alimento y el ancho de la mandíbula (carácter morfológico implicado en la presa de alimento), fueron experimentalmente hibridados para examinar si esta “perturbación” genética alteraba los patrones de integración morfológica (Parsons et al., 2011). Los resultados de éste análisis determinaron que una fuerte integración constriñe la variabilidad entre rasgos, concluyendo que un cambio en un rasgo fuertemente integrado raramente será ventajoso para otras estructuras o para el organismo. Al respecto debe recordarse que los cambios en partes individuales tenderán a ser seleccionados en contra (Wagner y Altenberg, 1996). Por éste motivo es que la IM y la modularidad se han relacionado con el concepto de capacidad de evolución (*evolvability*) (Cheverud, 1996; Wagner Altenberg, 1996; Klingenberg, 2005; Hansen et al., 2011). En éste punto es donde la convergencia entre los conceptos de modularidad e IM cobran sentido evolutivo.

La capacidad de evolución o “evolucionabilidad”, es la habilidad de un sistema genético para producir y mantener variantes genéticas potencialmente adaptables (Hansen, 2006), es una propiedad del mapa genotipo-fenotipo y no de una población y se relaciona más con variabilidad que con la variación. Luego entonces, la modularidad puede facilitar la evolucionabilidad permitiendo que algunos caracteres cambien sin interferencias, pero también puede obstaculizarla al reducir el número de genes que pueden afectar el carácter (Hansen, 2003). La forma más probable en que la modularidad puede evolucionar es mediante la eliminación de los efectos pleiotrópicos entre caracteres. Empero, debido a la complejidad de las interacciones entre módulos la eliminación de dicho efecto pleiotrópico, como ya se ha mencionado, será diferencial ya que puede aumentar la evolucionabilidad de un rasgo pero disminuir la de otro (ver Hansen, 2003). Luego entonces, debido a que rasgos con una base genética o de desarrollo común se heredan de forma conjunta y evolucionan juntos (Lande, 1979; Cheverud, 1996) el estudio de los patrones de modularidad, y por ende de IM, pueden brindar información sobre la evolucionabilidad de un organismo.

La asimetría fluctuante como vía para el estudio de la integración del desarrollo

La metáfora de las vías de desarrollo (Wilkins, 2002) es útil para la comprensión de la base del desarrollo de la covariación de los rasgos morfológicos. Una vía de desarrollo denota el conjunto de procesos que generan un rasgo (Alonso, 2008). Por lo tanto, es un término resumen que incorpora una multitud de mecanismos moleculares y celulares que subyacen a los procesos de desarrollo del organismo, lo que provoca complejas redes de interacciones (Alonso, 2008). Para la caracterización de la integración del desarrollo, que se centra específicamente en las interacciones de desarrollo, es importante distinguir los diferentes orígenes de covariación morfológica. Una gama de diferentes mecanismos de desarrollo puede producir interacciones entre las vías de desarrollo y, como consecuencia, generar covariación entre los rasgos morfológicos (Klingenberg, 2008). Una manera fácil de eliminar los efectos de la variación

genética y ambiental entre los individuos y al mismo tiempo centrarse en la variación dentro de las vías de desarrollo consiste en analizar la asimetría fluctuante (Klingenberg, 2003a).

Debido a que los lados izquierdo y derecho de un individuo comparten el mismo genoma, el estudio de la AF es una forma efectiva de eliminar la variación genética y ambiental entre los individuos. Además, debido a que se cree que la AF se origina a partir de perturbaciones aleatorias de los procesos de desarrollo (Klingenberg, 2003a), es que se asume que la variación surge dentro de las propias vías de desarrollo. Por estas razones, la covariación en la AF de diferentes rasgos se debe exclusivamente a la covariación de las vías de desarrollo directos (Klingenberg y Polak, 2003; Klingenberg et al., 2004; Klingenberg, 2005). Por lo tanto, es posible evaluar el papel de las interacciones directas del desarrollo en la generación de la covariación entre los individuos mediante la comparación de los patrones de covariación de la AF con los patrones de covariación entre los individuos.

Los estudios de AF también sugieren que la integración del desarrollo puede desempeñar un papel importante en la canalización de la variación durante períodos de cambio ambiental (Goswami et al., 2015). Una interesante serie de experimentos de laboratorio examinó los efectos del estrés ambiental inducido artificialmente sobre la integración del desarrollo y la variación de las mandíbulas de musaraña (en las especies *Sorex monticolus*, *S. vagrans*, *S. cinereus* y *S. hoyi*), demostrando que la AF y la variación de la población estresada aumentaron (Badyaev et al., 2000; Badyaev y Foresman, 2004). Sin embargo, esta variación se canalizó a lo largo de la misma dirección que la variación entre las especies.

Bajo la lógica anterior, si dos rasgos comparten una vía de desarrollo determinada, las mismas perturbaciones pueden tener un efecto en los dos caracteres al mismo tiempo y, por lo tanto, puede generar una correlación entre sus asimetrías. Debido al origen azaroso y local de las irregularidades del desarrollo que producen AF, las asimetrías sólo se correlacionan entre los rasgos si las partes respectivas están vinculadas al desarrollo, es decir, si una perturbación que afecta a un rasgo se transmite también a los demás. Por lo tanto, las correlaciones de AF se limitarán principalmente al interior de los módulos de desarrollo, mientras que las correlaciones entre los individuos se producirán igualmente en y entre módulos (Klingenberg et al., 2001).

Al cuantificar la AF se puede probar si los patrones de interacciones del desarrollo (componente asimétrico) corresponden a los componentes principales de variación entre individuos, como sería de esperar si la integración del desarrollo es una limitación significativa en la variación evolutiva (Goswami et al., 2015). Como ya han caracterizado muchos autores, la AF y las anomalías en el desarrollo están determinadas linealmente y parecen ser una evidencia tangible de la sumatoria de estrés acumulada en el individuo (Møller, 1990, 1992; Parsons, 1992; Møller et al., 1995; Møller y Thornhill, 1997a; b; Thornhill y Møller, 1997; Jones et al., 2001). En éste punto debe ser consideradas las contradicciones que muestran que la relación AF e ID no es una relación lineal (e.g. McKenzie y Clarke, 1988; Graham et al., 1993; Bjorksten et al., 2000; Lens et al., 2002).

Bajo el planteo anterior, se define que el primer objetivo de este capítulo es conocer qué hipótesis de modularidad facial se ajusta mejor para los criterios de la prueba de modularidad de Klingenberg, (2009). La hipótesis nula es que aquellas hipótesis *a priori* con baja modularidad presentaran una covariación entre subconjuntos débil y por ende, una incipiente relación entre módulos. Se espera que las hipótesis modulares que mejor reflejen el patrón subyacente

presenten los valores de covariación más bajos.

El segundo objetivo es evaluar la hipótesis que propone que la covariación en la AF de diferentes rasgos se debe exclusivamente a la covariación de las vías de desarrollo (Klingenberg, 2003b, 2004a, 2005). Así, comparando estos patrones de AF con los patrones de covariación entre los individuos, es posible evaluar el papel de las interacciones directas del desarrollo en la generación de la covariación entre los individuos. La hipótesis nula es que no deberán encontrarse diferencias (alta correlación entre matrices) de IM y AF en las diversas submuestras definidas de acuerdo a la ancestría genética de los individuos, lo que implicaría que las diferentes perturbaciones ambientales o genéticas no son suficientes para cambiar las vías de desarrollo que generen cambios fenotípicos (Murren, 2012).

El tercer objetivo del capítulo es caracterizar la IM en los diversos módulos y submuestras y determinar la relación entre la IM y los diversos espacios analizados en el Procrustes ANOVA, con énfasis en la AF. La premisa aquí es que el efecto de estresores durante el desarrollo puede ser detectado analizando si las covarianzas entre las inestabilidades del desarrollo, producto del ambiente y la genética, se mantienen constantes o cambian. La idea general es que el análisis de la AF sugiere que la integración del desarrollo puede desempeñar un papel importante en la canalización de la variación a través de períodos de cambio ambiental (Goswami et al., 2015). La hipótesis nula predice que la IM será baja, por lo que su variación se dispersará a través de muchas direcciones del espacio simétrico o asimétrico de forma. Como anexo de este punto, la IM también permitirá conocer el grado de asociación de ésta, con respecto a los espacios analizados (en especial el espacio asimétrico), en la muestra total y submuestras analizadas, así como en los módulos planteados. La hipótesis nula predice que no existe correlación entre los valores de IM y AF en las diferentes muestras e hipótesis modulares planteadas.

Sujetos y método

Para éste capítulo se incluyeron el mismo número de datos y criterios del Capítulo III, por lo que para referencia general de la muestra puede referirse a la Tabla 3.1. El fenotipo facial se estudió tal como se describe en el capítulo III, al igual que la ancestría genética y heterocigosidad (H_e) (ver Capítulo VI). Finalmente, la obtención de la asimetría individual puede referirse en el Capítulo V. Cada análisis se generó para la configuración general, como marco de referencia y para los diversos módulos y diversas submuestras de ancestría genómica que se describen más adelante.

Modularidad: hipótesis y tratamiento estadístico

En el presente capítulo se postulan cuatro hipótesis generales de modularidad facial. Cada una de las hipótesis presentadas busca saber, en el marco de la muestra que se tiene, la validez de cada propuesta. Así, fueron contrastadas las siguientes hipótesis modulares: hipótesis de modularidad funcional (HMF), hipótesis de modularidad de la línea media (HMLM), hipótesis

de modularidad de cara superior e inferior¹ (HMCSI) e hipótesis de modularidad neurocráneo-cara (HMNC). Cabe destacar que si bien existirían muchas más hipótesis a considerar, se siguió el criterio de conmensurabilidad hacia otras publicaciones y la frecuencia de utilización de las mismas, aunque éstas no siempre reflejaran cabalmente el estado del arte sobre la modularidad craneofacial humana.

La HMF (Figura 8.2a) se basa en la idea de la matriz craneofuncional e intenta conocer el papel de los tejidos blandos en la conformación modular de la cabeza lo que facilitaría su estabilidad, rendimiento y capacidad de evolución (Diogo y Wood, 2013). La hipótesis de Moss y Young, (1960) sostiene que la cabeza se divide en componentes funcionales (módulos) determinados por los tejidos blandos y cavidades craneales (por ejemplo, de los nervios, oculares y orales), y limitada por las unidades del esqueleto de los alrededores. En este sentido, los componentes de tejidos blandos guían el desarrollo de las unidades esqueléticas. Se debe hacer notar que se ha propuesto que estos componentes funcionales son conjeturas basadas en suposiciones acerca de la posición, forma y función que reflejan las expectativas a priori en lugar de ser resultados del análisis cuantitativo (Esteve-Altava et al., 2015).

La HMCSI (Figura 8.2c) se fundamenta en que los estudios tradicionales de morfología facial basan sus análisis en el sistema de división de los tercios faciales, sobre todo en el campo de medicina (Farkas et al., 1984; Larrabee et al., 2004; Anic-Milosevic et al., 2010). Es de importancia comprobar qué tanto dichas regiones responden a un patrón de modularidad con sustento empírico.

La HMLM (Figura 8.2b) se fundamenta en dos ideas: la primera es verificar si aquellas estructuras morfológicas con vías del desarrollo más complejas (en cuanto a formación, interrelación de estructuras, movimientos, tiempo de aparición en el desarrollo, etc.) tendrían una implicación en la modularidad, IM y AF (ver Aparicio y Bonal, 2002). En la segunda, se intenta verificar la idea de que cuanto más alejado se encuentre un módulo de la línea media o sagital, mayor cantidad de asimetría tendrá (ver Özener, 2011). En otras palabras, se busca verificar si aquellos *landmarks* que se ubican más cerca del plano sagital, respecto de los más laterales, sigan una distribución del ordenamiento modular propuesto, teniendo en mente que en el cuerpo las estructuras más alejadas de la línea media presentan tasas más altas de asimetría (Özener, 2011).

Finalmente, la HMNC (Figura 8.2d) es el intento de verificar la hipótesis clásica de los grandes componentes del neurocráneo, en éste caso esplanocno y neurocráneo (Bastir y Rosas, 2005), ya que la base está poco representada en la configuración de *landmarks* empleada.

Las hipótesis antes descritas serán evaluadas en dos contextos: 1) en lo referente a su variación en toda la muestra y 2) en sub muestras organizadas de acuerdo a la ancestría genética. Si bien esta disertación persigue la evidencia del componente o morfoespacio asimétrico, debido a que la mayoría de los estudios realizados únicamente trabajan el espacio simétrico de la forma y tratando de hacer conmensurables los resultados, es que se explorarán las hipótesis nulas también en el morfoespacio simétrico.

¹ Denominados en alguna bibliografía como tercios faciales (ver el sustento más abajo en el texto).

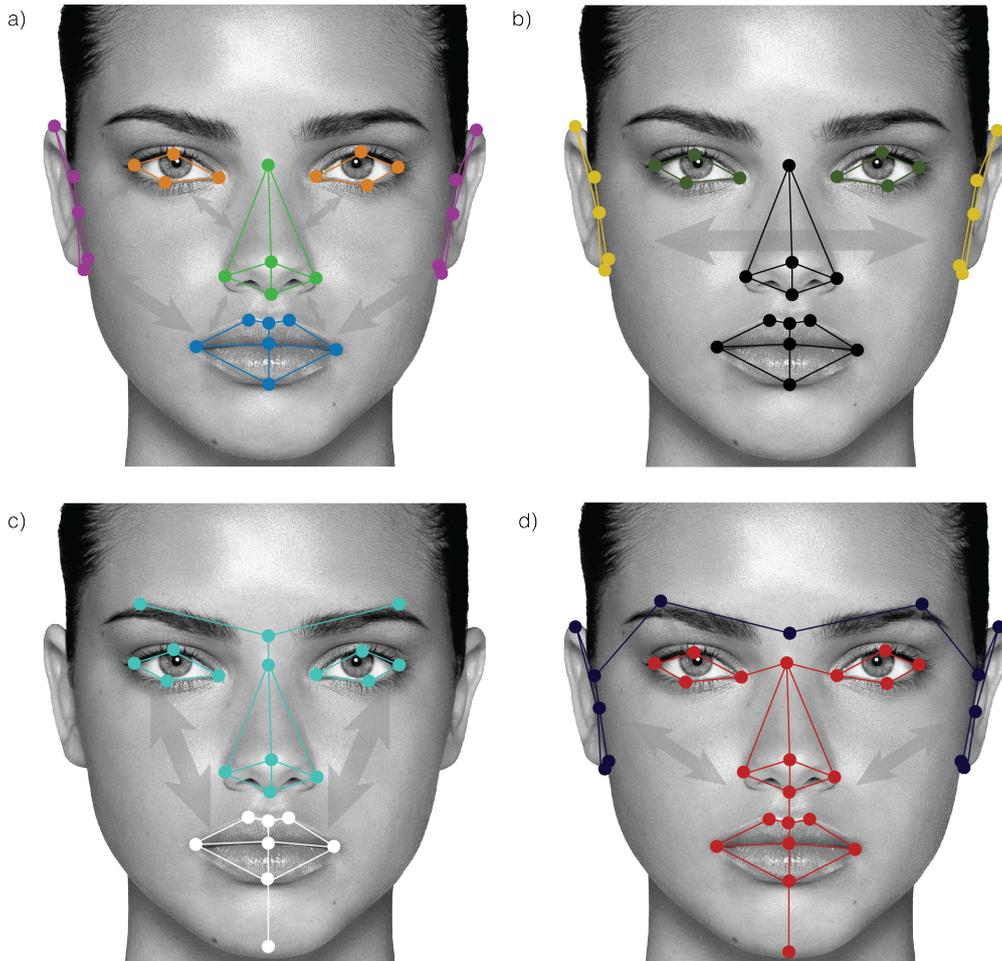


Figura 8.2. Hipótesis de modularidad propuestas. a) hipótesis de modularidad funcional (HMF) ojos=naranja, boca=azul, orejas=morado, nariz=verde. b) hipótesis de modularidad de la línea media (HMLM) sagital=negro, medio=verde-oliva, lateral=amarillo. c) hipótesis de modularidad de la cara superior-inferior (HMCSI) medio=azul-turquesa, inferior=blanco. d) hipótesis de modularidad neurocráneo-cara (HMNC) neurocráneo=azul-oscuro, esplanocráneo=rojo. Las flechas en gris sobre los rostros son representaciones de las relaciones covariacionales hipotetizadas.

Las hipótesis de modularidad propuestas aquí se evaluaron según el método presentado por Klingenberg, (2009), en donde si una hipótesis de modularidad dada es correcta, los módulos propuestos (hipotéticos) corresponderán a unidades con un bajo grado de covariación con otros módulos. En otras palabras, el planteamiento es que para evaluar la hipótesis en cuestión, el grado de covariación entre los módulos hipotéticos propuestos *a priori*, puede ser comparado con particiones al azar con el mismo número de *landmarks* (Klingenberg, 2009). Para el presente análisis, la configuración de *landmarks* inicial (34 *landmarks*) se subdividió en diferentes subconjuntos correspondientes a las distintas hipótesis de modularidad que se plantea explorar aquí. Si la partición corresponde a la verdadera frontera entre módulos, se espera que la covariación entre subconjuntos sea débil porque refleja relativa independencia entre módulos. En contraste, si la modularidad en subconjuntos a través de módulos es fuerte, se espera que la covariación entre subconjuntos sea grande, ya que los subconjuntos están vinculados por la fuerte integración. Luego, si la hipótesis de modularidad es sólida, la covariación entre subconjuntos de *landmarks* correspondientes o adyacentes debe ser inferior a la de diferentes subdivisiones de los puntos de referencia creadas al azar en un gran número de

iteraciones. Finalmente, si bien una baja covariación, por sí mismo no implica modularidad, este razonamiento proporciona un enfoque para la evaluación de hipótesis *a priori* acerca de la modularidad.

El método utiliza el coeficiente de RV (Escoufier, 1973) como una medida de covariación entre dos conjuntos de puntos de referencia (Klingenberg, 2011). *MorphoJ* calcula el coeficiente RV o *multiset*, coeficiente RV para la partición de los *landmarks* especificados como la hipótesis por el usuario o bien para todas las posibles particiones alternativas, o para un gran número de particiones alternativas aleatorias.

Para determinar si un conjunto de puntos de referencia es espacialmente contiguo, *MorphoJ* utiliza un gráfico de adyacencia donde los *landmarks* vecinos están conectados por los bordes de la gráfica (Klingenberg, 2009). Un conjunto de *landmarks* es contiguo si todos los puntos están conectados. Como punto de partida para el gráfico de adyacencia, *MorphoJ* produce una triangulación de Delaunay en dos o tres dimensiones. En la mayoría de las aplicaciones biológicas, sin embargo, esto no es una caracterización realista de las relaciones entre los puntos de referencia y por lo tanto necesita ser modificado por el usuario. *MorphoJ* ofrece una interfaz de usuario para añadir o eliminar bordes de la gráfica de adyacencia o para copiar el gráfico de adyacencia de un análisis a otro. Para esta tesis se ha tomado la referencia presentada en la Figura 8.3, misma que se presenta para aumentar la reproducibilidad y replicabilidad de otros análisis, ya que no existen referencia similares en la bibliografía. El criterio elegido para dicha gráfica de adyacencia fue generar una máscara o polígono que tuviera congruencia anatómica tridimensional con los tejidos blandos de la cara (ver Figura 8.3). Todos los análisis fueron permutados 10000 veces con la finalidad de conocer la pertinencia de los resultados a través de esas interacciones y significar probabilísticamente dicho proceso.

Contaste de matrices de covariación

Klingenberg y McIntyre, (1998) citan que si el mismo proceso de desarrollo está operando sobre determinada morfología, las matrices de covarianza de la AF e individuos deben ser similares y proporcionales. Para conocer el grado de similitud entre matrices de covarianza se realizó una correlación mediante la prueba de Mantel (Mantel, 1967), realizada en la plataforma *MorphoJ*. Ésta prueba brinda una comparación general de dos matrices (Klingenberg, 2011). Las matrices empleadas fueron las resultantes del Procrustes ANOVA realizado en el Capítulo V. Dichas pruebas se realizaron incluyendo la diagonal de los bloques y permutando los *landmarks* a través de 10000 iteraciones. Éste análisis contrasta la hipótesis nula de total disimilaridad. Finalmente, cabe destacar que para los componentes simétrico y asimétrico solo se utilizan los *landmarks* laterales (Klingenberg, 2011). Se compararon los datos obtenidos en cada módulo (funcional, línea media, cara sup-inf, neuro-cara), para toda la muestra (como valor de referencia de la variación total) y para cada submuestra dependiendo de la configuración genética de los individuos (amerindios, europeos, mestizos y homocigotos). En todos los caso de las diferentes submuestras el término del error no se contrastó en el análisis, sin embargo la primera estimación es la única requerida para la misma (Klingenberg y McIntyre, 1998; Klingenberg y Zaklan, 2000).

Integración morfológica

Teóricamente, la integración es fuerte si toda la variación se concentra en una sola dimensión, lo que indica una perfecta correlación de todos los rasgos, y es ausente si la variación se distribuye uniformemente sobre todas las dimensiones disponibles. Bajo esta lógica, se han desarrollado varios índices de integración en función de los eigenvalores de la matriz de correlación de mediciones de distancia lineales (Cheverud et al., 1983; Wagner, 1984, 1990) y algunos otros índices similares desarrollados para morfometría geométrica (Willmore et al., 2006). En este contexto, la IM puede ser medida como la varianza escalada de los eigenvalores (SVE) de un análisis de componentes principales (Pavlicev et al., 2009), realizado sobre la estructura en la cual se quiere estimar o cuantificar su grado de integración. Esta medida está basada en que cada eigenvalor es igual a la cantidad de variación distribuida a lo largo del eigenvector correspondiente (Pavlicev et al., 2009). Cuando sólo unos pocos eigenvalores son grandes en relación al resto, entonces la varianza de la totalidad de eigenvalores será más alta que si todos los eigenvalores explicaran montos similares de variación. En el caso de que la varianza sea grande, se considera que el rasgo analizado está fuertemente integrado, pues los *landmarks* que lo describen varían en un subespacio morfológico limitado dentro del espacio total multivariado teórico disponible (Wagner, 1990). Hallgrímsson et al. (2009a) sostienen que el aumento de la varianza no necesariamente implica un aumento en la IM. Asimismo, plantean que es necesario utilizar una medida complementaria. Los autores proponen que para verificar si la IM (medida con la SVE) es acompañada por un incremento en la varianza fenotípica (medida como la traza de la matriz de varianza/covarianza, TVC), debe calcularse una regresión entre ambos valores escalares. Si la estructura está fuertemente integrada y la varianza fenotípica es alta se espera que el valor de la regresión sea significativo y alto.

Bajo estas premisas teóricas, se calcularon una serie de índices de IM que son reportados dentro del cálculo del análisis de componentes principales (PCA) en el programa *MorphoJ*. De esta forma, se cuantifica la IM utilizando la distribución de eigenvalores como principal indicador. La varianza de los eigenvalores es una medida de integración que cuantifica cómo se distribuye la variación en el espacio morfométrico. Si no hay integración en absoluto y, por tanto, hay cantidades iguales de variación en todas las direcciones del espacio forma, esta variación tendrá su valor mínimo de 0. El índice tiene su máximo si toda la variación está contenida en una sola dimensión (integración completa) (Klingenberg, 2011). Tradicionalmente, la varianza de los eigenvalores se calculaba a partir de las matrices de correlación (Pavlicev et al., 2009). Sin embargo, para datos morfogeométricos se trabaja sobre las matrices de varianza-covarianza que no alteran la métrica de las distancias de Procrustes (Pavlicev et al., 2009). En éste capítulo, se utilizó la varianza de los eigenvalores escalada por la varianza total (traza) y el número de variables, con el objetivo de ponderar los efectos de las variables desiguales entre módulos. Los análisis fueron realizados para el componente simétrico y asimétrico, con la finalidad de contrastar si existen diferencias entre las respuestas a la IM en estos dos espacios fenotípicos. Adicionalmente, se generó una regresión lineal simple para comprobar la asociación de la varianza de los eigenvalores escalada por la varianza total y el número de variables

respecto de la varianza fenotípica para cada componente (simétrico y asimétrico), como ya se ha citado que es requerido para comprobar si el cambio en IM también representa una modificación del cambio fenotípico (Hallgrímsson et al., 2009).

Además, las estimaciones de IM y AF fueron comparadas con una gráfica de puntos y significada su relación con una correlación lineal simple. Siguiendo la idea anterior, sobre la correspondencia entre IM y morfoespacios, el objetivo es conocer si determinado patrón de IM era coincidente también con el indicador de varianza de la AF (cuadrados medios, MS). Se replicó el análisis para cada morfoespacio (asimétrico y simétrico) y las diferentes submuestras. De esta manera, se tendrá una evidencia más de si la AF y la IM están correlacionadas, posibilitando la especulación sobre si comparten o no las mismas rutas (*pathways*).

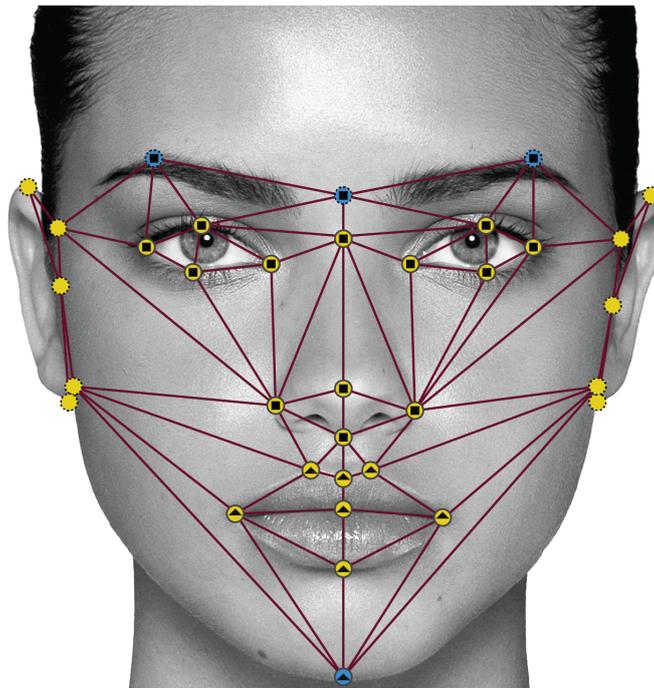


Figura 8.3 Polígono de adyacencia de los *landmarks* utilizados en el estudio de la modularidad e IM de la cara. Los círculos con fondo amarillo representan la HMF y HFLM, círculos con borde gris continuo (neurocráneo) y borde discontinuo negro (espanocráneo) representan la HMNC. Los cuadrados negros representan la cara superior y los triángulos negros la cara inferior, ambos de la HMCSI. La conexión (líneas de interconexión) se mantuvo invariante durante el análisis.

Resultados

El cálculo de modularidad de Klingenberg, (2011) evidenció que para el caso del componente asimétrico la hipótesis funcional es la que presenta la menor covariación o, dicho de otro modo, la mejor evidencia de modularidad (Tabla 8.1, casillas en gris). Sin embargo, para el caso del componente simétrico, de la forma la hipótesis de la cara superior-inferior es la de menor covariación (casilla azul). Dicha relación de modularidad se mantiene constante para todas las submuestras exploradas e invariante a la componente analizada (ver Tabla 8.1).

Las correlaciones entre matrices de covarianza de la variación individual y AF muestran, de manera general (muestra total), que existen una proporcionalidad entre dichas matrices (Tabla 8.2): la correlación es de 0.49 y es altamente significativa. Cuando fueron realizados el mismo conjunto de análisis por módulo y submuestras resultó en que los valores de correlación

aumentaron (Tabla 8.2). En los individuos con una ancestría genética preponderantemente amerindia se observó que en los módulos de los ojos o medio, orejas o lateral y neurocráneo existía una correlación por arriba de 72% para valores α de 0.01 y 0.05 entre las matrices de covariación individual y AF; mientras que el módulo sagital presenta una correlación de 75% pero sin significación estadística ($p=0.50$). Los individuos con ancestría genética Europea presentaron el mismo patrón anterior aunque con valores de correlación entre 66 y 96%. Aquellos individuos heterocigotos/mestizos mostraron los mismos valores anteriores. En los homocigotos, en contraposición, los módulos ojos o midsagital y orejas o lateral presentaron valores de correlación por arriba del 69%, con valores de significación α de 0.05 y 0.01 (Tabla 8.2).

La gráfica de las correlaciones (Figura 8.4) entre la variación individual, asimétrica y el error da cuenta de la complejidad de las fuentes de variación asimétrica. Por ejemplo, en el caso de la AF algunos de los individuos “rompen” la distribución normal de los datos y se aíslan mostrándose como “*outliers*” en la correlación. Si bien existen individuos que tienen bajos valores de asimetría, el patrón solo explica el 0.49% de los datos (Tabla 8.2). En el caso del error, al tener menos valores *outliers*, el valor de correlación parece más alto.

Los cálculos de IM, para la muestra total y diversas submuestras (Tabla 8.3) y sus respectivas gráficas (Figura 8.5) muestran que, para la muestra total, los valores de menor IM para ambos componentes se concentra en la línea sagital (se posicionan por debajo del intervalo de confianza $\alpha=0.01$ de la regresión). En el caso del componente asimétrico el esplancocráneo también se posiciona fuera del intervalo (Figura 8.5) mientras que la nariz lo hace para el componente simétrico. En contraparte, los valores mayores de IM se dan para la boca en el componente simétrico y en los ojos para el componente asimétrico, pero éstos se mantienen dentro del rango de variación del 99% de la regresión (Figura 8.5). Para el caso de los individuos con una ancestría genética amerindia, la menor IM la presentan en nariz en la componente asimétrica y en las orejas o lateral en la componente simétrica (Figura 8.5). Los individuos con ancestría genética europea son aquellos con más disruptión de los patrones de IM. Los valores de IM más bajos están en la línea sagital (no fuera del intervalo de 99% en la gráfica de regresión), aunque, las regiones del esplancocráneo y sagital en el componente asimétrico. En contraste, los valores de IM más altos están en el módulo lateral u orejas para el componente asimétrico (significativo para el intervalo $\alpha=0.01$) y en la boca para la componente simétrica, (Figura 8.5). Finalmente, en los individuos con ancestría genética heterocigota, los valores menos de IM se centran en la línea lateral u orejas (Figura 8.5). Finalmente, los individuos con configuración genómica homocigota los valores de menor integración son para la línea sagital, en ambos componentes y fuera del rango inferior de significación para el intervalo $\alpha=0.01$. Cabe destacar que la nariz (ambos componentes) y esplancocráneo (componente asimétrico) se ubica fuera del rango de variación del 99% (Figura 8.5). Los mayores valores de IM se presentaron en la boca aunque no fuera del intervalo del 99%.

Complementando los patrones encontrados anteriormente, los resultados de las correlaciones entre la IM y la variabilidad fenotípica (varianza total o traza) son significativos únicamente para la muestra total (componente simétrico) con un coeficiente de determinación de 0.48 (Tabla 8.4).

Finalmente, la Figura 8.6 representa la distribución de la variación individual, la asimetría

direccional (AD) y la asimetría fluctuante (AF) respecto de la IM para cada componente. Igualmente, los resultados de la regresión entre la AF y la IM para ambos componentes de forma (simétrica y asimétrica), muestran únicamente una alta correlación significativa entre el patrón de AF y de IM únicamente para el componente simétrico (Tabla 8.5). Cabe destacar que en el componente asimétrico se observan niveles de correlación altos pero sin que éstos sean significativos.

Tabla 8.1. Resultados del test de modularidad de Klingenberg, (2011). Se presentan datos de los coeficientes RV multi-set, número de particiones y proporciones (indicador de significación) y aquellas particiones con el mínimo RV para cada hipótesis modular analizada y en las diversas fuentes de variación exploradas: muestra total y submuestras (amerindio, europeo, mestizo/heterocigoto y homocigoto). En gris, las casillas con el valor de RV menor para el componente asimétrico y en azul la del componente simétrico.

Fuente de variación	Hipótesis	Componente	Coefficiente RV multi-set	No particiones consideradas	Particiones	Proporción (p)	Partición RV min	
Muestra total	Funcional	Asimétrico	0.183	554	1	0.002	0.183	
		Simétrico	0.286	554	1	0.002	0.286	
	Neuro-Cara	Asimétrico	0.370	653	252	0.386	0.180	
		Simétrico	0.444	653	21	0.032	0.389	
	Cara sup-inf	Asimétrico	0.242	5113	97	0.019	0.197	
		Simétrico	0.213	5113	1	0.000	0.213	
	Linea media	Asimétrico	0.235	499	11	0.022	0.198	
		Simétrico	0.349	499	3	0.297	0.297	
	Amerindio	Funcional	Asimétrico	0.239	554	1	0.002	0.239
			Simétrico	0.312	554	1	0.002	0.312
Neuro-Cara		Asimétrico	0.496	653	327	0.501	0.220	
		Simétrico	0.473	653	31	0.047	0.430	
Cara sup-inf		Asimétrico	0.277	193	3	0.016	0.271	
		Simétrico	0.242	193	1	0.005	0.242	
Linea media		Asimétrico	0.302	499	14	0.028	0.250	
		Simétrico	0.373	499	9	0.018	0.315	
Europeo		Funcional	Asimétrico	0.189	554	1	0.002	0.189
			Simétrico	0.274	554	1	0.002	0.274
	Neuro-Cara	Asimétrico	0.341	653	252	0.386	0.161	
		Simétrico	0.436	653	16	0.025	0.397	
	Cara sup-inf	Asimétrico	0.254	193	4	0.021	0.236	
		Simétrico	0.228	193	1	0.005	0.228	
	Linea media	Asimétrico	0.229	499	7	0.014	0.206	
		Simétrico	0.337	499	5	0.010	0.272	
	Mestizo	Funcional	Asimétrico	0.191	554	1	0.002	0.191
			Simétrico	0.289	554	1	0.002	0.289
Neuro-Cara		Asimétrico	0.390	653	254	0.389	0.190	
		Simétrico	0.443	653	16	0.025	0.397	
Cara sup-inf		Asimétrico	0.248	193	8	0.041	0.232	
		Simétrico	0.231	193	1	0.005	0.231	
Linea media		Asimétrico	0.247	499	12	0.024	0.204	
		Simétrico	0.353	499	5	0.010	0.290	
Homocigoto		Funcional	Asimétrico	0.199	554	1	0.002	0.199
			Simétrico	0.293	554	1	0.002	0.293
	Neuro-Cara	Asimétrico	0.388	653	280	0.429	0.168	
		Simétrico	0.466	653	20	0.031	0.407	
	Cara sup-inf	Asimétrico	0.249	193	5	0.026	0.237	
		Simétrico	0.223	193	1	0.005	0.223	
	Linea media	Asimétrico	0.247	499	8	0.016	0.213	
		Simétrico	0.353	499	3	0.006	0.307	

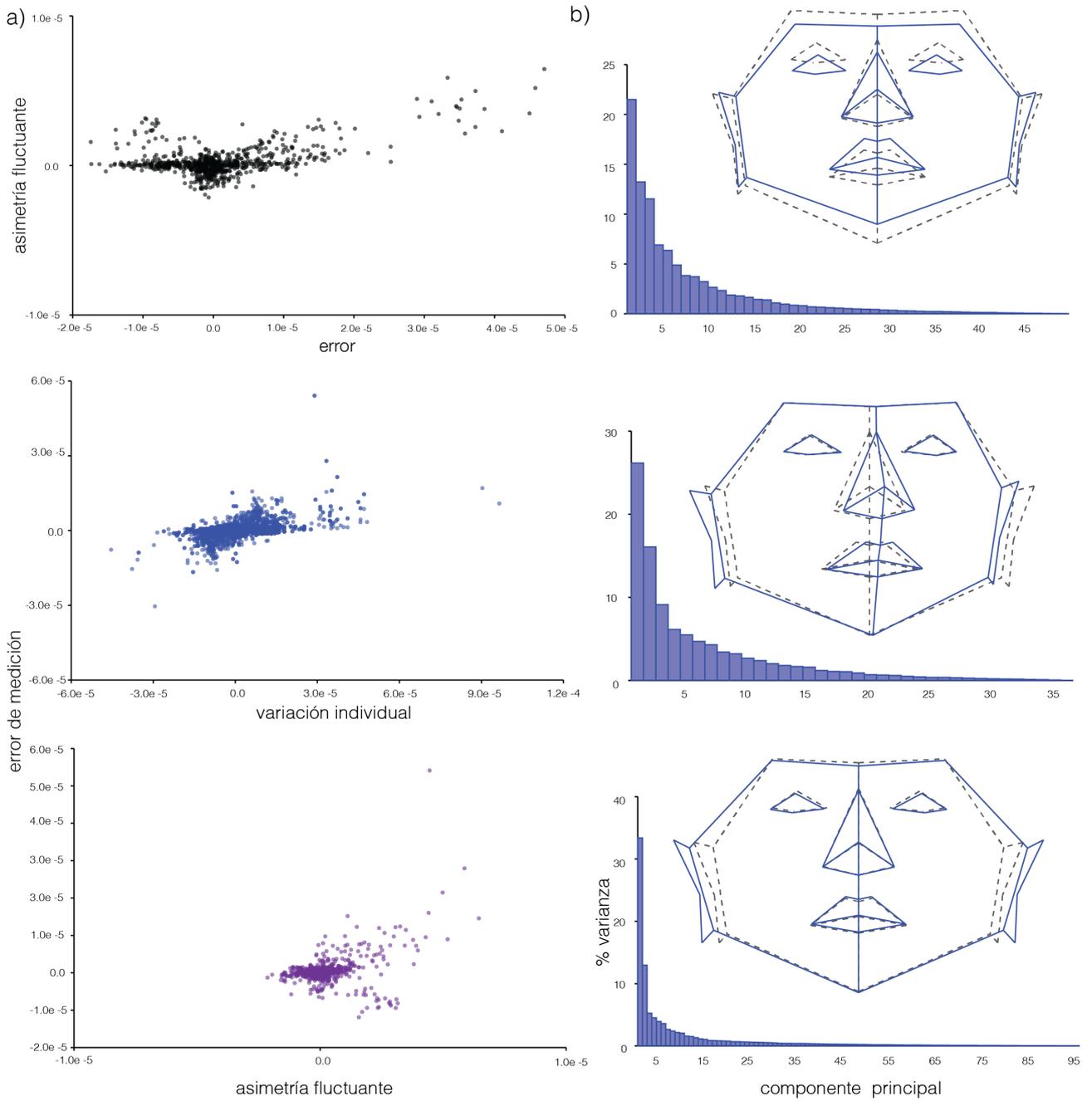


Figura 8.4 a) Gráficos de la comparación de las matrices de covarianza producto del análisis Procrustes Anova para la variación Individual, la AF y el error de medición. B) Análisis de componentes principales (PCA) derivados de éstas matrices. Cada matriz de covarianza fue comparada de a pares. El histograma de los componentes principales resultantes de cada matriz se acompaña de un polígono de forma que describe los principales puntos de cambio asociado a esa parte de la variación. Se presentan los gráficos referentes a la muestra total.

Tabla 8.2 Valores de correlación entre matrices de la variación individual (Ind), AF y error para la muestra total y submuestras. Valores de significación p para 10,000 permutaciones. Las casillas azules muestran las correlaciones más altas y significativas (en naranja claro se muestra el valor de significación p). Las casillas delimitadas con cuadro punteado indican el valor más alto de correlación.

Fuente	Iteración/módulo	Correlación	Valor p
Muestra total	Ind AF	0.495	<.0001
	Ind Error	0.529	<.0001
	AF Error	0.383	<.0001
Amerindio	Configuración total	0.475	<.0001
	Neurocráneo	0.710	0.0009
	Esplacocráneo	0.493	0.094
	Sagital	0.771	0.332
	Midsagital/ojos	0.752	0.041
	Lateral/orejas	0.729	0.008
	Boca	0.577	1
	Nariz	0.455	1
	Cara superior	0.657	0.002
Cara inferior	0.607	1	
Europeo	Configuración total	0.532	<.0001
	Neurocráneo	0.661	0.001
	Esplacocráneo	0.488	0.230
	Sagital	0.748	0.332
	Midsagital/ojos	0.694	0.043
	Lateral/orejas	0.666	0.010
	Boca	0.572	1
	Nariz	0.345	1
	Cara superior	0.685	0.001
Cara inferior	0.584	1	
Mestizo	Configuración total	0.530	<.0001
	Neurocráneo	0.722	0.002
	Esplacocráneo	0.503	0.052
	Sagital	0.753	0.503
	Midsagital/ojos	0.757	0.043
	Lateral/orejas	0.750	0.008
	Boca	0.590	1
	Nariz	0.367	1
	Cara superior	0.687	0.001
Cara inferior	0.602	1	
Homocigoto	Configuración total	0.507	<.0001
	Neurocráneo	0.647	0.002
	Esplacocráneo	0.466	0.478
	Sagital	0.754	0.505
	Midsagital/ojos	0.729	0.045
	Lateral/orejas	0.693	0.009
	Boca	0.579	1
	Nariz	0.355	1
	Cara superior	0.683	0.003
Cara inferior	0.584	0.504	

Tabla 8.3. Valores de varianza total, varianza de los eigenvectores, varianza de los eigenvectores escalada por la varianza total y la anterior escalada también por la varianza total. Se presentan datos para la muestra total y submuestras (ancestrías europea, amerindia, mestiza/heterocigota y homocigotos). Casillas verdes indican mayor valor de IM (oscuro) y menor (claro) de la componente asimétrica y en rojo de la componente simétrica con el mismo patrón de intensidad de color.

Fuente de variación	Hipotesis	Módulos	Varianza total		Varianza eigenvectores		Veevt		Veevtnv	
			Asimétrica	Simétrica	Asimétrica	Simétrica	Asimétrica	Simétrica	Asimétrica	Simétrica
Muestra total	Neuro-Cara	Configuración total	0.0004	0.003	2.2E-10	1.4E-08	0.001	0.001	0.066	0.076
		Neurocráneo	0.0003	0.002	4.9E-10	2.0E-08	0.004	0.005	0.071	0.088
		Esplacnocráneo	0.0005	0.004	4.7E-10	3.1E-08	0.002	0.002	0.060	0.074
	Linea media	Sagital	0.0007	0.006	2.1E-09	1.4E-07	0.004	0.004	0.054	0.067
		Midsagital	0.0004	0.001	1.6E-09	1.4E-08	0.012	0.009	0.120	0.079
		Lateral	0.0003	0.001	7.1E-10	1.4E-08	0.008	0.008	0.100	0.100
	Funcional	Boca	0.0011	0.009	2.5E-08	2.0E-06	0.019	0.026	0.137	0.242
		Orejas	0.0003	0.001	7.1E-10	1.4E-08	0.008	0.008	0.100	0.100
		Ojos	0.0004	0.001	1.6E-09	1.4E-08	0.012	0.009	0.120	0.079
	Tercios faciales	Nariz	0.0005	0.005	3.0E-09	3.3E-07	0.014	0.013	0.063	0.079
		Medio	0.0005	0.004	1.8E-09	1.1E-07	0.006	0.007	0.102	0.128
		Inferior	0.0009	0.009	8.9E-09	1.3E-06	0.012	0.016	0.101	0.182
Amerindio	Neuro-Cara	Configuración total	0.0004	0.003	3.7E-10	1.2E-08	0.002	0.002	0.090	0.083
		Neurocráneo	0.0004	0.002	6.0E-10	2.2E-08	0.004	0.006	0.073	0.097
		Esplacnocráneo	0.0005	0.003	6.1E-10	2.3E-08	0.002	0.002	0.062	0.074
	Linea media	Sagital	0.0003	0.001	7.0E-10	1.8E-08	0.007	0.010	0.095	0.121
		Midsagital	0.0004	0.001	1.3E-09	8.5E-09	0.009	0.006	0.088	0.059
		Lateral	0.0008	0.005	3.6E-09	7.8E-08	0.005	0.003	0.067	0.057
	Funcional	Boca	0.0014	0.006	3.8E-08	6.6E-07	0.019	0.016	0.140	0.144
		Orejas	0.0008	0.005	3.6E-09	7.8E-08	0.005	0.003	0.067	0.057
		Ojos	0.0004	0.001	1.3E-09	8.5E-09	0.009	0.006	0.088	0.059
	Tercios faciales	Nariz	0.0005	0.004	1.8E-09	2.2E-07	0.008	0.014	0.037	0.087
		Medio	0.0007	0.004	2.2E-09	5.6E-08	0.005	0.004	0.099	0.086
		Inferior	0.0010	0.007	1.1E-08	6.4E-07	0.012	0.013	0.100	0.146
Europeo	Neuro-Cara	Configuración total	0.0004	0.003	2.2E-10	1.1E-08	0.002	0.001	0.070	0.071
		Neurocráneo	0.0004	0.002	7.4E-10	2.1E-08	0.005	0.005	0.091	0.086
		Esplacnocráneo	0.0004	0.004	5.0E-10	3.2E-08	0.003	0.002	0.067	0.075
	Linea media	Sagital	0.0007	0.006	2.1E-09	1.3E-07	0.005	0.004	0.059	0.066
		Midsagital	0.0004	0.001	1.4E-09	1.5E-08	0.011	0.009	0.115	0.085
		Lateral	0.0003	0.001	1.4E-09	1.8E-08	0.011	0.009	0.150	0.106
	Funcional	Boca	0.0010	0.008	1.8E-08	1.7E-06	0.018	0.026	0.126	0.239
		Orejas	0.0003	0.001	1.4E-09	1.8E-08	0.011	0.009	0.150	0.106
		Ojos	0.0004	0.001	1.4E-09	1.5E-08	0.011	0.009	0.115	0.085
	Tercios faciales	Nariz	0.0005	0.005	3.7E-09	3.1E-07	0.017	0.012	0.077	0.075
		Medio	0.0006	0.004	1.7E-09	8.1E-08	0.004	0.004	0.086	0.095
		Inferior	0.0008	0.008	6.8E-09	1.2E-06	0.011	0.017	0.093	0.186
Mestizo	Neuro-Cara	Configuración total	0.0004	0.003	2.2E-10	1.2E-08	0.002	0.001	0.070	0.073
		Neurocráneo	0.0003	0.002	4.7E-10	2.2E-08	0.004	0.005	0.069	0.087
		Esplacnocráneo	0.0005	0.004	4.8E-10	2.9E-08	0.002	0.002	0.057	0.073
	Linea media	Sagital	0.0003	0.001	5.4E-10	1.6E-08	0.006	0.008	0.083	0.102
		Midsagital	0.0004	0.001	2.0E-09	1.2E-08	0.013	0.008	0.130	0.070
		Lateral	0.0007	0.006	2.3E-09	1.2E-07	0.004	0.003	0.055	0.061
	Funcional	Boca	0.0013	0.008	3.2E-08	1.3E-06	0.020	0.021	0.144	0.192
		Orejas	0.0007	0.006	2.3E-09	1.2E-07	0.004	0.003	0.055	0.061
		Ojos	0.0004	0.001	2.0E-09	1.2E-08	0.013	0.008	0.130	0.070
	Tercios faciales	Nariz	0.0005	0.005	3.2E-09	3.5E-07	0.016	0.014	0.071	0.090
		Medio	0.0006	0.004	1.5E-09	7.4E-08	0.004	0.004	0.079	0.087
		Inferior	0.0009	0.008	1.1E-08	9.3E-07	0.013	0.014	0.103	0.155
Homocigoto	Neuro-Cara	Configuración total	0.0004	0.003	2.6E-10	1.6E-08	0.002	0.002	0.073	0.084
		Neurocráneo	0.0004	0.002	6.7E-10	3.3E-08	0.005	0.007	0.081	0.112
		Esplacnocráneo	0.0005	0.004	5.2E-10	3.6E-08	0.002	0.002	0.062	0.077
	Linea media	Sagital	0.0007	0.006	2.4E-09	1.3E-07	0.004	0.004	0.058	0.064
		Midsagital	0.0004	0.001	1.4E-09	1.5E-08	0.010	0.009	0.102	0.079
		Lateral	0.0003	0.001	1.1E-09	1.9E-08	0.010	0.009	0.126	0.108
	Funcional	Boca	0.0011	0.008	2.3E-08	1.4E-06	0.018	0.023	0.127	0.211
		Orejas	0.0003	0.001	1.1E-09	1.9E-08	0.010	0.009	0.126	0.108
		Ojos	0.0004	0.001	1.4E-09	1.5E-08	0.010	0.009	0.102	0.079
	Tercios faciales	Nariz	0.0005	0.005	3.0E-09	3.3E-07	0.013	0.011	0.060	0.070
		Medio	0.0006	0.005	1.8E-09	1.1E-07	0.004	0.004	0.088	0.103
		Inferior	0.0009	0.008	8.3E-09	1.2E-06	0.012	0.016	0.094	0.181

Veevt=varianza de los eigenvectores escalada por la varianza total. Veevtnv=varianza de los eigenvectores escalada por la varianza total y el número de variables.

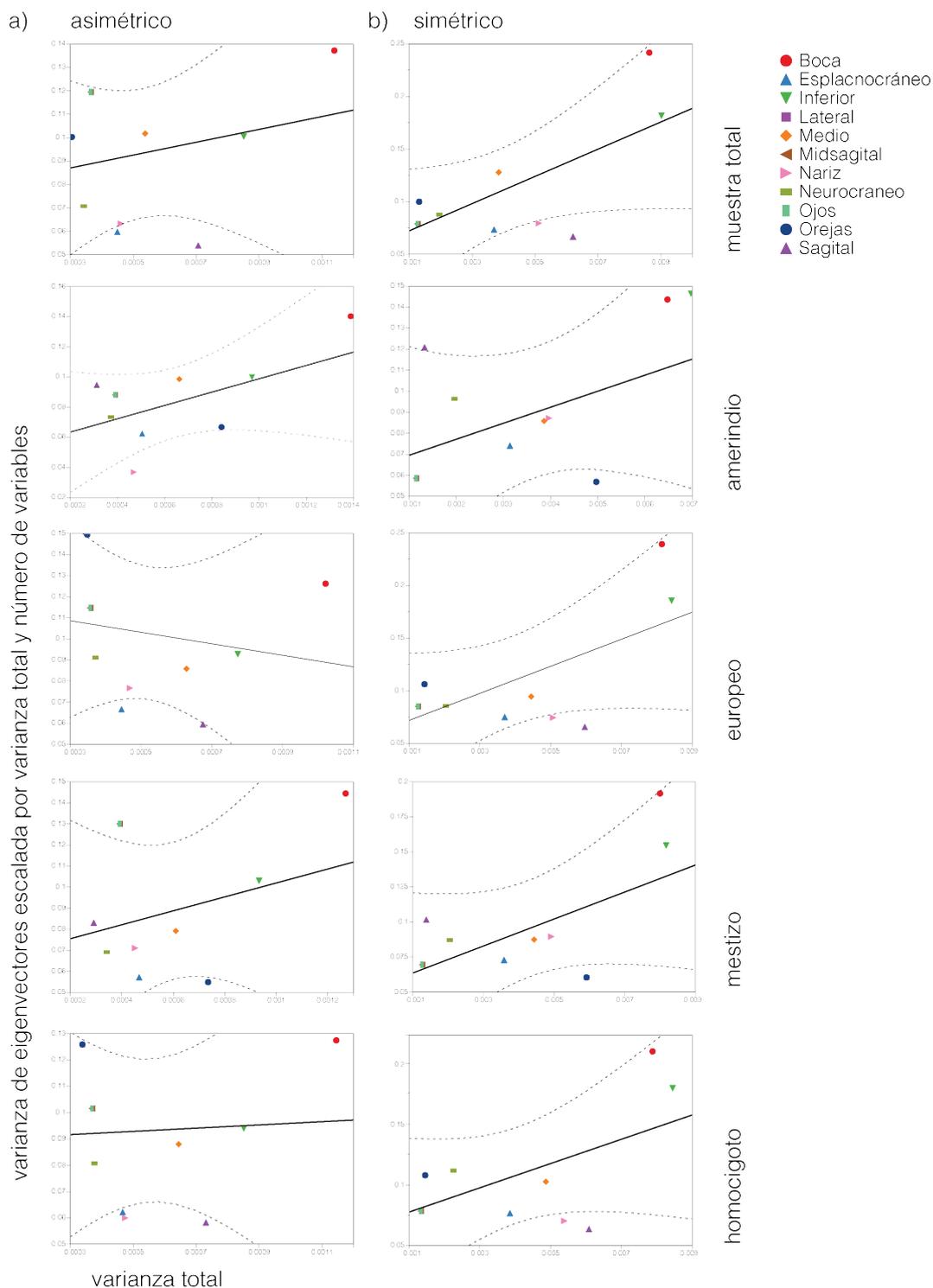


Figura 8.5. Regresión lineal simple de la varianza de los eigenvectores escalada por la varianza total y el número de variables y la varianza total fenotípica (traza) para la muestra total y diversas submuestras (ver extremo derecho de la figura). a) Componente asimétrico de la forma, b) componente simétrico. Línea negra continua representa el ajuste del modelo y la línea curva discontinua el intervalo de confianza α 0.01. La referencia para la identificación de cada módulo parece en el extremo superior derecho de la figura.

Tabla. 8.4. Resultado de la regresión entre la IM y la varianza total (traza) de los componentes simétricos y asimétricos. Se presentan los datos de ajuste y error de la regresión, con sus respectivos los valores p de significación. Casillas en naranja claro indican las únicas iteraciones significativas en la prueba para el intervalo $\alpha=0.05$

Componente	Efecto	r^2	RMSE	gl	SS	MS	F	p
Asimétrico	Muestra total	0.070	0.028	1	0.001	0.001	0.678	0.432
	Amerindio	0.302	0.024	1	0.002	0.002	3.887	0.080
	Europeo	0.038	0.032	1	0.000	0.000	0.359	0.564
	Mestizo	0.089	0.033	1	0.001	0.001	0.884	0.372
	Homocigoto	0.004	0.028	1	0.000	0.000	0.034	0.859
Simétrico	Muestra total	0.489	0.041	1	0.014	0.014	8.619	0.017
	Amerindio	0.22	0.031	1	0.002	0.002	2.542	0.145
	Europeo	0.421	0.043	1	0.012	0.012	6.553	0.031
	Mestizo	0.219	0.005	1	0.006	0.006	5.016	0.052
	Homocigoto	0.333	0.040	1	0.007	0.007	4.489	0.063

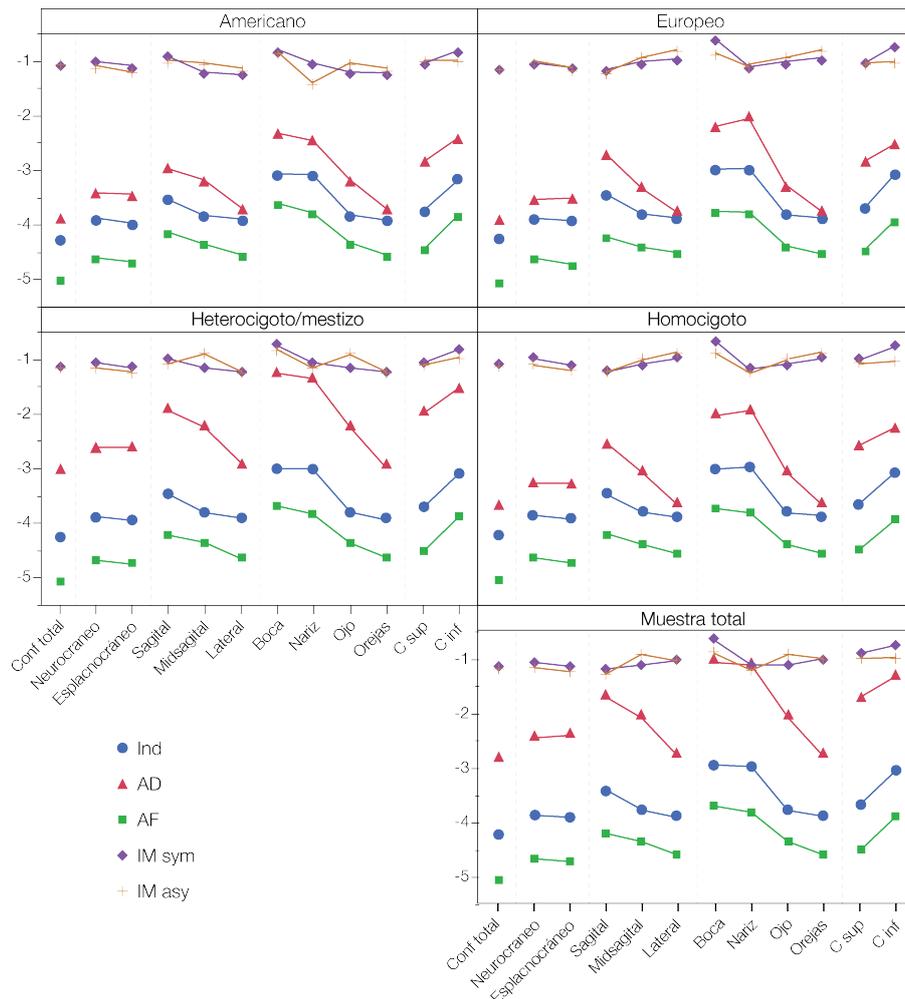


Figura 8.6 Gráfica de puntos del contraste gráfico de los patrones de variación Individual (Ind), AD, AF e IM para los componentes simétrico y asimétrico. Se presentan los datos ordenados por hipótesis de modularidad para la muestra total y sub-muestras. Las líneas entre los valores de cada fuente de variación intentan generalizar el patrón dentro de cada hipótesis de modularidad.

Tabla 8.5 Resultados de la regresión de la AF sobre la IM en ambos componentes de la forma (asimétrica y simétrica), para la muestra total y submuestras (amerindia, europea, mestiza/heterocigota y homocigota). Se presentan datos de r^2 , RMSE, correlación, gl, SS, MS, valor F y valor p . Las casillas gris claro representan las únicas iteraciones con significación estadística para el intervalo $\alpha=0.05$ y 0.01 .

Componente	Efecto	r^2	RMSE	Correlación	gl	SS	MS	F	p
Asimétrico	Muestra total	0.071	0.028	0.266	1	0.001	0.001	0.686	0.429
	Amerindio	0.201	0.025	0.448	1	0.001	0.001	2.265	0.167
	Europeo	0.005	0.033	-0.072	1	0.000	0.000	0.046	0.834
	Mestizo	0.276	0.030	0.525	1	0.003	0.003	3.426	0.097
	Homocigoto	0.002	0.028	0.046	1	0.000	0.000	0.019	0.894
Simétrico	Muestra total	0.510	0.040	0.714	1	0.015	0.015	9.384	0.014
	Amerindio	0.541	0.024	0.735	1	0.006	0.006	10.596	0.010
	Europeo	0.404	0.044	0.636	1	0.012	0.012	6.109	0.036
	Mestizo	0.738	0.022	0.859	1	0.013	0.013	25.306	0.001
	Homocigoto	0.344	0.040	0.586	1	0.008	0.008	4.713	0.058

Discusión

En éste capítulo se han evaluado cuatro hipótesis bajo tres supuestos generales: 1) diferentes perturbaciones ambientales o genéticas son promotoras de variaciones o desviaciones en las vías del desarrollo con traducción en cambios fenotípicos (Murren, 2012), 2) el análisis de la AF podría sugerir que la integración del desarrollo puede desempeñar un papel importante en la canalización de la variación a través de períodos de cambio ambiental (Goswami et al., 2015) y 3) la covariación en la AF de diferentes rasgos se debe exclusivamente a la covariación de las vías de desarrollo directos (Klingenberg 2003ab, 2004, 2005). Las hipótesis predecían: 1) que aquellas hipótesis *a priori* con baja modularidad presentarán una covariación entre subconjuntos débil y por ende, una incipiente relación entre módulos, 2) que no habría diferencias entre las matrices de covariación de la variación individual y la AF, 3) que el patrón de IM será bajo en todas las muestras a prueba en éste capítulo y, también 4) que se espera una nula correlación entre la IM y la AF en la muestra total y submuestras analizadas. A continuación se discuten los resultados, sus implicaciones y limitaciones.

Modularidad facial

Las pruebas de modularidad facial realizadas dan cuenta de la complejidad de la estructura facial. Si bien se han explorado varias hipótesis modulares, la realidad es que hay un sinfín de hipótesis que se superponen y podrían dar respuesta a los patrones de variación observados en el morfoespacio simétrico y asimétrico. De manera general, la muestra resultó presentar coeficientes RV multi-set bajos y altamente significativos para la hipótesis funcional (HMF) del componente asimétrico y para la hipótesis cara superior-inferior (HMCSI) del componente simétrico (Tabla 8.1), inclusive manteniéndose en las sub-muestras analizadas. Lo anterior, permite asegurar que los patrones modulares presentados en los resultados se mantienen aun cuando es considerado el contexto genético de los individuos.

Pocos estudios han estimado la modularidad de las estructuras faciales externas (tejido blando). Sin embargo hay algunos acercamientos desde la estructura ósea (Bastir y Rosas, 2005) y desde una perspectiva más integrativa como lo es el trabajo de Esteve-Altava et al. (2015) donde se vislumbra un nuevo enfoque basado en el análisis de redes de módulos musculo-esqueléticos. Los autores explican que las matrices funcionales son necesarias para conectar los huesos faciales, lo que desafía el papel del cerebro en la formación de límites entre los huesos de la caja craneana y el papel del crecimiento óseo en la instauración de éstos patrones modulares (Esteve-Altava y Rasskin-Gutman, 2014). Los estudios clásicos de modularidad fenotípica se enfocaron principalmente en el análisis funcional y de desarrollo de la unidades esqueléticas (Bastir y Rosas, 2005; Bastir, 2008). Por ejemplo, un estudio reciente ha indicado que la semi-independencia de módulos no sólo se caracteriza por sus aspectos espaciales, sino también por su propia estructura ontogénica temporal (Bastir et al., 2006), lo que refuerza el reconocimiento del papel integrador del desarrollo y su complejidad. Sabemos pues que la modularidad e IM del cráneo humano adulto son el resultado de una evolución en mosaico

de partes embrionarias con diversos mecanismos de desarrollo (Bastir y Rosas, 2005, 2009; Bastir, 2008; Klingenberg, 2008; Lieberman, 2011; Martínez-Abadías et al., 2012). Sin embargo, una consecuencia de la parcelación o modularidad en un sistema como la cara es que usualmente se presenta una variación desigual entre módulos respecto de su variación genética (Marroig et al., 2012). Los resultados indican que los patrones de modularidad entre morfoespacios (simétrico y asimétrico) siguen diferentes patrones. Lo que podría estar relacionado a la premisa anterior sobre los efectos de la parcelación respecto del contexto genético más el efecto integrador del ambiente.

De éste modo, se puede sugerir que el patrón modular que acciona dentro del morfoespacio asimétrico esté en relación con la funcionalidad (Tabla 8.1), es decir, con la división ojos, nariz, boca y orejas en la cara. El patrón funcional refleja alguna señal del proceso del desarrollo como ya lo han discutido otros autores (ver Esteve-Altava y Rasskin-Gutman, 2014; Esteve-Altava et al., 2015). Así, los resultados demuestran que la complejidad del desarrollo, crecimiento e integración del cráneo o cara tiene implicancias incluso en los morfoespacios simétrico y asimétrico. De igual manera se debe señalar que dicho patrón modular es recurrente en cada componente o morfoespacio y es un fenómeno emergente como consecuencia de la presencia de patrones de IM heterogéneos.

Luego entonces, éste trabajo y otros (e.g. Martínez-Abadías et al., 2012) muestran que la definición de los módulos craneofaciales no resulta de la simple división tradicional de neurocráneo, base y espagnocráneo (Bastir, 2008; Lieberman, 2011). La dificultad en la exploración de las relaciones entre módulos craneofaciales puede ser discutida desde la perspectiva del modelo de palimpsesto, que sostiene que los factores de covariación se influyen entre sí a través del tiempo, por lo que inferir éstos factores a partir del fenotipo, es una forma de explorar las diversas pautas de interrelaciones durante el desarrollo (Hallgrímsson et al., 2009).

Además, Esteve-Altava et al., (2013), mediante un análisis de *clusters*, refieren que el patrón modular difiere en lo referente a la lateralidad, sobre todo en el hueso maxilar. De igual manera define que la cara es un espacio modular con cuatro subunidades con una variación modular diferente en los lados de la cara cuando estos se comparan a nivel óseo y muscular (Esteve-Altava et al., 2015). También, como ya se ha esbozado, la diferencia entre patrones de modularidad entre morfoespacios puede estar relacionada a las respuestas diferenciales en las vías de desarrollo ligadas con la expresión génica encaminadas a la diferenciación izquierda-derecha o de la simetría bilateral en general.

Todo parece indicar que la hipótesis modular funcional estaría siendo gobernada por patrones de expresión genética pervasivos o penetrantes, ya que la significación en ambos componentes (simétrico y asimétrico) es grande, así como lo es también su baja covariación (Tabla 8.1). Sin embargo, para el caso del componente asimétrico, si bien también la hipótesis modular funcional sería significativa, la hipótesis modular de la cara superior inferior tiene la menor covariación. Algunos autores han planteado la hipótesis de que los patrones de modularidad genética y de desarrollo deben evolucionar hasta coincidir con los patrones de modularidad funcional (Cheverud, 1984, 1996; Wagner, 1996; Wagner y Altenberg, 1996). Esta hipótesis de coincidencia entre patrones de modularidad (Breuker et al., 2006a), proporciona una base para la investigación de la relación en la modularidad de la asimetría fluctuante. Los

datos expuestos demuestran que si bien los patrones de covariación funcional tienen correspondencia entre los espacios, lo que sería una razón para apoyar que la modularidad genética, del desarrollo y funcionales confluyen en la cara human. Sin embargo los datos aportan evidencia de que no todos los patrones siguen esa misma regla. Por ejemplo, que otras hipótesis de modularidad resulten con significación, covariaciones y particiones mínimas cercanas al patrón central esperado. Si observamos los resultados (Tabla 8.1) se puede ver que la única sub-muestra que cambia es la amerindia para el componente asimétrico, donde la hipótesis de cara superior-inferior también presenta resultados significativos y baja covariación. Esto complejiza los resultados ya que, como ya se ha enfatizado en el Capítulo IV la ancestría genética parece tener alguna implicación en el patrón asimétrico observado (ver Quinto-Sánchez et al., 2015).

Contraste de matrices de covariación

En primera instancia, aunque con un 49% de correlación, el contraste de las matrices de covariación individual y AF en la muestra total pareciera ser proporcional. Este resultado ya ha sido reportado en una comunicación anterior sugiriendo una posible igualdad relativa entre matrices (ver Quinto-Sánchez et al 2015). Sin embargo, cuando se realiza el mismo análisis más detallado (en las sub-muestras) y por módulos algunos patrones de covariación emergen alcanzando un máximo del 75% de correlación. En éste sentido, el primer escenario a discutir es la propuesta de Klingenberg, (2003, 2005; et al., 2003) que sostiene que si existe una correlación significativa entre las matrices de covarianza de la variación individual y la AF se puede especular que ambas fueron modeladas de manera similar durante el desarrollo. Es así que cualquier diferencia entre los patrones es el resultado de las diferencias entre los tiempos en los que fueron modelados los espacios de la variación fenotípica durante el desarrollo. Con ese contexto, el análisis mostró que los patrones de covariación individual coincidieron con los patrones de AF solo para algunos módulos faciales. Estos resultados son iguales a los encontrados por Klingenberg et al., (2003) en su aplicación de la misma técnica a mandíbulas de ratón, donde las matrices de covarianza no logran una total asociación. En su discusión Klingenberg et al., (2003) señala que:

“este hallazgo sugiere que diferentes procesos están involucrados en la generación de la variación observada en los dos niveles. Esto significaría que los factores genéticos y ambientales que causan variación entre individuos producen patrones de variación que no tienen un equivalente directo en los procesos dentro de los individuos, lo que genera las diferencias entre los lados del cuerpo”

Los resultados presentados aquí secundan éste hallazgo e incrementan la brecha a otra especie, a una estructura mas abarcativa que la mandíbula, a espacios de expresión fenotípica diferentes (simétrica y asimétrica) y a submuestras que evidencian la ancestría genética de los individuos. En sintonía, otros autores han encontrado que la misma prueba indicó una nula congruencia entre las matrices de covarianza para la variación individual y la AF, además de no tener similitud de los patrones de componentes principales (Debat et al., 2000). El mismo autor hace particular hincapié en la posible diferencia en los procesos de amortiguamiento o *buffering* contra la variación de diferentes fuentes, debido a que los *landmarks* fueron definidos por

características tales como la cápsula nasal, arco cigomático, órbita, y la bóveda craneal, etc. Al igual que para la cara, el trabajo de Debat et al., (2000) analizó un conjunto de módulos de la mandíbula de ratón. Así, una amplia variedad de procesos toman parte en el patrón espacial de tales estructuras, que al interactuar de diferentes maneras con factores genéticos y ambientales (Leamy et al., 1999), hacen que el patrón de expresión fenotípica sea sumamente complejo. De igual manera, Klingenberg et al., (2002), no encontró congruencia entre las matrices de covariación individual y de AF en las mandíbulas faríngeas de peces cíclidos, resultado asociado a un polimorfismo identificado como fuente de discrepancia. Otro punto interesante es que para insectos se han encontrado resultados contradictorios, ya que las matrices de covariación tienen una similitud clara (ver Klingenberg y McIntyre, (1998); Klingenberg y Zaklan, (2000) para moscas; y Klingenberg et al., (2001) para abejorros). Varias explicaciones pueden responder a estas diferencias. Una de ellas es la obvia discrepancia entre genética/genómica, rutas y procesos del desarrollo en insectos, ratones, peces y humanos. En primera instancia, la diferencia entre insectos y mamíferos se basaría principalmente en sus patrones desarrollo. Un análisis a nivel filogenético macro es necesario para responder a estas preguntas en un contexto evolutivo. Debat et al. (2000) sugiere que la selección natural actuando sobre la forma de las alas de los insectos podría diluir u ocultar las diferencias entre los procesos del desarrollo entre y dentro de individuos. En el caso de la cara humana, se ha propuesto que ha sufrido procesos de selección natural importantes (e.g. Grammer y Thornhill, 1994; Perrett et al., 1999) por lo que su patrón de expresión podría estar mediado por esta fuerza evolutiva. Aunque en esta tesis no exploramos la visión selectivista de la AF, pudiera ser una fuente de futuros análisis con miras a determinar si la selección natural opera y modifica los patrones de variación fenotípica observada en la muestra.

Así, en este punto podemos asegurar que independientemente de la composición del mestizaje que un individuo posea, la discrepancia entre las matrices individual y de AF se mantiene (Tabla 8.2). Los ojos, orejas y región neurocraneana serían afectadas por procesos de estabilidad y ruido del desarrollo similares o equivalentes. La complejidad de la expresión del mosaico de las rutas del desarrollo es visualizado de manera indirecta con este análisis: la región ocular tiene un formación durante el desarrollo hacia el día 22, con la aparición de un par de surcos poco profundos en ambos lados del prosencéfalo (Sadler, 2012). Además, la migración medial de los ojos y de sus ubicaciones laterales iniciales resulta del enorme crecimiento de los hemisferios cerebrales y de la ampliación de la cabeza, así como del desplazamiento normal de los ojos hacia la línea sagital (Sperber, 2001). Los mayores movimientos migratorios de los ojos se producen entre la quinta y novena semana. A partir de entonces, se estabilizan a la angulación postnatal de los ejes ópticos (entre los 71° a 68°) (Sperber, 2001). La base genética de la regulación del ojo es bien conocida y está asociada al gen PAX6 (Sadler, 2012), teniendo intervención de los *sonic hedgehog* (SHH) para la regulación a la alza de PAX2 y a la baja de PAX6. Además, los factores de crecimiento del fibroblasto (FGF), los factores de transcripción MITF, CHX10, SOX2, BMP-4, LMAF, SIX3 y PROX1 determinan el curso de las subestructuras oculares.

En el caso de la oreja, comienza a formarse alrededor del día 22 y su desarrollo se extiende hasta la semana seis. Concretamente, sus tejidos, proceden del ectodermo. El pabellón y meato de la oreja se desplaza desde la base del cuello (región cervical) a su localización

adulto normal en el lado de la cabeza. Dicho proceso se debe en gran parte debido al crecimiento mandibular. Recientemente, resultados del consorcio CANDELA publicados en Adhikari et al. (2015) demuestran, a través de un análisis GWAS que existen siete regiones genómicas significativamente asociadas con el tamaño del lóbulo y su inserción, el plegado de antihélix, la rotación del helix, la protrusión de la oreja y el tamaño antitragus. Los rasgos están asociados a variantes de los genes EDAR, TBX15 y CART1.

En contraposición, la boca y la nariz presentan una combinación de procesos del desarrollo, es decir que son la concreción de diversos mecanismos, orígenes y diferenciaciones. Cabe destacar que proceden de la misma capa, el endodermo, formándose durante la mitad de la semana tres y manteniéndose su proceso de desarrollo hasta el nacimiento. Durante la mitad de la sexta semana las cavidades oral y nasal están divididas únicamente por la membrana oronasal. La boca es la interrelación de la prominencia maxilar y la mandibular, además de depender del cierre del paladar, el sistema vomeronasal, de la configuración de la nariz y en general de toda la cavidad faríngea (Sadler, 2012). Los procesos descritos anteriormente pueden ser la primera pauta de explicación entre la discrepancia (no proporcionalidad) de las matrices de covarianza.

En otro estudio reciente de mapeo genómico del consorcio CANDELA se encontró una asociación genómica significativa en cuatro regiones genómicas (4q31, 6p21, 7p13 y 20p11) con tres rasgos relacionados con la morfología de la nariz: la inclinación de la columela, la amplitud del puente de la nariz y la amplitud alar de la nariz (con valores $p = 3 \times 10^{-9}$ a 9×10^{-9}). De igual manera, se observó asociación más fuerte en 4q31, 6p21 y 7p13 de SNPs en los genes DCHS2, RUNX2 y GLI3, respectivamente, mientras que la región 20p11 superpone al PAX1 (para más detalle ver Fuentes-Guajardo et al., 2015). La notoria entre los "hits" en sistemas genéticos diferentes y no solapados de ambos conjuntos de fenotipos (nucleados en el pabellón auditivo en Adhikari et al., (2015) y por otro lado en la nariz Fuentes-Guajardo et al., (2015) es una evidencia interesante sobre la modularidad genética, que respalda y sustenta los resultados obtenidos aquí.

Por otro lado, existe el planteamiento de que las estructuras con mayor complejidad estructural y del esta discusión se extiende la complejidad del desarrollo, tenderían a presentar mayor cantidad de perturbaciones (Aparicio y Bonal, 2002). Los autores discuten que la AF depende de la composición estructural y que esta debe tomarse en cuenta para futuros estudios. La boca y la nariz, como ya hemos citado, son estructuras en las que convergen gran cantidad de procesos funcionales, del desarrollo y crecimiento. Quizás esta complejidad promueva o resulte en las diferencias observadas con el patrón de covarianza en ojos, orejas y neurocráneo. Un punto a resaltar es que en todas las comparaciones realizadas la cara superior, que incluye tres *landmarks* asociados al neurocráneo y el resto a nariz y boca (Figura 8.2) resultaron significativas. Este hecho puede secundar la reportada influencia del neurocráneo en la configuración del viscerocráneo o esplancocráneo (Lieberman, 2011).

Por otro lado, la hipótesis de la selección natural actuando sobre los módulos (Debat et al., 2000), la complejidad de las estructuras (Aparicio y Bonal, 2002) y la plasticidad fenotípica de la nariz y boca, en su conjunto, pueden ser una plausible respuesta a las diferencias entre la proporcionalidad de las matrices observada en los resultados. Por ejemplo, la región maxilar es una de las estructuras con mayor cantidad de plasticidad craneofacial (Paschetta, 2010),

donde el aparato masticatorio sigue creciendo incluso hasta a los 25 años (Sperber, 2001, 2006). De igual manera, para el caso de la nariz se tiene evidencia de una plasticidad asociada al clima y posiblemente sea una estructura sujeta a selección natural (Hubbe et al., 2009; Noback et al., 2011). Es admisible pensar entonces que teniendo rutas del desarrollo, patrones de crecimiento y respuestas plásticas al ambiente diferentes, la boca y nariz no obtengan la integración que el resto de módulos faciales presenta.

Integración morfológica facial

Los datos de integración morfológica (IM) son reveladores, los resultados muestran que todos los valores fluctúan en una escala muy pequeña pero mostrando a los ojos con la mayor IM para el componente asimétrico y la boca para el componente simétrico (Tabla 8.3, Figura 8.5, 8.6). Complementando este patrón, el módulo sagital presenta la menor IM en ambos componentes. Sin embargo, los datos analizados muestran que estos resultados no se mantienen constantes entre sub-muestras y componentes o morfoespacios. Así, cuando es explorada la implicación de la ancestría genética algunos cambios son notables, por ejemplo, entre los americanos y europeos los datos de mayor y menor IM fluctúan sin algún patrón aparente (Tabla 8.3). Los mestizos presentaron menor IM para la zona lateral y orejas, y mayores valores para la boca, en ambos componentes, teniendo correspondencia con los europeos (componente simétrico) y americanos (componente asimétrico) en la boca (componente simétrico); y con orejas o lateral (componente simétrico) de los americanos. Es decir, los heterocigotos/mestizos comparten algún patrón de variación con sus parentales genéticos (Figura 8.5). Finalmente, los homocigotos presentan menos IM en el módulo sagital.

A éste respecto, González-José et al., (2004) demostraron que las divergencias interpopulacionales en las matrices de varianza/covarianza no están asociadas a las matrices de distancias moleculares o morfológicas entre poblaciones humanas modernas, sugiriendo que la estabilidad de los patrones de integración es independiente de la historia y la estructura de las poblaciones. También argumentan que una explicación posible a este resultado es que los patrones de integración podrían ser limitados al nivel intraespecífico y que, en el cráneo, algunos eventos de especiación pueden implicar grandes reordenamientos de patrones de IM, mismos que facilitarían escenarios de evolución de las diferentes regiones del cráneo (González-José et al., 2004). Lo anterior presupone que la integración morfológica asume que los rasgos relacionados funcionalmente o en su desarrollo serán coherentes y producirán respuestas evolutivas coordinadas (Olson y Miller, 1958; Cheverud, 1982, 1984, 1995, 1996). Los resultados encontrados aquí secundan la idea de que los patrones de IM cambian respecto de la historia evolutiva de determinado grupo o estructura poblacional (e.g. la comparación europeo amerindio). De esta manera, particularizamos que la integración modular observada, secunda las observaciones de González-José et al. (2004).

En un estudio reciente en cabezas humanas se reveló, estudiando mutaciones del gen *FGFR1*, que no existen diferencias de forma entre los genotipos o interacciones población-genotipo, pero sí diferencias significativas entre genotipo con respecto al patrón y la magnitud de la IM, donde un estadio del sitio intrónico homocigoto derivado de la mutación de G a C, tiene un papel potenciador de la intensidad de IM (Hünemeier et al., 2014). Sin embargo, dicho

cambio de aminoácido no repercutió en diferencias entre la muestra de nativos americanos y de mestizos mexicanos analizadas en el trabajo. Tal como los resultados obtenidos aquí, algunas arquitecturas genéticas parecen manifestar una respuesta de mayor integración en el trabajo de Hünemeier et al., (2014).

Igualmente, se ha propuesto que el patrón de IM en humanos parece ser generalizado (Martínez-Abadías et al., 2012) y conservado (González-José et al., 2004), cuando es examinado el patrón de expresión en poblaciones humanas a lo largo del globo. Aunque los estudios citados no comparten metodologías conmensurables, podríamos considerarlas comparables en función de los patrones de resultados observados. De igual manera, en otros grupos de primates se ha observado patrones diferenciales de IM (Marroig y Cheverud, 2001; Strait, 2001; Ackermann, 2005), pero algunos otros resultados reportados aquí secundan y expanden, lo señalado por aquellos trabajos que realizan análisis de dimorfologías faciales (ver Richtsmeier y DeLeon, 2009; Martínez-Abadías et al., 2011).

Toda la evidencia generada hasta ahora por estudios previos se centra en el componente simétrico de forma. Sin embargo aquí se aporta la perspectiva del morfoespacio asimétrico, cuya revisión bibliográfica indica que no hay referencia en humanos. Así, que el aporte de que los ojos (configuración total), la boca (amerindios, europeos, homo y heterocigotos) y las orejas presentan mayor cantidad de IM (Tabla 8.3) es el resultado más destacable. Podríamos decir que esta sección desarrolla la exploración, caracterización y análisis de la modularidad e integración del morfoespacio asimétrico de forma.

Los estudios sobre AF sugieren que la integración del desarrollo puede desempeñar un papel importante en la canalización de la variación a través de períodos de cambio ambiental. Estudiando cráneos de carnívoros del Pleistoceno Tardío se presenta evidencia de una relación entre la AF, la integración fenotípica, la varianza y el cambio ambiental o el estrés (Goswami et al., 2015), resultados que son corroborados en mandíbulas de musarañas (para detalle ver Badyaev et al., 2000; Badyaev y Foresman, 2004). En este ejemplo, los efectos del estrés ambiental inducido artificialmente sobre la integración del desarrollo y la variación en las mandíbulas de musaraña, demostraron que la AF y la variación de la población estresada aumentaron y que dicho aumento se canalizó a lo largo de la misma dirección que la variación entre las especies (Badyaev et al., 2000; Badyaev y Foresman, 2004). Es decir, la AF se correlacionó mucho con la integración fenotípica dentro de cada muestra, lo que demuestra que el aumento de la varianza se canalizó por las interacciones de desarrollo a lo largo de las direcciones preferidas y existentes de cambio de forma. En los resultados presentados aquí, los europeos, para la componente asimétrica, son la única sub-muestra que desvía su tendencia (Figura 8.5) referente a los patrones que se observan en las otras categorías de ancestría. Resta decir que de manera general, el patrón de AF e IM es positivo: una mayor cantidad de AF corresponde a un aumento de IM por módulo o sub-muestra. Cabe señalar aquí que no se evalúa la IM a nivel individual, pues la integración siempre es estudiada a partir de indicadores poblacionales. Además, las regresiones solo son significativas para algunos casos en el morfoespacio simétrico (muestra total) con valores de significación $\alpha=0.05$. Finalmente, los bajos valores de coeficientes de determinación y los valores de significación anteriores, llevan a considerar el patrón de proporcionalidad matricial encontrado sólo como una tendencia.

Como complemento a la evidencia anterior sobre las tendencias de las correlaciones, las

comparaciones de los patrones de variación individual (Ind), AD, AF e IM, respaldan la hipótesis de que en el componente simétrico de forma existe una correlación entre el patrón de AF e IM (ver Figura 8.5, 8.6). Pero en contraste, el morfoespacio asimétrico no presenta el mismo patrón de respuesta (Tabla 8.5). En éste sentido las líneas de regresión o tendencias de cada configuración genómica son más o menos equivalentes (es decir son positivas), salvo para el caso de la IM donde el patrón en amerindios y heterocigotos es diferencial. De todas las comparaciones realizadas los europeos, como ya se ha discutido, presentan un patrón de correlación negativa entre la IM y la AF para el componente asimétrico (Figura 8.6). Los datos anteriores reflejan que la relación entre la AF e IM entre espacios no es uniforme, y parece no concentrarse en un único vector en el espacio asimétrico. Teóricamente, entonces, se puede inferir que las rutas del desarrollo de aquellos individuos europeos obedecen a procesos diferentes, resultado que está en relación a como la asimetría se comporta en el Capítulo VI. La idea de que la IM asume que los rasgos funcionalmente y/o de desarrollo relacionados serán coherentes y producirán respuestas evolutivas coordinadas (Olson y Miller, 1958; Cheverud, 1982, 1984, 1995, 1996), parece explicar bien las tendencias de regresión observadas en el espacio simétrico, ya que durante los procesos de desarrollo se forman las estructuras que realizan funciones, se espera que la modularidad del desarrollo pueda influir en la modularidad funcional, a pesar de que no es claro qué tan fuerte es la relación entre estos dos tipos de modularidad (Breuker et al., 2006a). Parece ser que la explicación subyace en la inversa, la modularidad funcional influencia a la del desarrollo por procesos tales como la remodelación ósea y otras formas de plasticidad en la que los mecanismos de carga influyen en las tasas y dirección del crecimiento del tejido (Enlow, 1996; West-Eberhard, 2003). Si bien hay análisis que han planteado la hipótesis de que la selección hace que la modularidad funcional y genética converjan (Cheverud, 1996; Wagner y Altenberg, 1996; Leamy et al., 1997; Mezey et al., 2000; Klingenberg, 2004), otros estudios indican que diferentes estructuras morfológicas pueden realizar funciones equivalentes y, por tanto, que puede existir una considerable flexibilidad para la divergencia neutral (Wainwright et al., 2005; Young et al., 2007) o que su conectividad responde a otros niveles de explicación, independientes de la funcionalidad (Esteve-Altava y Rasskin-Gutman, 2014; Esteve-Altava et al., 2015b). Cualquiera sea el escenario, los resultados indican que la respuesta es diferenciada con base a ancestría genética, la hipótesis modular y el espacio estudiado.

Asimetría facial y su distribución
geoespacial

Introducción

“La vida y la tierra evolucionan juntas” citaba León Croizat, (1964) para referirse a la interacción dinámica entre la biología y la geología. Y a su vez, se fundan la panbiogeografía y una tesis hacia el análisis integrativo sobre el estudio de los patrones de distribución de las especies en la tierra. El impacto de la geografía y el ambiente en la variabilidad fenotípica ha sido reconocido, creando entonces una perspectiva ecogeográfica al caracterizar los patrones morfológicos y sus diferencias inter e intraespecíficas (Mayr, 1956; Ashton et al., 2000). La diversificación fenotípica a nivel intraespecífico, en su contexto geo-ecológico, motivo del presente capítulo, es resultado de factores aleatorios y no aleatorios (Carroll et al., 2007). Al respecto de la interpretación de dichos patrones geográficos y fenotípicos, Mayr, (1956) aclara que el significado de las reglas ecogeográficas yace en ser puramente generalizaciones empíricas que describen paralelismos entre la variación morfológica y características fisiográficas.

El rastreo de las evidencias en la literatura científica sobre el análisis de los patrones geográficos deja constancia de que su análisis es un continuo. Por ejemplo, uno de los modelos más empleados para explicar la diversidad o variación biológica es el modelo de aislamiento por distancia (Wright, 1943). La observación de los patrones morfológicos observados respecto de la geografía es una constante en la biología. En el caso de la especie humana, los datos de variación fenotípica craneofacial predicen que un cierto grado de diferenciación entre regiones es comparable a la de los marcadores genéticos neutros (Relethford, 2009). La variación craneométrica está geográficamente estructurada, lo que permite un cierto nivel de precisión de clasificación al comparar cráneos de diferentes partes del mundo (Relethford, 2009).

Relethford, (2008), reflexionando sobre los patrones geoespaciales en el estudio del hombre, apunta que:

“El interés por la variación espacial subyace a mucha investigación en antropología biológica. La variación espacial es un factor importante a considerar cuando se examina la historia de la población, así como la selección natural y/o la adaptación. Muchas variables que estudiamos están correlacionados espacialmente por una razón u otra, de manera que las poblaciones geográficamente próximas tienden a ser biológicamente similares. Esta correlación espacial puede ser debido al flujo genético entre las poblaciones locales, dada la tendencia de limitar la migración en función de la distancia geográfica. La correlación espacial también puede reflejar la ascendencia común, como cabría esperar de un grupo de poblaciones que comparten un conjunto común de fundadores durante la dispersión en una nueva área. Dependiendo de la característica genética, la correlación espacial también podría ser el resultado de la actuación de la selección natural en entornos geográficamente cercanos y físicamente similares, tales como la correlación entre el color de la piel y la latitud”

La idea detrás de todos los estudios de la diversidad geográfica es la posible inferencia de probables procesos evolutivos subyacentes (Barbujani, 2000), o viceversa. Numerosos estudios han demostrado la neutralidad genética de la variación craneométrica. Sin embargo el grado en que el clima juega un papel en la conformación de la forma craneal aún se discute (Relethford, 2004; Harvati y Weaver, 2006; Betti et al., 2010; Stone et al., 2015).

Un punto central de este capítulo es la premisa de que la diversidad genética se ve

limitada por factores que operan en el espacio geográfico (Barbujani, 2000). Los espacios fenotípicos, por ende, deberían limitarse en forma proporcional. Por este motivo, se reconoce que es de suma importancia tener en cuenta la trascendencia de las dimensiones ambientales detrás de la variación morfológica en los estudios evolutivos de la diversificación fenotípica entre poblaciones (Roseman, 2004; Carroll et al., 2007; Perez y Monteiro, 2009). De esta manera, el análisis de éstos espacios o dimensiones fenotípicas debe verter evidencia de un nivel de variación que raramente es evaluado en conjunto con la genética, el estatus socioeconómico y el fenotipo, en éste caso la AF.

En éste contexto, los sistemas de información geográfica (SIG) son herramientas computarizadas que permiten la captura, el modelado, la manipulación, recuperación, análisis y presentación de datos geográficamente referenciados (Worboys y Duckham, 2004), ampliamente utilizados en numerosas áreas, desde la zoología hasta la planeación urbana. Algunos de los trabajos clásicos en la aplicación del análisis geográfico en el estudio de la genética de poblaciones humanas pueden ser Haldane (1940), Malécot (1959) y Morton (1975). De igual manera, algunos otros investigadores (Cavalli-Sforza et al., 1994; North et al., 1999) usaron el análisis de conglomerados y escalamiento multidimensional como métodos para la inferencia de los patrones geográficos. Otros autores emplearon el modelo de aislamiento por distancia (Relethford, 2004) o la correlación espacial (Sokal et al., 1989; Sokal y Oden, 2008), y otros más combinan algunos de los métodos anteriores (Sokal y Livshits, 1993). Finalmente, los hay empleando métodos SIG propiamente dichos (Xue et al., 2005, 2008; Relethford, 2008; Bernal et al., 2010). La mayoría de éstos trabajos aplican los métodos para análisis de datos fenotípicos (e.g. altura, peso, medidas lineales, etc.) o genotípicos (e.g. haplotipos, cromosoma Y, etc.), y algunos de ellos también incluyen concretamente datos craneométricos (e.g. North et al., 1999; Relethford, 2008). Sin embargo no existe propuesta alguna que explore la variación facial humana respecto de la geografía y menos aún en el contexto de un modelo de la variación del espacio asimétrico de forma.

Se sabe que la variación ambiental puede afectar profundamente la variación fenotípica dentro y entre las poblaciones (Badyaev, 2005) así como los patrones de integración morfológica y asimetría (Badyaev et al., 2000; Badyaev y Foresman, 2004). Por ejemplo, se ha encontrado un incremento de la AF en musarañas nacidas en ambientes estresantes, donde los machos se observaron como más sensibles a las condiciones estresantes, que las hembras (Badyaev et al., 2000). El frío potencialmente puede producir cambios morfológicos en el tamaño del rostro, en el volumen de los senos maxilares y la cavidad nasal (Rae et al., 2006). Otra evidencia de cómo la variación ambiental modifica el fenotipo son los trabajos experimentales de estrés por deficiencia en la ingesta nutrimental (Pucciarelli, 1980, 1981; Pucciarelli et al., 1990; Ramírez Rozzi et al., 2005). Un ejemplo sería la masticación diferencial o la succión digital, que son formas de tensión biomecánica y postural, siendo su caso más extremo la plagiocefalia producida en los recién nacidos por la posición que (Limon et al., 1988) adoptan al dormir (Limon et al., 1988). Wells et al., (2006) encontró que los niños obesos de 6 meses, mostraron mayor cantidad de AF respecto de un grupo sin obesidad. También, como ya se ha podido explorar en el Capítulo VII, algunos autores relacionan la AF con bajos niveles socioeconómicos (Özener, 2010a, 2011; Bigoni et al., 2013; Weisensee, 2013). Otro estudio realizado en cráneos de macacos midió la varianza fenotípica inter-individual, dividiéndola en su componente genético y ambiental, y la varianza

intra-individual se midió como la asimetría fluctuante entre los *landmarks* bilaterales (Willmore et al., 2005). Se determinó una correlación lineal positiva ($p < 0.01$) entre las varianzas fenotípicas, ambientales y de AF para las distancias entre *landmarks*. Lo anterior, concluyen los autores, muestra que mayores niveles de asimetría implican valores de varianza ambiental elevados. De igual manera se han encontrado evidencias en otras especies: *Aphis gossipyii* (Babbitt, 2008), *Dama dama* (Serrano et al., 2008), *Phodopus sungorus* (Benderlioglu et al., 2007), etc. Finalmente, empleando herramientas de SIG e información de la composición de su hábitat se encontró asociación entre los ambientes más impactados y comadrejas (*Didelphis albiventris*) con niveles estadísticamente altos de AF (Teixeira et al., 2006). Empero, también hay reportes que no muestran diferencias entre los caracteres medidos y los estresores (cantidad de alimento y grado de hacinamiento) con la AF medidas en aves domésticas (Kellner y Alford, 2003).

Por este motivo es que varios autores también asumen que la AF es un indicador universal de inestabilidad en el desarrollo (ID) o estrés medible en caracteres fenotípicos bilaterales humanos (Özener y Fink, 2010; Özener, 2010abc; Weisensee, 2013; Milne et al., 2003; DeLeon y Richtsmeier, 2010; Palmer y Strobeck, 1986; Møller y Swaddle, 1997; Little et al., 2008), ya que las asimetrías y el ruido en el desarrollo está fuertemente determinadas linealmente y son una evidencia tangible de la sumatoria de estrés acumulada en el rostro (Moller 1990, 1992, Moller et al 1995, Moller y Thornhill 1997, 1998, Parsons 1992, Perret et al 1994); por tanto, como ya se ha destacado, la simetría facial en humanos se reconoce como contenedora de información cuantificable sobre la calidad fenotípica y genética del individuo (Swaddle y Cuthill, 1995; Rhodes, et al. 1998; Rhodes, et al. 1999; Zaidel y Cohen, 2005; Zaidel y Deblieck, 2007; Scheib, et al. 1999), donde las desviaciones del patrón esperado son caracterizadas como perturbaciones. Si la hipótesis anterior es verdadera (ver datos controversiales en McKenzie y Clarke, 1988; Graham et al., 1993; Bjorksten et al., 2000; Lens et al., 2002), se espera que exista una correlación entre los datos de ambientales analizados y la AF, como algunos análisis prueban con el estatus socioeconómico (Ozener, 2010; Özener, 2010a, Özener, 2011, Bigoni et al., 2013 Gawlikowska et al 2007, Deleon 2007, Lotto y González 2014 y las evidencias en contra presentadas en el Capítulo VII) o la exposición a estresores durante el desarrollo (Klingenberg et al., 2010) además de la evidencia en animales no humanos (Parsons, 1990, 1992; Vøllestad y Hindar, 1997; Floate y Fox, 2000).

El proceso de urbanización tiene claras consecuencias para la salud humana en toda la población (Mcdade y Adair, 2001). Empero, se generaliza que en un ambiente urbano el acceso a salud, alimento, trabajo y calidad de vida, están de la mano. Sin embargo, la realidad no siempre es así, como se evidencia en el concepto de “desarrollo desigual y asimétrico” (Trotsky, 1932). Todo éste proceso se ha totalizado de modo que la complejidad de la sociedad urbana implica que las ciudades, como modo predominante de la vida, tengan también un aumento de las desigualdades a través de una amplia gama de dimensiones sociales y de salud (Vlahov et al., 2007), tal vez mucho más “estresantes” que la pobreza o desigualdad en medios rurales. Por ello la comparación entre diferentes ambientes perturbados por el humano es de interés para éste capítulo de la tesis, y busca explorar la dimensión geoespacial y ambiental en su posible relación con patrones de AF.

En éste capítulo, se intenta caracterizar y contrastar si el patrón de la AF tiene una

correspondencia geoespacial mediante dos objetivos e hipótesis. El primer punto es contrastar si la AF presenta una pertinencia en el espacio geográfico, es decir si los datos presentan una autocorrelación espacial. Se considera como hipótesis nula que los datos de AF tendrán una completa aleatoriedad espacial (CAS), evaluado por medio del índice I de Moran por cada país incluido en la muestra. Secundariamente, se contrasta si la AF tiene alguna relación con el tipo de ecosistema modificado (antropobioma) donde cada voluntario nació, bajo la idea de que ambientes más estresantes podrían tener un efecto negativo en el desarrollo de cada individuo. La hipótesis es que las medias entre los valores de AF entre los diferentes ambientes sean iguales, es decir que la perturbación del ambiente no tenga ningún efecto sobre los valores de tendencia media de la AF entre ambientes perturbados.

Sujetos y método

Para éste capítulo el criterio de inclusión/exclusión fue la presencia del lugar de nacimiento con municipio conocido y el valor de AF. De esta manera se utilizaron 4107 individuos voluntarios del proyecto CANDELA (Tabla 9.1). Es importante señalar que los grupos analizados no tienen un número muestral equilibrado.

Tabla 9.1 Detalles de la muestra concernientes a los biomas, el sexo y los países para un total de 4107 voluntarios (la descripción de cada antropobioma se presenta más adelante).

Sexo	Bioma	Chile	Colombia	Brasil	México	Perú	Totales
f	Población densa	389	394	262	408	3	1456
	Pueblo	32	81	77	23	92	305
	Campo de cultivo	8	69	175	22	14	288
	Pastizal	18	25	8	0	6	57
	Bosque	0	3	0	2	3	8
m	Población densa	723	282	140	254	2	1401
	Pueblo	134	63	28	10	53	288
	Campo de cultivo	89	54	86	11	14	254
	Pastizal	15	18	5	1	5	44
	Bosque	2	0	0	2	2	6
Totales		1410	989	781	733	194	4107

Análisis de distribución espacial de la AF

Para conocer si los valores observados de AF tendían a la autocorrelación espacial se calculó el índice I de Moran (Moran, 1950), que evalúa, por medio de la correlación, si un conjunto de datos presenta una señal espacial respecto de otras regiones en el espacio. En dicho análisis se evalúa si los datos se encuentran geográficamente agrupados, dispersos o al azar. De esta manera, se calcula el valor del índice I de Moran, un score Z y p-valor para evaluar la importancia de ese índice. En general, si el valor del índice I de Moran es cercano a 1 indica agrupación; en contraste, un valor de -1 indica total dispersión. Un valor de cero indica un patrón espacial aleatorio. Para las pruebas de hipótesis estadísticas, los valores del índice I de Moran, pueden ser transformados a un score Z en el que los valores superiores a 1.96 o menor que -1.96 indican autocorrelación espacial significativa al nivel de confianza del 5% (Figura 9.1). Adicionalmente, la estructura de autocorrelación puede ser modelada mediante el ajuste de un

modelo de variograma/correlograma teórico, por lo que fueron calculados diversos variogramas para cada país. Todos los análisis se realizaron empleando R (R Development Core Team, 2008).

En paralelo se generaron interpolaciones por país en lo referente a los valores de AF. Se trabajó sobre mapas obtenidos de un repositorio digital abierto DIVA-GIS (www.diva-gis.org), donde se descargaron las formas (*shapes*) de cada país analizado, que consisten en capas (*layers*) con información en metadatos utilizada como fuente de análisis geoespacial. Como referencia técnica del protocolo GIS empleado, todos los mapas se georeferenciaron utilizando un sistema de coordenadas mundial WGS84¹ y una proyección de las coordenadas geodésicas UTM², ya que el modelo de cálculo del índice I de Moran implica la estimación de una matriz de distancias geográficas.

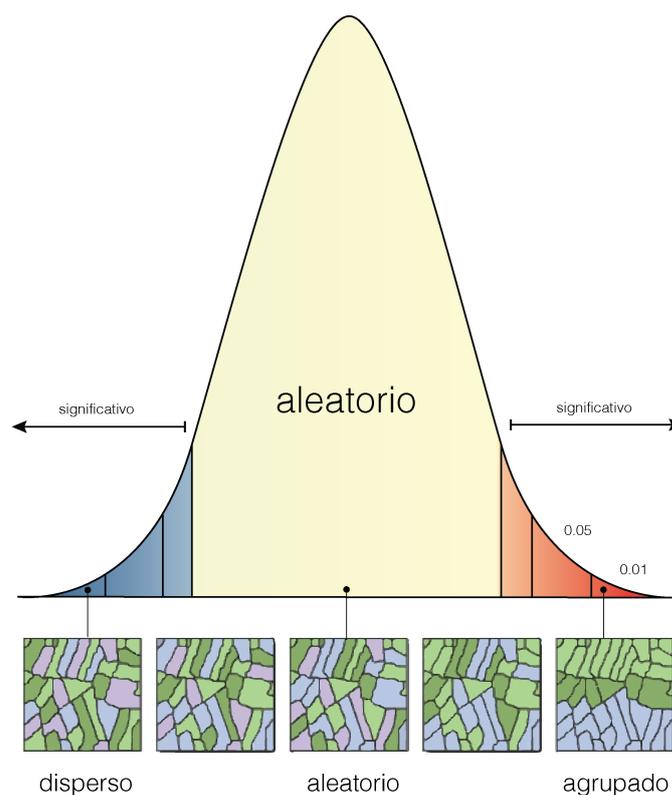


Figura 9.1. Representación gráfica de los posibles escenarios de autocorrelación espacial en un conjunto de datos geográficamente referenciados: dispersos, aleatorios y agrupados. La distribución representa la equivalencia entre los valores del índice I de Moran y los scores Z.

En el programa QGIS 2.8.2-Wien (QGIS Development Team, 2009), se eligió la interpolación de ponderación inversa a la distancia (IDW), estableciendo un tamaño de celda de de 600 en ambos ejes con un coeficiente P de distancia: $P=4$. El resultado generó una capa *raster* que se representó para tener un gradiente de color con 10 intervalos para su mejor visualización.

¹ Del inglés, World Geodetic System, es un estándar en geodesia, cartografía y navegación. Concretamente, es un sistema de coordenadas geográficas mundial que permite la localización de cualquier punto de la tierra.

² Del inglés Universal Transverse Mercator, es un sistema de coordenadas basado en una proyección cartográfica transversa de Mercator.

Relación de la AF con la perturbación del ambiente

Para éste análisis se utilizó la capa *raster* de biomas antropogénicos (BA; *Anthropogenic biomes or anthromes*) desarrollada por Elis y Ramankutty, (2008). Los BA describen patrones ecológicos a nivel mundial, significativos dentro de la biosfera terrestre, causados por la interacción humana directa sostenida con los ecosistemas, incluyendo la agricultura, la urbanización, la silvicultura y otros usos de la tierra. Los biomas convencionales o tradicionales, tales como los bosques tropicales o pastizales, se basan en los patrones de vegetación mundiales relacionados con el clima. En cambio, los BA retoman la perspectiva de cómo los seres humanos han alterado fundamentalmente los patrones globales del ecosistema, su proceso y la biodiversidad. Luego entonces, los BA proveen una visión contemporánea de la biosfera terrestre respecto de su alteración por el humano. Los BA (Figura 9.2) se clasifican como: poblaciones densas (pd; *dense settlements*), pueblos (pu; *villages*), campos de cultivo (cc; *croplands*), pastizales (pa; *rangelands*), bosques (bo; *forested*) y tierras sin alteración (tsa; *wildlands*). Si bien, las anteriores son macrocategorías (ver Anexo 8 para una descripción de las subcategorías), para los fines de este estudio es suficiente (para más detalles de la construcción del *raster* consultar a Elis y Ramankutty, 2008). Mediante el uso de la Plataforma QGIS 2.8.2-Wien (QGIS Development Team, 2009) se obtuvo el BA al que cada voluntario pertenecía y con esta variable nominal se calculó un ANOVA de una vía para explorar las diferencias respecto de la AF.

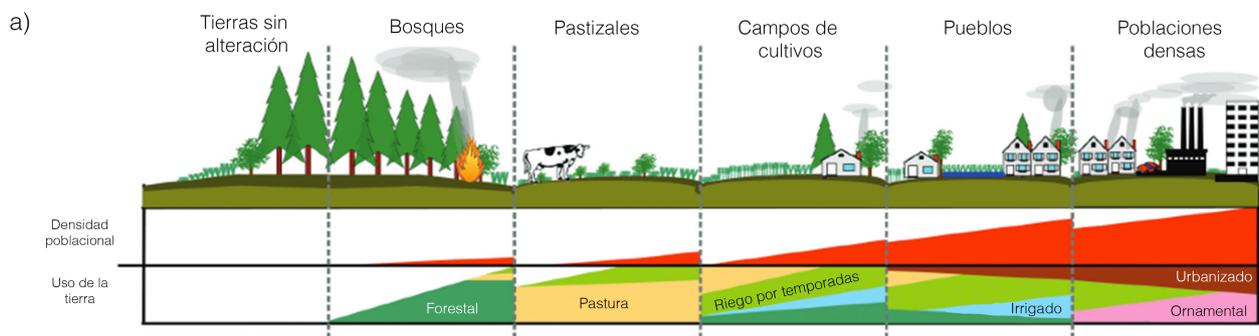


Figura 9.2 Antropobiomas utilizados en el estudio, según definiciones en Elis y Ramankutty, (2008), imagen modificada de los mismos autores.

Resultados

Los datos de I de Moran globales entre países son negativos aunque tendientes a 0 y en el caso de cuatro países resultaron significativos ($p < 0.001$). La Tabla 9.2 muestra los valores del I de Moran globales. Dichos resultados indican que los datos de asimetría presentan un patrón aleatorio. Asimismo, los mapas de interpolación generados muestran que en la distribución observada en el I de Moran (Figura 9.3), no existe un patrón definido en los datos. Dicho de otro modo, cualquier región geográfica es plausible de presentar algún grado de AF por lo que los datos no están estructurados geográficamente. Para mayor detalle, se pueden ver los correlogramas generados (Figura 9.4) donde se observa el mismo patrón del índice I de Moran en función de la distancia geográfica por país.

Tabla 9.2. Valores del índice I de Moran para cada país se presentan valores observados, esperados, DE y p .

	Observado	Esperado	DE	p
Brasil	-0.007	-0.001	0.001	5.0E-06
Chile	-0.066	-0.001	0.001	<0.0001
Colombia	-0.001	-0.001	0.001	0.921
México	-0.014	-0.001	0.002	1.33E-09
Perú	-0.027	-0.005	0.006	4.55E-04

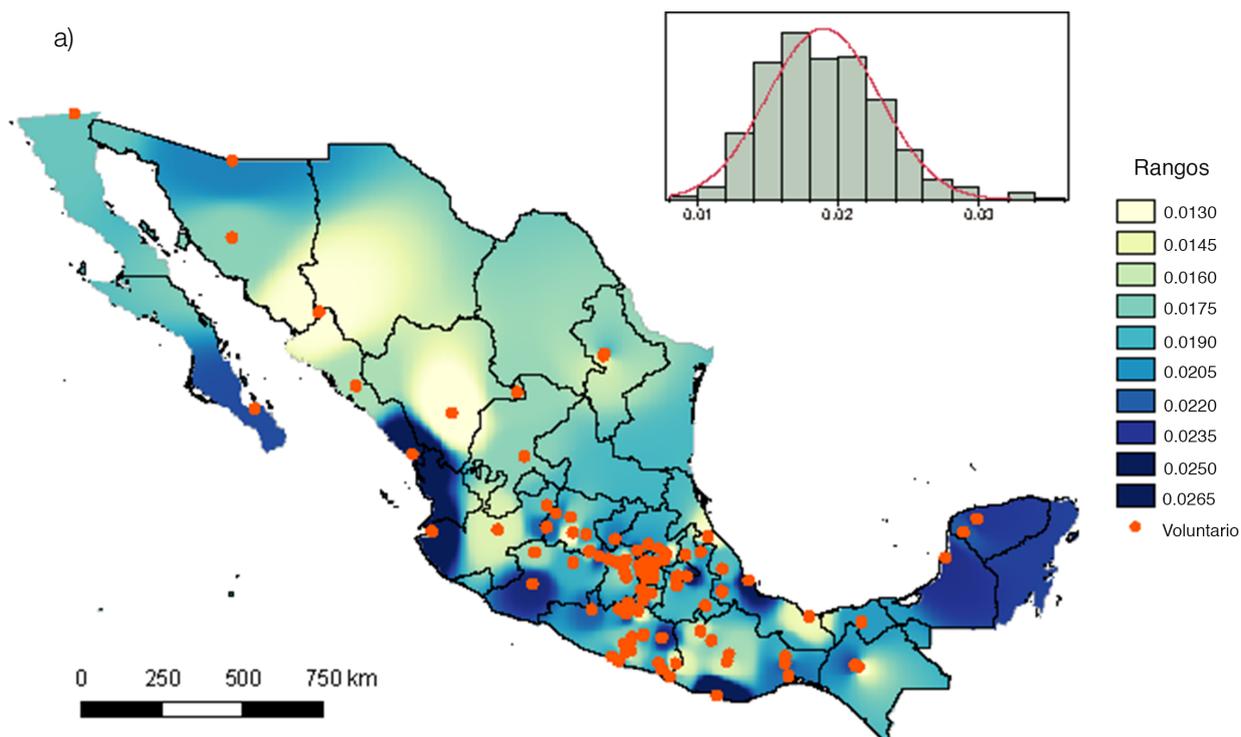


Figura 6.3 Visualización de la interpolación IDW sobre los datos de AF para México (a) Colombia (b), Perú (c), Chile (d) y Brasil (e). Rangos o clases con menor cantidad de AF se muestra en colores claros respecto de aquellos con mayores valores en azul oscuro. En la parte superior derecha de la imagen se encuentra un histograma de frecuencias de la variable testeada. Cada punto indica un individuo de la muestra CANDELA.

b)

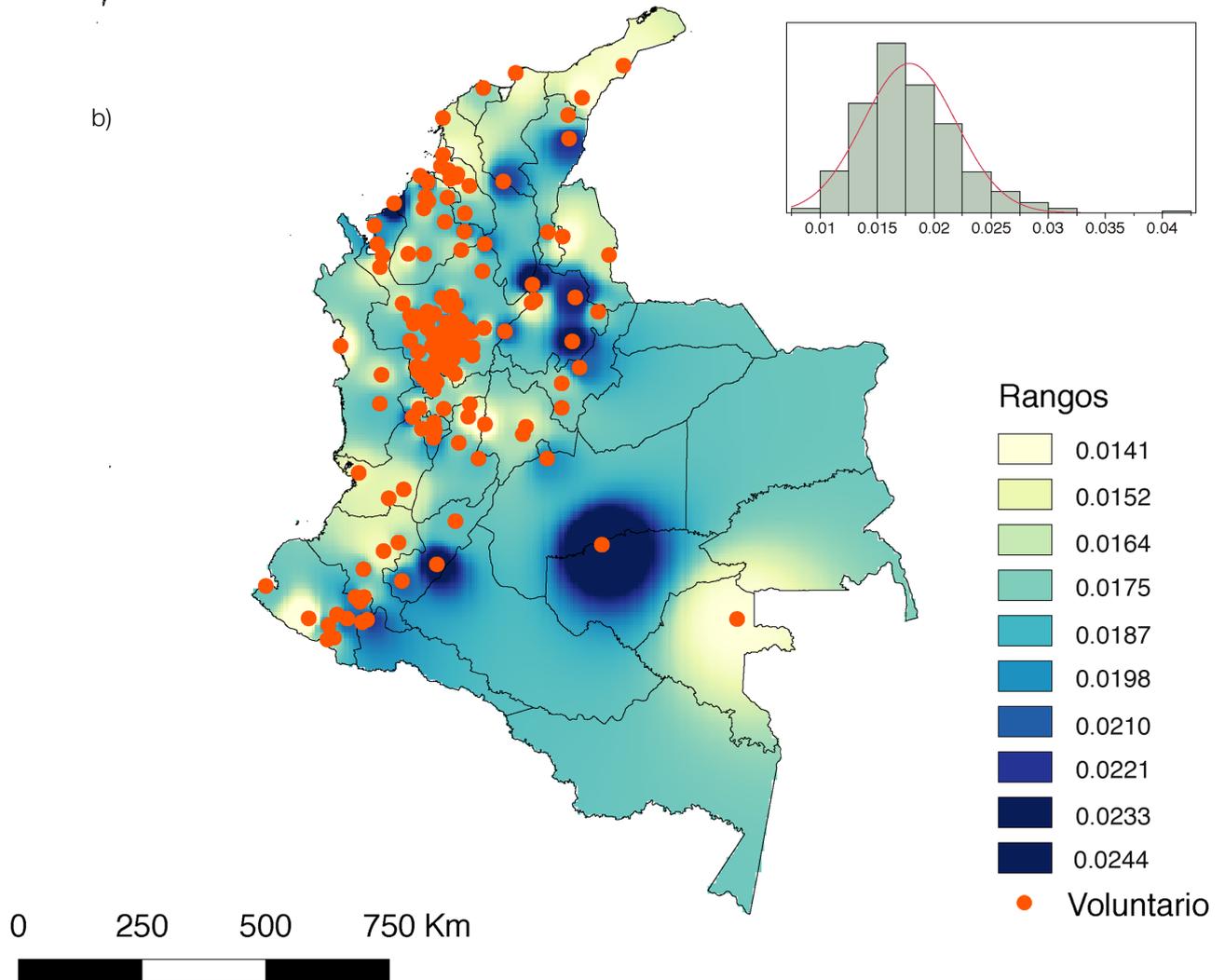
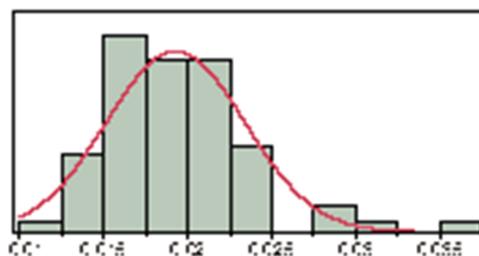
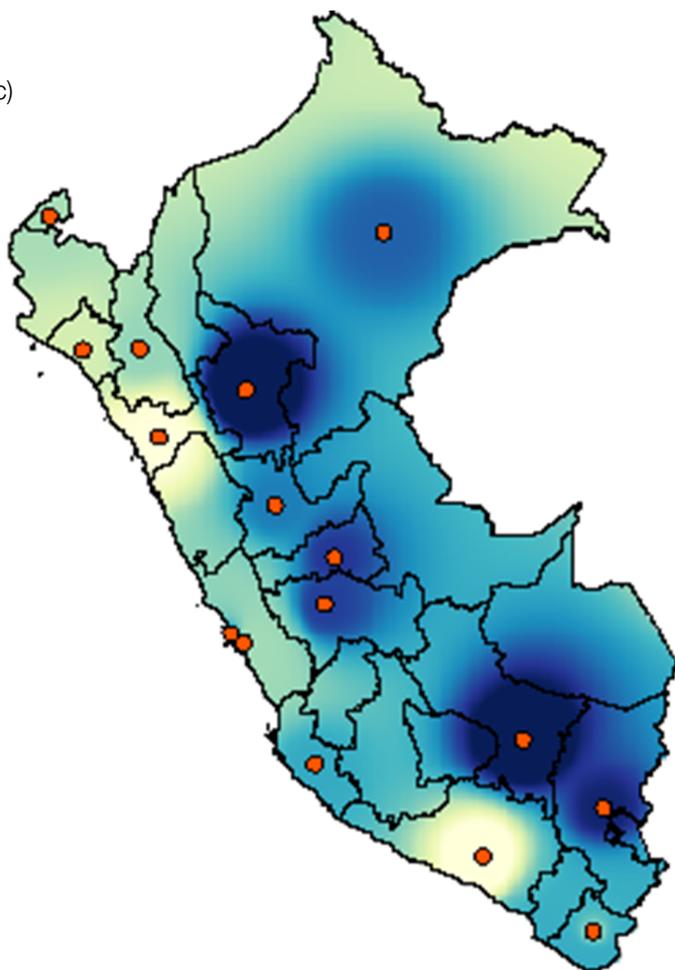


Figura 6.3. Continuación... Colombia (b).

c)



Rangos

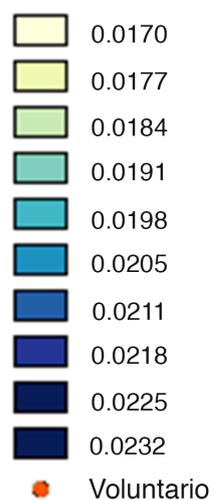


Figura 6.3. Continuación... Perú (c)..

d)

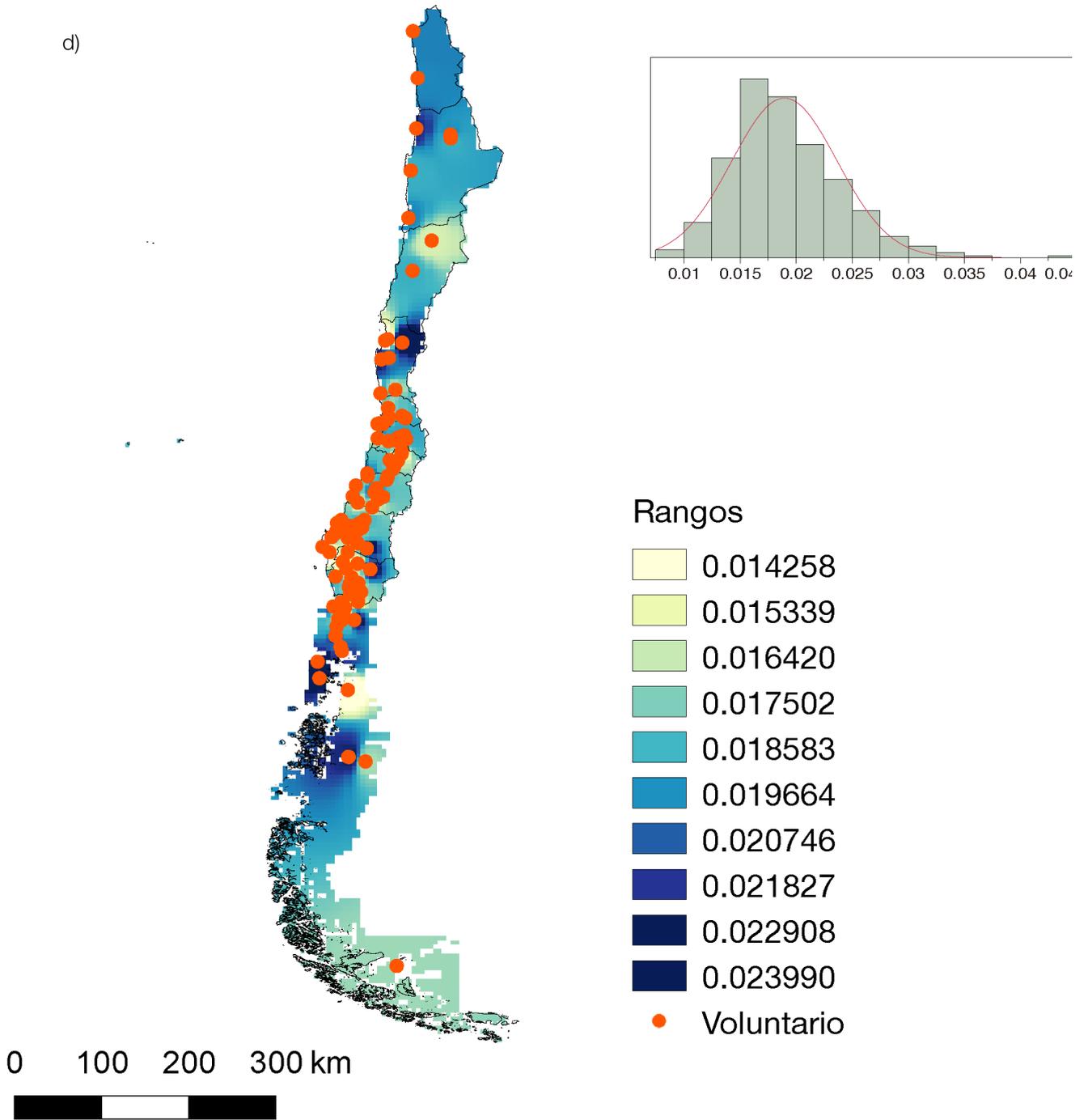


Figura 6.3. Continuación... Chile (d).

e)

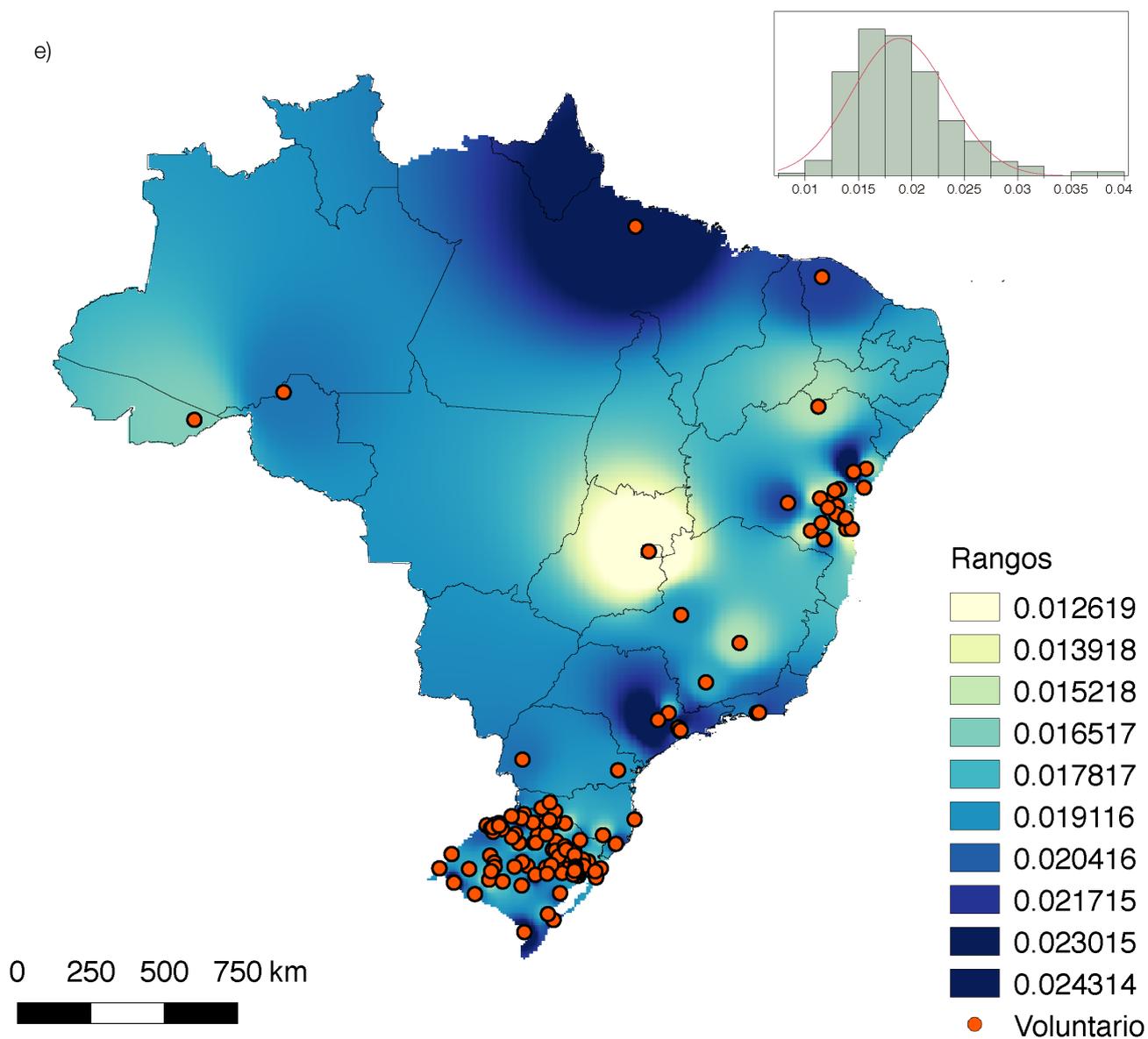


Figura 6.3. Continuación... Brasil (e).

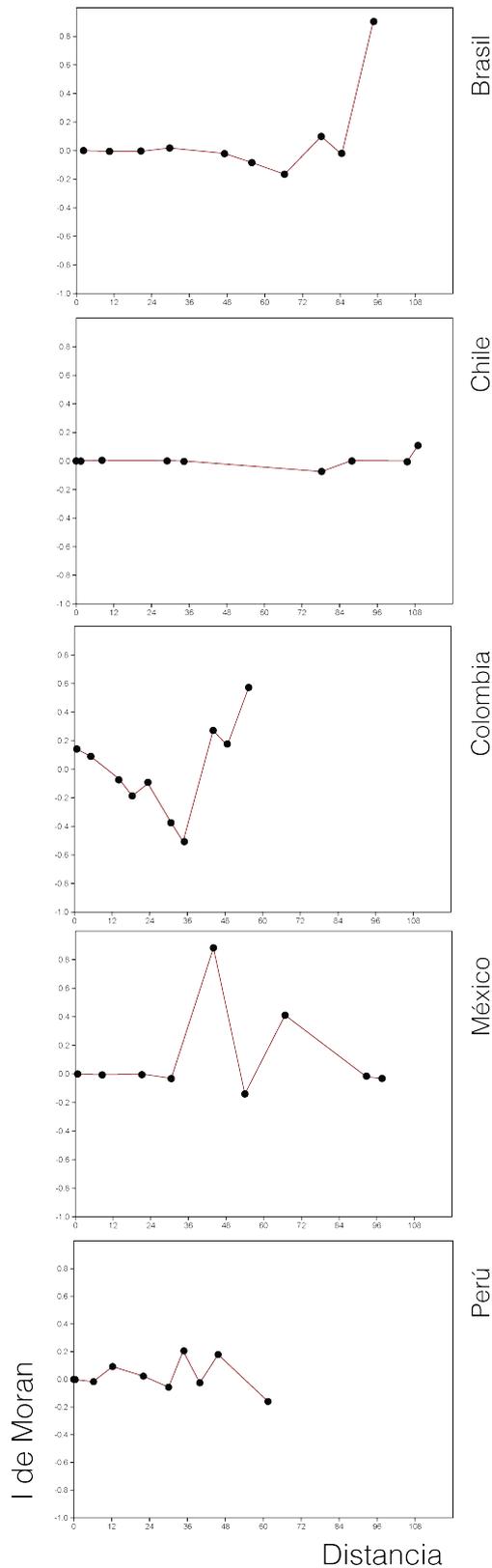


Figura 6.4 Correlogramas de los valores de I de Moran en función de la distancia geográfica. Las líneas rojas únicamente interconectan los valores de los datos. Se presentan los datos por país.

Por otro lado, los resultados del ANOVA de una vía, encuentran diferencias entre algunos de los datos de AF entre antropobiomas (Tabla 9.3). Los resultados muestran valores bajos de significación con cinco valores en la serie masculina y tres para la femenina. Concretamente: los hombres y mujeres, en Brasil se diferencian entre los campos de cultivo (cc) *versus* pueblos (pu)

y cc *versus* poblaciones densas (pd). En Chile, sólo en el caso de los hombres, se presentan diferencias entre pastizales (pa) y cc *versus* pueblos (pu), además de entre campos de cultivo (cc) *versus* poblaciones densas (pd). Finalmente, solo para el caso de las mujeres de Perú, existen diferencias entre bosques (bo) *versus* pueblos (pu). El grupo de campos de cultivo (cc) de Brasil, en ambos sexos presenta mayor cantidad de AF. En Chile se presenta el patrón contrario mostrando a los pueblos (pu) y población densamente (pd) poblada como los de mayor cantidad de AF. En este punto llama la atención que los pastizales (pa) presentan más AF que todos los grupos. Perú, solo para el grupo de mujeres, presenta un patrón en el que los bosques encabezan la mayor AF, manteniéndose el mismo patrón cuando el valor *p* fue corregido por el método de Bonferroni.

Tabla 6.3 Resultados del ANOVA de una vía para cada combinación de antropobioma, país y sexo. Las casillas en verde indican valores significativos y la intensidad de color el nivel α .

País	Masculinos					Femeninos				
	Iteración		Diferencia	ES diferencia	Valor p	Iteración		Diferencia	ES diferencia	Valor p
Brasil	Pastizal	Pueblo	0.847	0.563	0.436	Campo de cultivo	Población densa	0.479	0.108	<.0001
	Campo de cultivo	Pueblo	0.624	0.231	0.037	Campo de cultivo	Pueblo	0.404	0.151	0.038
	Pastizal	Población densa	0.611	0.534	0.663	Pastizal	Población densa	0.350	0.394	0.811
	Campo de cultivo	Población densa	0.388	0.148	0.045	Pastizal	Pueblo	0.275	0.408	0.907
	Población densa	Pueblo	0.236	0.218	0.701	Campo de cultivo	Pastizal	0.129	0.397	0.988
	Pastizal	Campo de cultivo	0.223	0.539	0.976	Pueblo	Población densa	0.075	0.143	0.954
Chile	Pastizal	Bosque	1.349	0.867	0.526	Pastizal	Población densa	0.402	1.213	0.578
	Pastizal	Campo de cultivo	1.033	0.321	0.012	Campo de cultivo	Población densa	0.383	1.484	0.807
	Pastizal	Pueblo	0.866	0.313	0.046	Pastizal	Pueblo	0.380	1.350	0.743
	Población densa	Bosque	0.775	0.815	0.877	Campo de cultivo	Pueblo	0.361	1.584	0.872
	Pastizal	Población densa	0.575	0.300	0.311	Pueblo	Población densa	0.022	0.597	1.000
	Pueblo	Bosque	0.484	0.820	0.977	Pastizal	Campo de cultivo	0.019	1.369	1.000
	Población densa	Campo de cultivo	0.459	0.129	0.004					
	Campo de cultivo	Bosque	0.316	0.823	0.995					
	Población densa	Pueblo	0.291	0.108	0.057					
	Pueblo	Campo de cultivo	0.168	0.157	0.824					
Colombia	Campo de cultivo	Pastizal	0.258	0.265	0.764	Campo de cultivo	Pastizal	0.335	0.922	0.524
	Pueblo	Pastizal	0.194	0.260	0.878	Campo de cultivo	Bosque	0.208	1.687	0.995
	Campo de cultivo	Población densa	0.164	0.145	0.670	Población densa	Pastizal	0.204	0.721	0.816
	Pueblo	Población densa	0.100	0.136	0.883	Pueblo	Pastizal	0.200	0.773	0.875
	Población densa	Pastizal	0.095	0.237	0.978	Campo de cultivo	Pueblo	0.135	0.549	0.900
	Campo de cultivo	Pueblo	0.064	0.181	0.985	Campo de cultivo	Población densa	0.130	0.462	0.818
						Bosque	Pastizal	0.126	1.658	0.999
						Población densa	Bosque	0.078	1.530	1.000
						Pueblo	Bosque	0.074	1.547	1.000
						Población densa	Pueblo	0.004	0.310	1.000
México	Pastizal	Bosque	2.197	1.181	0.341	Bosque	Pueblo	0.622	2.359	0.792
	Campo de cultivo	Bosque	1.298	0.741	0.405	Bosque	Población densa	0.622	2.292	0.772
	Población densa	Bosque	1.267	0.684	0.347	Bosque	Campo de cultivo	0.456	2.196	0.906
	Pueblo	Bosque	1.221	0.747	0.476	Campo de cultivo	Pueblo	0.166	0.869	0.929
	Pastizal	Pueblo	0.976	1.011	0.870	Campo de cultivo	Población densa	0.166	0.682	0.841
	Pastizal	Población densa	0.930	0.966	0.872	Población densa	Pueblo	0.000	0.505	1.000
	Pastizal	Campo de cultivo	0.900	1.007	0.899					
	Campo de cultivo	Pueblo	0.077	0.421	1.000					
	Población densa	Pueblo	0.046	0.311	1.000					
	Campo de cultivo	Población densa	0.031	0.297	1.000					
Perú	Bosque	Pueblo	0.945	0.722	0.687	Bosque	Pueblo	1.536	2.871	0.016
	Bosque	Campo de cultivo	0.770	0.761	0.849	Bosque	Pastizal	1.524	3.132	0.072
	Pastizal	Pueblo	0.551	0.469	0.766	Bosque	Población densa	1.335	3.192	0.276
	Bosque	Población densa	0.476	1.002	0.989	Bosque	Campo de cultivo	1.094	2.541	0.229
	Población densa	Pueblo	0.469	0.722	0.966	Campo de cultivo	Pueblo	0.442	1.095	0.337
	Bosque	Pastizal	0.394	0.838	0.990	Campo de cultivo	Pastizal	0.429	1.539	0.820
	Pastizal	Campo de cultivo	0.375	0.527	0.953	Campo de cultivo	Población densa	0.241	1.688	0.991
	Población densa	Campo de cultivo	0.294	0.761	0.995	Población densa	Pueblo	0.201	1.536	0.994
	Campo de cultivo	Pueblo	0.175	0.311	0.980	Población densa	Pastizal	0.188	1.797	0.998
	Pastizal	Población densa	0.081	0.838	1.000	Pastizal	Pueblo	0.012	0.971	1.000

Discusión

En este capítulo de la tesis se intentó corroborar si la AF exhibía un patrón geoespacial, y si éste se relacionaba con el antropobioma de cada voluntario, asumiendo la AF como indicador de la sumatoria de eventos de perturbación durante el desarrollo del individuo. La hipótesis nula de que los datos de AF tendrían una completa aleatoriedad espacial (CAS) no se pudo rechazar para cinco de los países. Además, la hipótesis nula de que las medias entre los valores de AF entre los diferentes ambientes son iguales fue rechazada para algunos de los casos explorados. A continuación se discuten los principales resultados.

Sobre el patrón geoespacial de la AF

Dado a que muchos estudios asumen que la AF es un indicador universal de la inestabilidad en el desarrollo (ID) de los individuos, se buscó de verificar si había un posible patrón geoespacial. La idea detrás de esta hipótesis es que los individuos expuestos a similares condiciones ambientales que comparten un espacio geográfico contiguo deberán mostrar una magnitud de AF similares. Por ello, como la magnitud de la asimetría entre individuos que comparten un espacio geográfico se considera teóricamente similar, era de esperarse entonces una asociación espacial de los datos y que ésta pudiera manifestarse como un patrón geoespacial definido. Además, debido a que hay una correspondencia entre los niveles de variación fenotípica craneofacial y la distancia geográfica (Relethford, 2009), se esperaba que el espacio asimétrico de forma tuviera también una correspondencia. Sin embargo, los resultados muestran que para los datos analizados no existen una estructura geográfica determinada (Tabla 9.2, Figuras 9.3 y 9.4), observándose un patrón de CAS; es decir que la AF no presenta una estructura geoespacial, como sí sucede para la diversidad genética (Barbujani, 2000) o para el fenotipo craneofacial (Relethford, 2009). En éste contexto, los sistemas de información geográfica (SIG) permitieron la caracterización de la AF en el geoespacio y por ende su visualización. Si bien los patrones observados no siguen un agrupamiento o distribución particular respecto de la geografía, la visualización de los datos es vital para comprender las características que podrían detonar ciertos procesos de respuesta en espacio fenotípico. De manera adicional, los correlogramas (Figura 9.4) son de suma ayuda en la comprensión de la ausencia de cualquier patrón de estructuración geográfica (agrupación o dispersión), ya que ninguna de las gráficas presenta algún tipo de clina o tendencia clara en función de la distancia.

La interpretación de dichos patrones geográficos y fenotípicos (en este caso la AF) parecen no indicar un patrón ecogeográficos, ya que no se describen paralelismos en la morfología y la distancia geográfica (Mayr, 1956). Sabiendo que la variación fenotípica dentro y entre las poblaciones se estructurada en concordancia con la variación ambiental (Badyaev, 2005), o incluso otras fuentes de variación fenotípica analizados en esta tesis, como la integración morfológica y asimetría (Badyaev et al., 2000; Badyaev y Foresman, 2004), los patrones geoespaciales observados en los resultados no secundan que la magnitud de asimetría sigue esta línea de evidencia.

Una posible explicación a los patrones geoespaciales encontrados es el modelo no lineal de la AF (Klingenberg y Nijhout, 1999). La respuesta al estrés ambiental es asimilado de manera diferencial entre individuos que habitan ambientes similares o que, incluso, los comparten. Los datos indican que a pesar de que se tienen valores de asimetría altos para algunas regiones consideradas más estresantes, estas no son lo suficientemente estructuradas como para mostrar un patrón estadístico concreto. Y viceversa en estas mismas regiones aparecen valores bajos de asimetría. Otra posible respuesta es que la AF sea un carácter neutro espacialmente, como otros caracteres craneométricos (Relethford, 2004; Harvati y Weaver, 2006; Betti et al., 2010; Stone et al., 2015). Igualmente, pudiera ser que la complejidad de los datos oscurezca su determinación estadística. En este sentido, futuros trabajos incluyendo más variables ambientales como temperatura, biomas naturales, clima, altitud, etc., pueden detectar más fuentes de variación que las señaladas aquí.

Sobre la relación de la modificación del ambiente y la AF

Ampliando el debate, es sabido que las dimensiones ambientales pueden ser factores detrás de la variación morfológica en los estudios de corte evolutivo entre poblaciones (Roseman, 2004; Carroll et al., 2007; Perez y Monteiro, 2009). Por éste motivo es que se perfiló un análisis detallado de la variación respecto de la modificación del ambiente, por medio del uso de herramientas GIS y de algunos trabajos previos definiendo ambientes alterados por el humano: los antropobiotomas. Existen numerosas evidencias a favor de que ambientes estresantes intervienen en el aumento de la AF. Por ejemplo, la variación ambiental puede afectar profundamente la variación fenotípica dentro y entre las poblaciones (Badyaev, 2005) así como los patrones de integración morfológica y asimetría (Badyaev et al., 2000; Badyaev y Foresman, 2004), caso de la presente tesis. Un incremento de la AF en musarañas nacidas en ambientes estresantes mostró que los machos tenían más sensibilidad a las condiciones estresantes que las hembras (Badyaev et al., 2000). En humanos, el frío (Rae et al., 2006), el estrés nutricional (Pucciarelli, 1980, 1981; Pucciarelli et al., 1990; Ramírez Rozzi et al., 2005), la plagiocefalia postural, la masticación diferencial o la succión digital (Limon et al., 1988), la obesidad (Wells et al., 2006) y el estatus socioeconómico (Özener, 2010a, 2011; Bigoni et al., 2013; Weisensee, 2013), se muestran como potenciales estresores modificando la respuesta fenotípica del individuo.

En el caso de la asimetría, se determinó una correlación lineal positiva ($p < 0.01$) entre las varianzas fenotípicas, ambientales y de AF para las distancias entre *landmarks* (Willmore et al., 2005). Lo anterior, concluyen los autores, muestra que mayores niveles de asimetría implican niveles de varianza ambiental elevados. A esta evidencia se suman aquellas encontradas en especies: cómo *Aphis gossipyii* (Babbitt, 2008), *Dama dama* (Serrano et al., 2008), *Phodopus sungorus* (Benderlioglu et al., 2007), etc. Un ejemplo similar al aplicado aquí es el estudio realizado empleando herramientas de SIG e información de la composición del hábitat en que se encontró una asociación entre los ambientes más impactados y comadrejas (*Didelphis albiventris*) con niveles estadísticamente altos de AF (Teixeira et al., 2006). Por otro lado, son pocas las evidencias en contra de esta relación. Así por ejemplo, en aves domésticas, no se

muestran diferencias entre los caracteres medidos y los estresores (cantidad de alimento y grado de hacinamiento) con la AF (Kellner y Alford, 2003).

En la especie humana, tradicionalmente se ha aceptado que la AF es un indicador universal de ID. Sin embargo, los datos de éste capítulo se inclinan por la idea contraria. Si bien las asimetrías pueden ser la evidencia tangible de la sumatoria de estrés acumulada en el rostro (Møller, 1990; Parsons, 1992b; Møller et al., 1995; Møller y Swaddle, 1997; Møller y Thornhill, 1997; Perrett et al., 1998; Milne et al., 2003; DeLeon y Richtsmeier, 2010; Özener, 2010abc; Özener y Fink, 2010; Weisensee, 2013) su relación con la geografía y antropobiotomas es cuestionable, al menos en los datos estudiados aquí. Si la simetría facial en humanos se reconoce como contenedora de información cuantificable sobre la calidad fenotípica y genética del individuo (Swaddle y Cuthill, 1995; Rhodes, et al. 1998; Rhodes, et al. 1999; Zaidel y Cohen, 2005; Zaidel y Deblieck, 2007; Scheib, et al. 1999), donde las desviaciones del patrón esperado son caracterizadas como perturbaciones, entonces un resultado esperado es que existiera una correlación entre los rasgos de los ambientes analizados y la AF.

En éste contexto, los resultados del ANOVA de una vía para los diversos antropobiotomas (como elemento de evidencia de ambientes perturbados) resultó en algunos casos de significación estadística ($p=0.05$), manteniéndose para la corrección Bonferroni. Se puede resaltar que los campos de cultivo (cc) presentaron la mayor incidencia de diferencias entre grupos para hombres y mujeres aunque únicamente en tres países (Brasil, Chile y Perú). Los pueblos (pu) y la población densamente poblada (pd) también presentaron diferencias cuando fueron comparadas con los campos de cultivo (cc). Sin embargo puede concluirse que no existió un patrón claramente determinado, pues en cualquiera de los antropobiotomas existen cantidades de AF altas y bajas. En algunos países, por ejemplo, los campos de cultivo (cc) presentan altos niveles de AF (Brasil, ambos sexos). Aunque también se encontró el patrón inverso, es decir menores cantidades de AF (Chile) en estos antropobiotomas. Chile es el país que presenta mayor cantidad de AF en los pastizales (pa), pero el resto de países fluctúa en niveles medios y bajos. Inclusive los bosques (bo) presentaron altos niveles de AF para el grupo de mujeres de Perú.

Bajo este esquema general de resultados podemos decir que la regla de que aquellos individuos con mayor AF, presumiblemente tendrían una peor estabilidad en el desarrollo, parece no manifestarse en estas poblaciones. La supuesta relación directa entre las asimetrías y el ruido en el desarrollo (Møller, 1990, 1992; Møller et al., 1995; Møller y Thornhill 1997, 1998; Parsons, 1992; Perret et al., 1994) no parece verificarse en esta muestra donde los ambientes más perturbados no exhiben una asociación estadística con datos de AF mayores.

Es probable que los componentes específicos de la urbanización tales como cambios en la infraestructura, la población, la atención sanitaria, la educación, el saneamiento, el transporte, la riqueza, etc. tengan consecuencias positivas para la salud humana en toda la población (McDade y Adair, 2001). Sin embargo, la complejidad de la sociedad urbana implica que las ciudades, como modo predominante de la vida, tengan también un aumento de las desigualdades a través de una amplia gama de dimensiones sociales y de salud (Vlahov et al., 2007). Normalmente se piensa que en un ambiente urbano se tiene acceso directo a la salud, pero la realidad no es así, prueba de ello es la salud de las personas en los barrios pobres de grandes ciudades, fenómeno descrito como desarrollo combinado y desigual (Trotsky, 1932). En esos ambientes existen grandes concentraciones de tecnología y desarrollo pero también

pobreza extrema e inequidad social. El sistema capitalista, no implica la mejora de las condiciones de vida en ámbitos como la vivienda, el empleo, la educación, la igualdad, la calidad del entorno de vida, apoyo social y los servicios de salud, marcos fundamentales para mejorar la salud de las poblaciones urbanas (Vlahov et al., 2007). Si bien se ha encontrado aquí que los ambientes urbanos, densamente modificados, presentan valores altos AF también lo fueron aquellos mediamente alterados e incluso los no ligeramente perturbados (como los bosques).

Los factores determinantes de la salud se transforman dialécticamente a través de las características de las ciudades, pueblos o ecosistemas tales como el tamaño, la densidad, la diversidad y la complejidad (Vlahov et al., 2007). Los datos de una mala calidad de vida o estresantes también cambian de una manera compleja. Es así que si bien los datos no permiten generalizar, se puede describir que los patrones observados no asumen una estructura esperada (bajos valores para ambientes no perturbados) y presentan variaciones muy puntuales. Por otro lado, parece ser que los patrones observados son población-dependientes, esto quiere decir que dentro de cada país existen patrones únicos o particulares de diferenciación fenotípica asimétrica, que no pueden ser llevados a una generalización como en muchos trabajos se sostiene, elevando sus conclusiones a todo el orbe. El mejor ejemplo de ello son las fluctuaciones de mayor AF entre países y ambientes perturbados. Este patrón controversial, ha sido descrito también para la relación con el SES donde algunos datos encuentran mayor cantidad de asimetrías en individuos sujetos a mayor estrés (Ozener, 2010a; Özener y Fink, 2010) respecto de otros que encuentran el patrón contrario (Bigoni et al., 2013), situación que se repite en para los datos presentados en éste capítulo. Es así como nuestros datos evidencian que existe un abuso del uso de la asimetría como indicador de la inestabilidad en el desarrollo. Por el contrario, los datos aportados aquí están mas en la línea de lo expuesto por McKenzie y Clarke, (1988); Emlen et al., (1993); Bjorksten et al., (2000b); Lens et al., (2002), que plantean que la AF puede ser entendida por procesos simples de programa del desarrollo y crecimiento, más los efectos potenciadores locales, que al ser canalizados debaten en una apuesta dialéctica de lucha de contrarios por lograr una homeostasis en el hiperespacio de la norma de reacción. En conclusión, todo parece indicar que independiente del ambiente en donde se desarrolle el individuo, éste puede desarrollar valores de AF tanto altos y como bajos. La norma de reacción para ambientes modificados sería, de este modo, similar, al menos a través de los ambientes estudiados aquí.

En este sentido, mucho se ha especulado sobre el carácter selectivo y la relación lineal con el desarrollo de la AF (Leamy y Atchley, 1985). Teóricamente, la plasticidad fenotípica producirá respuestas adaptativas y no adaptativas al ambiente (Ghalambor et al., 2007). Además, la reducción de la estabilidad en el desarrollo es considerada como un síntoma de bajo nivel de *fitness* (Van Valen, 1962; Parsons, 1990; Møller y Swaddle, 1997), y también se ha correlacionado su aumento con el estrés ambiental o la homocigocidad (McKenzie y Clarke, 1988). Sin embargo, sólo algunos trabajos consistentes han relacionado la AF con selección, *fitness* o cambio evolutivo (Jones, 1987, contrariamente ver Lens et al., 2002).

Algunos experimentos con moscas (*Cyrtodiopsis dalmanni*) reportan una diferencia entre algunos caracteres en la interacción genotipo-ambiente, en un rango de medio con diferentes

niveles de estrés (Bjorksten et al., 2000a), aunque no todos los caracteres presentaron diferencias. Asimismo, otros experimentos fallaron al demostrar diferencias entre las respuestas de los genotipos a diversos niveles de estrés (Van Dongen et al., 2001), empero dos estudios no experimentales, analizando poblaciones de aves expuestas a diferentes niveles de estrés ambiental, evidenciaron que la magnitud de la asociación de la estabilidad y la endogamia puede depender de la cantidad de estrés ambiental que se experimentó durante el desarrollo (Kark et al., 2001; Lens et al., 2002). Para humanos solo la psicología evolucionista ha especulado en torno a la relación de la AF y la selección sexual (Møller y Pomiankowski, 1993; Watson y Thornhill, 1994; Barber, 1995; Manning, 1995), pero en general la evidencia es poca o nula (Lens et al., 2002). Los resultados, al mostrar una total aleatoriedad en el patrón geográfico y cambios puntuales respecto de los valores de asimetría facial a través de distintos antropobiotomas, parecen indicar una baja o nula relación de la asimetría como indicador universal de inestabilidad en el desarrollo. Una vez más parece que los datos indican que la AF tiene un sentido neutro.

Discusión general

Análisis integrador

La siguiente sección tiene la intención de integrar las discusiones realizadas en cada capítulo en articulación con el planteamiento general del problema, el fundamento teórico y el diseño experimental de la tesis.

A lo largo de los seis capítulos de esta tesis se ha presentado una serie de resultados que sustentan un acercamiento multivariado sobre varios caracteres de la variación fenotípica facial humana, en el marco de un paradigma centrado en el análisis de grandes cantidades de datos (ver Collyer et al., 2014). El modelo planteado en la introducción precisaba que la evaluación conjunta de diversas variables, con distintos niveles de implicancia o influencia, podría dar una fuente de posibles explicaciones a la variación asimétrica encontrada en el rostro y con un menor grado de incertidumbre respecto de análisis ya realizados en publicaciones previas. El aspecto más importante de éste acercamiento es el muestreo, que fue diseñado en reuniones específicas conformadas por especialistas de múltiples disciplinas, y que debido a sus características, permitió evaluar muchos aspectos de manera conjunta, a diferencia de la mayoría de los reportes científicos previos en materia de asimetrías. De esta manera se tiene que recalcar que el esfuerzo de muestreo ha tenido excelentes resultados ya que se han podido coleccionar datos genómicos, fenotípicos, antropométricos y socioeconómicos sobre una muestra grande de individuos. Como ya se ha discutido, los enfoques que analizan la variación asimétrica están comúnmente sustentados en análisis univariados y como máximo, implementan enfoques bivariados.

Los resultados explorados aquí sobrepasan en algunos sentidos a las caracterizaciones y contrastes realizados en la literatura sobre asimetrías faciales humanas. En esta sección se defiende que para el estudio del componente asimétrico es necesario una implementación multivariada base, es decir, una caracterización de los valores asimétricos dentro de la muestra en estudio, ya que incluso en estudios de componente simétrico, la asimetría puede resultar significativa (Klingenberg et al., 2002). Resta decir que muchos de los fenómenos biológicos merecen una aproximación multifactorial, ya que si los datos son analizados de manera separada (uni o bivariada), la estructura total de los datos no será revelada (Everitt y Hothorn, 2011). No se debe olvidar que el análisis de las variables por separado hace más probable la pérdida de información y por ende un pobre entendimiento de las características clave en las investigaciones desarrolladas.

La fuente de error

En el capítulo I fue posible verificar los niveles de error generados por el proceso de medición del fenotipo facial. Como ya se ha detallado, el error en estudios de asimetría es de principal importancia, ya que es posible que la interpretación de resultados sea alterada por los errores cometidos por un observador y no por un fenómeno biológico. Algunos autores

establecieron las guías mínimas necesarias para lograr una estimación de la asimetría fluctuante válida (Palmer y Strobeck, 1986, 2003; Palmer, 1994, 2000). Gracias al diseño de diversos experimentos *ad hoc* esta disertación pudo explorar diversas fuentes de error de potencial importancia en la obtención de resultados. Todas las estimaciones resultaron aceptables. Quizás lo más relevante sea el hecho de probar el error en el modelo de Procrustes ANOVA, con una repetición de 200 individuos. El término del error siempre fue menor que cualquiera de los efectos incluidos en la prueba. Esta validación permite conocer si el término del error se distribuye con una varianza menor que la asimetría fluctuante (Klingenberg y McIntyre, 1998a) y da validez a todo el posterior tratamiento de los datos.

Además de lo anterior, cabe resaltar la aceptable repetibilidad del PhotoModeler como técnica de captura y proceso de la forma facial en 3D. De igual forma, existen muchos artículos que califican la fotogrametría como aceptable (D'Apuzzo, 2002; Weinberg et al., 2006; Galantucci et al., 2008; Menezes et al., 2009; Abdulkareem y Abdulkareem, 2012), en línea con la observación de alta repetibilidad de la fotogrametría por medio del Photomodeler en las pruebas realizadas en esta tesis.

Genética, Asimetría e Inestabilidad del desarrollo

El elemento central de la tesis fue la disponibilidad de información genómica para la totalidad de los individuos incluidos en los análisis. En un estudio desarrollado durante el proceso de la tesis, que representa la primera fase del programa de investigación CANDELA, se estudió la genética de la apariencia física de los latinoamericanos en una muestra de más de 7.000 personas. Fueron detectados efectos significativos de la ancestría genética para la mayoría de los fenotipos estudiados y la dirección de estos efectos está de acuerdo con la diferenciación fenotípica entre los vértices del modelo trihíbrido presentado: africano, europeo y amerindio. Se observó una amplia variación en la ascendencia entre los países (Figura 10.1, 10.2c), así como entre los individuos dentro de los países (Ruiz-Linares et al., 2014). Por último, se determinó que ciertos fenotipos tienen un fuerte impacto en la autopercepción de la ancestría, y que estos sesgan la percepción subjetiva respecto de la ancestría genómica “real” de cada individuo, como serían los ojos azules, que fuerzan la autopercepción hacia el vértice europeo (Figura 10.2a,b). Además, para ancestría europea, la auto-percepción tiende a subestimar la ancestría genética (Figura 10.2c), las distribuciones son en su mayoría por encima de la diagonal. Por el contrario, la auto-percepción tiende a sobreestimar la ancestría africana, donde las distribuciones son en su mayoría por debajo de la diagonal (Figura 10.2c, panel d).

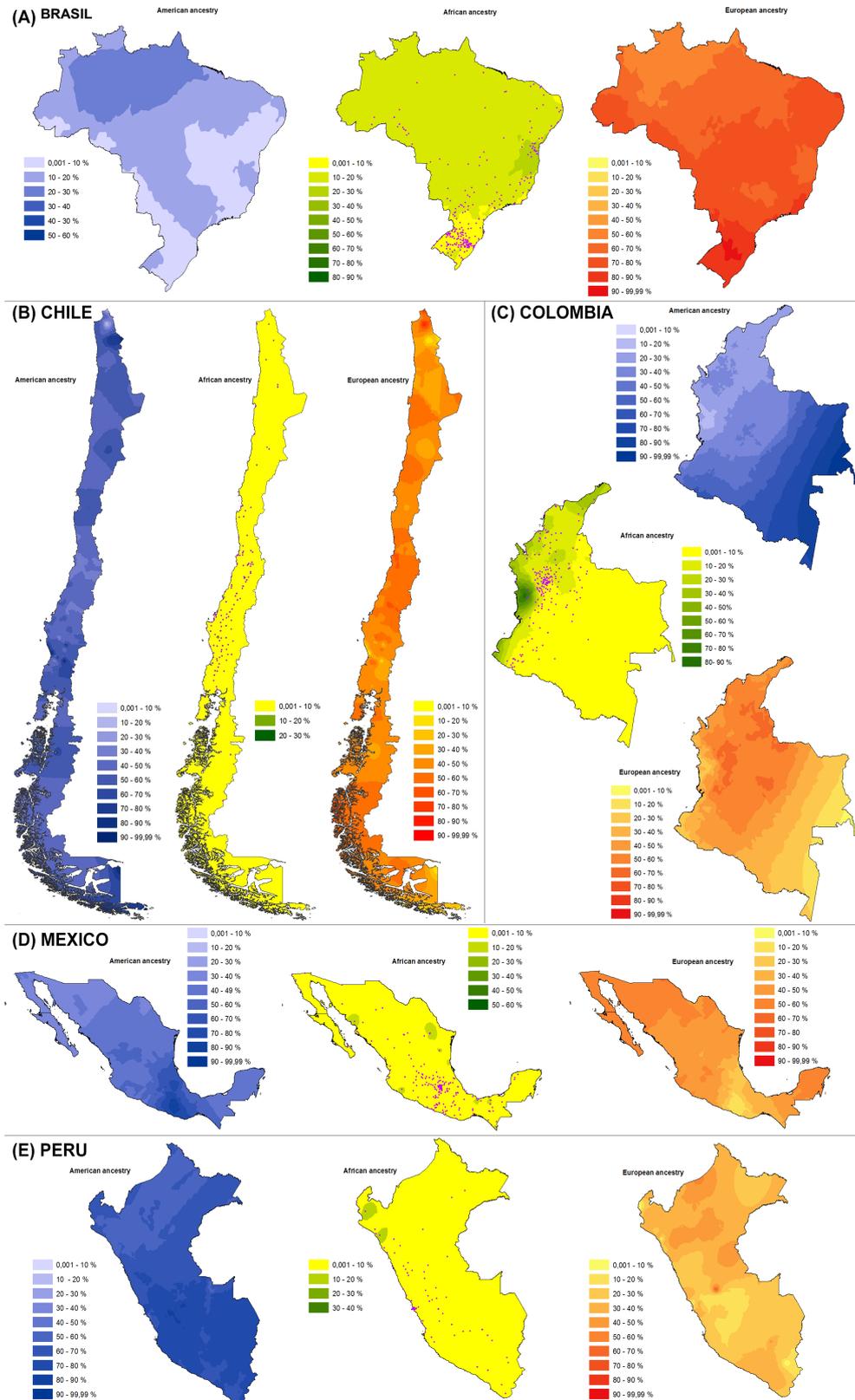


Figura 10.1. Distribución de la ancestría genética en la muestra CANDELA. En azul ancestría americana, en amarillo africana y en naranja europea. Tomado de Ruiz-Linares et al., (2014).

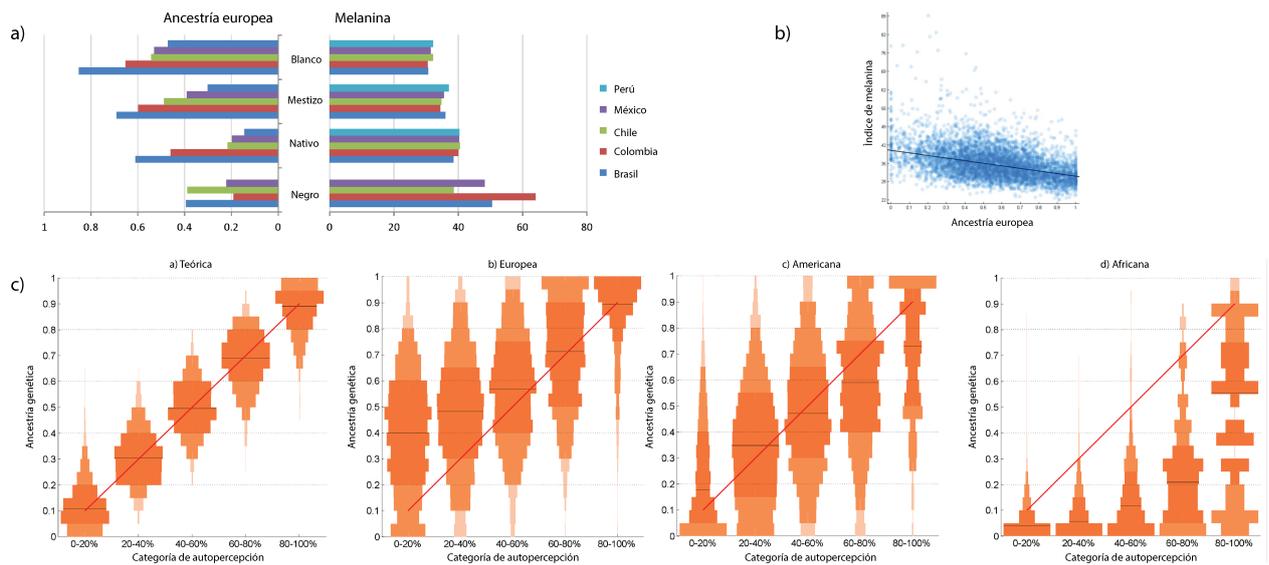


Figura 10.2 Relación entre la autopercepción de ancestría, la estimación genética “real” y su relación con el fenotipo. a) Gráficos de barras contrastando la pigmentación (índice de melanina) y la proporción de ancestría genética a través de las diferentes categorías de autopercepción de ancestría de la encuesta CANDELA en los cinco países del estudio. b) Gráfico de dispersión de la ancestría europea sobre el índice de melanina. c) Histogramas verticales (gráficos de pirámide) que muestran la distribución de ancestría genética para cada una de las cinco categorías ancestría auto-percibida. Panel (a) distribución teórica de la autopercepción, (b), (c) y (d) muestran, respectivamente, las distribuciones observadas para la ancestría europea, nativa americana y africana. La línea diagonal roja indica el punto medio en la escala de ancestría genética. Tomado de Ruiz-Linares et al., (2014).

De igual manera, los autores ajustaron a un modelo de regresión lineal simple la variación fenotípica y la ascendencia genética (tomando a la ancestría nativo americana como referencia) mostrando un efecto significativo para la mayoría de los rasgos examinados (para más detalle ver Ruiz-Linares et al., 2014). Este análisis fue realizado sobre el componente o espacio simétrico de forma. Es así que el análisis realizado por esta tesis extiende los resultados al componente asimétrico de forma, punto inédito en la bibliografía. Los autores (Ruiz-Linares et al., 2014), utilizando distancias *interlandmarks* muestran correlaciones significativas con la ascendencia europea y africana. Concretamente, la ascendencia europea implica correlación con las distancias entre puntos colocados en los labios y la nariz (el Anexo 6 incluye el trabajo antes descrito).

Los datos anteriores, más los resultados obtenidos en esta tesis, dan cuenta de la manera en la que la ancestría genética modela la configuración de cierta proporción de las características fenotípicas faciales. Los resultados de la tesis diseccionan la variación genética y fenotípica, concluyendo dos puntos importantes: en términos generales, los individuos con mayor grado de mestizaje exhiben una tendencia a menores niveles de asimetría, lo que apoya la idea de que la expresión de la asimetría facial no está dirigida por el efecto dominante o epistático, y que las condiciones genéticas y ambientales de los individuos mestizos no pueden ser vistas como un caso de inestabilidad en el desarrollo, al menos en el caso de mestizos de ciudades cosmopolitas latinoamericanas (Quinto-Sánchez et al., 2015, ver Anexo 6). También, extendiendo

los resultados al componente asimétrico, la asimetría direccional es la mayor manifestación de la asimetría facial para esta muestra donde hay una tendencia hacia la izquierda en europeos y derecha en americanos (Quinto-Sánchez et al., 2015). Esto sugiere que la asimetría fluctuante es un efecto secundario en la configuración asimétrica facial humana.

Son pocos los estudios previos que caracterizan la asimetría individual y la genética en humanos. Por ejemplo, existe un reporte que incluye una muestra de 3,000 individuos publicado por Windhager et al., (2014). Contrario a lo encontrado en esta disertación, Windhager et al., (2014) no hallaron ninguna relación entre la asimetría y los SNPs asociados a la variación de la cara media en individuos de ancestría europea, aunque el estudio se limita a solo cinco SNPs asociados a la variación facial (rs4648379, rs9744448, rs17447439, rs6555969, y rs805722) que Liu et al., (2012) reportan para su estudio. Además, dicho estudio no encuentra relación entre la heterocigosidad y el nivel de asimetría fluctuante. Sin embargo, se tiene que recalcar que la caracterización de la asimetría es pobre, el estudio no explora la variación del componente y no se reporta el grado de contribución de la varianza de cada efecto dentro del Procrustes ANOVA, aunque el objetivo del estudio es evaluar la inestabilidad en el desarrollo (Windhager et al., 2014). Igualmente, la asimetría fue evaluada utilizando nueve *landmarks* faciales medios y sólo cuatro bilaterales (zygion izquierdo/derecho, alare, centros de los ojos, nasion, pronasale, subnasale). Así, estos datos no permiten mayor comparación que el reporte de los mismos, ya que al no informar detalles de caracterización tan importantes, los patrones más puntuales no pueden ser comparados. Debe considerarse que la significación obtenida por el trabajo de Windhager et al., (2014) está influida por la tendencia en los SNPs utilizados (un total de 102), que si bien están asociados a variación facial (Liu et al., 2012), fueron estimados solo en población europea y en el componente simétrico. Además, otros factores importantes que contribuyen a estas diferencias son: 1) no se detalla si la asimetría fluctuante fue realizada con métrica Procrustes o Mahalanobis, 2) no se habla de la asimetría direccional, y 3) el número de SNPs utilizados (102, en contraste con los 90,000 utilizados en esta tesis). Una combinación de todos estos factores podría ser la explicación de la discordancia entre el trabajo de Windhager et al., (2014) y la presente tesis.

En referencia al patrón de asimetría direccional y su posible relación con la base genética del individuo, se ha señalado que éste tipo de asimetría se relaciona con estresores como el síndrome alcohólico fetal (SAF), donde la asimetría direccional promedio se incrementó en aquellos individuos expuestos al alcohol en útero (Klingenberg et al., 2010). Igualmente, existe una relación importante subestimada en el estudio de Klingenberg et al., (2010), y es que existe una diferencia de ancestría en éstos individuos: una muestra pertenece a negros de Cape Town, Sudáfrica y otra a caucásicos de Finlandia, así que clasificados en sus respectivos grupos étnicos se encontró que el grupo de negros de Cape Town presentó un desplazamiento de la línea media de puntos a la derecha y un desplazamiento de los ojos hacia la izquierda. Por otra parte, el ojo y el frontotemporal mostraron un desplazamiento hacia adelante en el lado derecho y posteriormente en el lado izquierdo. En contraste, las principales características de la asimetría direccional en los europeos de Finlandia fueron un desplazamiento de los puntos de la línea media (excepto el mentón) hacia la derecha y un cambio de los ojos hacia la izquierda, con

sustancialmente mayor asimetría direccional en el lado izquierdo respecto del lado derecho. También hay que citar que el patrón reportado por Klingenberg et al., (2010) ha sido hallado en poblaciones sin aparente exposición al alcohol, lo que puede verificarse por la consistencia con la fuerte tendencia para una dominancia izquierda en las mediciones de distancia faciales que se encuentran en algunos estudios publicados (Vig y Hewitt, 1975; Chebib y Chamma, 1981; McIntyre y Mossey, 2002; Ercan et al., 2008) y que contrasta con la dominancia derecha reportada por otros investigadores (Farkas y Cheung, 1981; Ferrario et al., 1995; Shaner et al., 2000), y diferencias derecha-izquierda entre secciones de la cara (Ras et al., 1994; Klingenberg et al., 2010). Puede ser probable que el patrón observado en el trabajo de Klingenberg et al., (2010) el factor estresor esté sobredimensionado y que el fenómeno subyacente sea la ancestría genética y por ende un patrón de AD específico, tal como el descrito en esta tesis para poblaciones Latinoamericanas.

Algunas otras publicaciones, si bien no han buscado explorar la diferencia de los patrones de asimetría direccional y la ancestría genética, indirectamente dan cuenta del patrón direccional que se presenta en cada población e indirectamente también hacen referencia a su ancestría. Por ejemplo, algunos estudios han sido realizados en individuos escoceses (McIntyre y Mossey, 2002), turcos (Ercan et al., 2008), holandeses (Ras et al., 1994), ingleses (Vig y Hewitt, 1975) canadienses caucásicos (Chebib y Chamma, 1981), caucásicos (Ferrario et al., 1995), caucásicos americanos (Farkas y Cheung, 1981) o en una muestra multipoblacional de europeos, mestizos, nativos americanos, coreanos, libaneses, chinos españoles, afroamericanos y mayas (Shaner et al., 2000). Es interesante resaltar el hecho de que aquellas muestras con tendencia a la asimetría direccional derecha pertenecen a poblaciones cuya ancestría genética es americana (Farkas y Cheung, 1981; Shaner et al., 2000) y aquellas poblaciones con ancestría genética europea presentan una tendencia hacia el lado izquierdo. Esta tesis y una publicación previa (Quinto-Sánchez et al., 2015) muestran que la tendencia de la asimetría direccional entre grupos parentales (europeos-americanos) se corresponde con lo descrito en estos artículos. Sin embargo, se requiere una exploración más detallada sobre la distribución de la asimetría direccional en otras poblaciones con ancestrías genéticas asiáticas, africanas, etc., con la finalidad de pormenorizar el conocimiento del patrón de asimetría direccional en poblaciones humanas.

Klingenberg et al., (2010) citan, sobre las tendencias direccionales de la asimetría, que no está claro en qué medida la inconsistencia de los resultados publicados corresponde a verdaderas diferencias entre las poblaciones en estudio o a la diferencias en los métodos utilizados para la medición y análisis y que por éste motivo es que se debe tener cuidado en la descripción de la direccionalidad de las asimetrías. Sin embargo en una publicación reciente aclara, con sorpresa, que el patrón parece ser “verdadero” (ver Klingenberg, 2015). Se debe recordar que una asimetría facial significativa se ha demostrado incluso en rostros considerados “estéticamente agradables” (Ercan et al., 2008). Lo anterior refuerza la idea de que la condición basal para cualquier población dada no es la simetría perfecta, sino que existe algún nivel poblacional basal de ambas: asimetría direccional y fluctuante, como se ha demostrado en una publicación reciente en mestizos mexicanos (Farrera et al., 2014). En éste sentido, se debe

rediscutir la contribución de Graham et al., (1993) que demostraron que tanto antisimetría como asimetría direccional pueden ser inducidas por un simple cambio de los niveles de retroalimentación y la inhibición en el modelo de morfogénesis reacción-difusión Turing Rashevsky. Y que también se ha propuesto que la asimetría direccional está más determinada genéticamente por lo que no podría ser utilizada como un *proxy* para estimar la estabilidad de desarrollo (Palmer, 1994). Luego entonces, la asimetría no puede verse como un “error”, “ruptura” o “inestabilidad”, sino más bien como parte del proceso normal de una norma del desarrollo.

Si bien, se debe hacer un estudio más detallado de los patrones de asimetría direccional, es interesante resaltar cómo los niveles de asimetría direccional y fluctuante difieren entre los grupos parentales. Recientemente, Klingenberg, (2015) consideró las diferencias en la asimetría direccional como hechos simples o secundarios, resaltando el hecho de que:

“En los estudios de asimetría de las mediciones clásicas, la AD se encuentra de vez en cuando, pero los estudios de morfometría geométrica la han encontrado en casi todos los datos examinados. A pesar de que yo era consciente de ello, he sido sorprendido por el gran número de estudios que han encontrado asimetría direccional de forma. Esto no es sólo una cuestión de poder estadístico, ya que muchos de los mismos estudios (si se utilizan estructuras con simetría “matching”) no reportan ninguna asimetría direccional para el tamaño del centroide. Parece que hay una verdadera diferencia entre el tamaño y la forma, que sólo los métodos de morfometría geométrica podrían revelar. Esto plantea nuevas preguntas sobre la base del desarrollo de la asimetría direccional de forma, sus posibles implicaciones funcionales y su evolución”

Lo anterior plantea interesantes y novedosas líneas de investigación acerca de las posibles implicaciones de la asimetría direccional en diferentes grupos humanos.

Algunos de los mecanismos y genes implicados en la producción de la asimetría direccional de los órganos internos, como los genes *Pitx* o la migración del epitalamo en el cerebro del pez cebra, parecen estar altamente conservados, lo que sugiere que la asimetría izquierda-derecha es una característica ancestral de los animales bilaterales (Klingenberg, 2015). Así, se ha especulado una posible importancia funcional y adaptativa de la asimetría direccional (Klingenberg et al., 1998; Pélabon et al., 2006; Peélabon y Hansen, 2008) y es concebible, por ejemplo, que la asimetría direccional sutil de muchas estructuras externas sea una consecuencia no adaptativa de las limitaciones del desarrollo relativas a la asimetría direccional de los órganos internos. Como ya se ha citado, debe considerarse la posibilidad de que la asimetría direccional pueda tener un control genético dicotómico, donde algunas especies son simétricas y normalmente no expresan ninguna variación genética en la asimetría direccional, mientras que en otras especies se fragmentan algunos aspectos de la simetría para que la expresión de la variación genética cuantitativa sea posible. De igual forma, varios autores han notado que la variación en la asimetría direccional se puede confundir con la asimetría fluctuante (Santos, 2002; Rego et al., 2006; Stige et al., 2006). Por otro lado, se sugiere que el aumento en la fluctuación de asimetría observada en varios estudios de hibridación podría potencialmente resultar en que el patrón de la variación individual se transponga al de la

asimetría direccional (Alibert y Auffray, 2003). En este punto, se debe hacer hincapié en la evidencia de la variación genética en la asimetría direccional en caracteres mandibulares del ratón (Leamy et al., 1997; Leamy, 1999) que sugiere que la asimetría direccional alberga variación genética que potencialmente puede producir cambios evolutivos. En este sentido, la expresión fenotípica de la asimetría direccional depende de una disrupción en la simetría entre los ejes mediolaterales derecho e izquierdo en el desarrollo (Palmer 2004, 2005). Lo anterior permitiría la expresión diferencial de genes en cada lado del plano medio, y la variación genético-cuantitativa podría aparecer, volviendo a la asimetría direccional un carácter cuantitativo con capacidad de evolucionar. Sin embargo, hay controversia en este punto, ya que parece ser que la transición de antisimetría a asimetría direccional, realizada mediante la asimilación genética, no parece ser una vía evolutiva habitual en las asimetrías direccionales, porque las distribuciones bimodales o platicúrticas son raramente observadas en especies sin asimetría direccional, fenómeno que sí es plausible en la asimetría visible o externa (Palmer 2004; Levin y Palmer 2007). Esto sugiere, por ejemplo, que la ruptura de la simetría en alguna estructura como el ala de un insecto, la mandíbula del ratón o la cara humana, está generalmente asociada con una expresión específica del lado de la asimetría.

Otro patrón observado es que la asimetría, a veces, se vuelve completamente canalizada debido a la selección estabilizadora a largo plazo, lo anterior bajo el supuesto de un óptimo de simetría perfecta o imperfecta. De hecho, Hermisson et al., (2003) han demostrado que un estado de cero varianza genética aditiva es posible, aunque no necesario, como resultado de un largo plazo de estabilización de la selección en arquitecturas poligénicas epistáticas. Este fenómeno puede dar lugar a rasgos que pueden ser desplazados ligeramente de su óptimo selectivo. Esta hipótesis es comprobable en rasgos que muestren epistasis negativa en la dirección de su desplazamiento. Bajo una selección estabilizadora para la simetría, se predice que la asimetría direccional tendría una epistasis negativa (lo que significa que las sustituciones de genes que aumentan la asimetría direccional tenderán a disminuir), pero el efecto de otras sustituciones de genes también aumentan la asimetría direccional. En el caso anterior, algún grado de la varianza genética oculta permanece y puede ser expresado por los cambios repentinos en el sistema (ver Hermisson y Wagner, 2004). Éstos resultados pueden explicar el patrón encontrado por Leamy et al., (1997), Leamy (1999) y Rego et al. (2006) en el sentido de que una expresión de la variación genética está oculta en la asimetría direccional, cuando la canalización se rompe por la disrupción de la arquitectura genética después de la hibridación. De igual manera, otra posible respuesta posible es que la asimetría direccional sutil resulta de la epistasis. En éste sentido, los resultados de esta tesis y algún artículo previo (Farrera et al., 2014, Quinto-Sánchez et al., 2015) reportan patrones que distan mucho de ser sutiles.

Especulando, ¿podría ser viable que las diferencias de expresión de la asimetría direccional en poblaciones humanas sean producto de la historia biológica de la especie? Sin dudas, esta es otra posible respuesta. Los patrones diferenciales entre los grupos parentales pudieron haber fijado determinadas características que detonen un genoma con tendencias de asimetría direccional diferentes. Teóricamente, se predice que debido a que las estructuras correspondientes en el lado izquierdo y derecho son copias independientes de una estructura

que se desarrolla bajo el control del mismo genoma y en las mismas condiciones ambientales (Klingenberg, 2003b), existe la posibilidad de mapear los efectos de dichos genomas. Esto puede ser una suposición razonable, aunque las mutaciones se han observado en análisis de todo el genoma y se sabe que se acumulan con la edad en los mamíferos (Zhou et al., 2013; Behjati et al., 2014; Vijg, 2014), pero no está claro cuánto pueden contribuir a la variación normal fenotípica. Por lo tanto, si bien es plausible pensar que los lados izquierdo y derecho comparten esencialmente el mismo control genético de los procesos de desarrollo, debe tenerse precaución en la interpretación de éste fenómeno (Klingenberg, 2015).

Ahora bien, en cuanto al patrón de asimetría fluctuante, la explicación es más problemática. Muchos factores ambientales son heterogéneos en una escala espacial que podría generar variación dentro del individuo, incluyendo diferencias entre los lados derecho e izquierdo (Klingenberg, 2015). Si los rasgos fenotípicos muestran una respuesta de plasticidad para tal heterogeneidad, alguna cantidad de asimetría fluctuante observable puede ser debida a la plasticidad fenotípica en lugar de inestabilidad en el desarrollo. Esta posibilidad se ha plasmado en la literatura sobre la asimetría fluctuante, especulando que puede ser especialmente expresada en organismos sésiles como plantas (Savriama et al., 2012). Para organismos móviles, como los humanos, que se mueven a través de su ambiente durante su desarrollo, es plausible que tales heterogeneidades se promedien, por lo que los efectos de la plasticidad a las diferencias ambientales entre los lados podrían ser insignificantes (Klingenberg, 2015). Por éste motivo, para muchos organismos la asimetría fluctuante puede ser vista como el resultado de las variaciones aleatorias de menor importancia en los procesos de desarrollo y por tanto sería apropiada como estimador para la cuantificación de la inestabilidad del desarrollo, aunque también se advierte precaución en una reciente revisión (Klingenberg, 2015). Todo este razonamiento, puede ser ejemplificado por medio de una función de mapeo de desarrollo no lineal (Klingenberg, 2015) donde la pendiente de la función puede diferir entre diferentes genotipos (Figura 10.3).

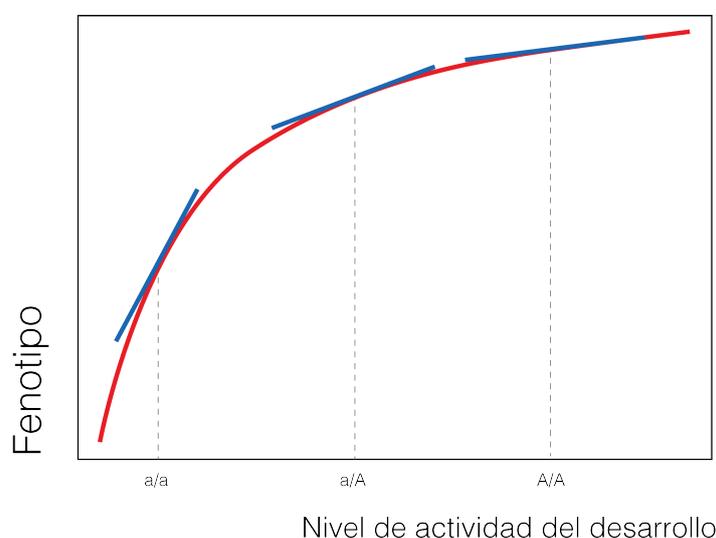


Figura 10.3. Mapeo de desarrollo no lineal y su relación con la inestabilidad del desarrollo. La curva roja representa un fenotipo como una función de la cantidad de alguna actividad x de desarrollo. Dicha cantidad se ve afectada por la variación genética (a/a , a/A y A/A).

A/A) así como la variación intrínseca del ambiente y el azar. Las líneas tangentes azules representan la pendiente de la curva para cada nivel de actividad de desarrollo (a/a, a/A y A/A) mismas que pueden ser medibles a través del fenotipo. A cada genotipo un cambio fenotípico diferente. En consecuencia, la inestabilidad en el desarrollo difiere entre los tres genotipos como consecuencia de cambios genéticos, fenotípicos como respuesta a una norma de reacción del desarrollo (tomado de Klingenberg, 2015).

Klingenberg, (2015) describiendo el modelo no lineal, detalla que:

“La pendiente de la función en cada uno de los valores importa, ya que indica la sensibilidad del fenotipo a pequeños cambios en el parámetro de desarrollo estudiado o, en otras palabras, es un indicativo de la inestabilidad de desarrollo. Si la pendiente difiere para los diferentes genotipos, se espera también que exista una respuesta fenotípica a las pequeñas perturbaciones del sistema de desarrollo. Esto significa que diferentes genotipos pueden tener diferentes inestabilidades en el desarrollo, y el mapeo no lineal de desarrollo, es suficiente para explicar la variación genética para la inestabilidad de desarrollo”

Este razonamiento implica que no hay necesidad de genes específicos que controlen la inestabilidad en el desarrollo: cualquier gen que afecta a un parámetro de desarrollo que se asigna de forma no lineal con el rasgo fenotípico puede tener un efecto sobre la inestabilidad del desarrollo (Klingenberg y Nijhout, 1999). De esta manera, la medida de la inestabilidad es el valor absoluto de la pendiente de la función de mapeo de desarrollo para el genotipo y las condiciones ambientales de interés (líneas tangenciales en la Figura 10.3, inferidas para tres genotipos). Este modelo considera que las perturbaciones de parámetros del desarrollo son al azar, por ello, es el valor absoluto de la pendiente lo que importa para la inestabilidad. Importa si la pendiente es pronunciada o no, mas no si la curva sube o baja. Dependiendo de la forma de la función de mapeo de desarrollo, el genotipo heterocigótico de un *locus* dado puede tener una pendiente que no es exactamente intermedia entre los dos homocigotos correspondientes, pero más cercana de uno de ellos (Figura 10.3) o más extremo que ambos. Esto significa que puede haber dominio, así como sobre o baja dominancia para la inestabilidad de desarrollo (Klingenberg y Nijhout, 1999). También significa que el dominio de inestabilidad está ligado de alguna manera a la dominancia para el valor fenotípico en sí mismo. Si hay varios parámetros de desarrollo en el modelo, la función de mapeo de desarrollo es una superficie en el espacio de parámetros. Dependiendo de la curvatura de esta superficie, los cambios en los valores de un parámetro pueden causar alteraciones en la función de mapeo para otros parámetros (Klingenberg y Nijhout, 1999).

Desde un punto de vista genético, esto significa que los efectos de los genes que influyen en los valores de un parámetro pueden alterar los efectos fenotípicos de genes que alteran otros parámetros en el modelo. En otras palabras, los efectos de los genes que controlan diferentes parámetros de desarrollo interactúan unos con otros, o hay epistasis entre ellos (Klingenberg y Nijhout, 1999). Como ya se mencionó, la epistasis para un rasgo puede provocar epistasis de la inestabilidad debido a que el cambio de las funciones de mapeo de desarrollo puede implicar cambios de las pendientes. También, incluso para un único parámetro del desarrollo que está bajo el control de dos o más *loci*, el mapeo del desarrollo no lineal puede provocar epistasis entre los *loci* para la inestabilidad. Este razonamiento tiene claras implicaciones para los estudios de la arquitectura genética de la inestabilidad del desarrollo (Klingenberg y Nijhout, 1999;

Klingenberg, 2003b), como se intentó realizar en esta tesis. Por encima de todo, se puede explicar el papel destacado de la dominancia y la epistasis de la asimetría fluctuante que se han encontrado en las búsquedas de QTLs (Leamy, 2003; Leamy y Klingenberg, 2005). También puede explicar la relación entre la asimetría fluctuante y heterocigosidad y el papel de genes complejos coadaptados (*coadapted gene complexes*), que han sido relacionados en reportes sobre asimetría fluctuante (Alibert y Auffray, 2003; Woolf y Markow, 2003). Así, un cambio ambiental puede cambiar la forma de las funciones del mapeo del desarrollo (Figura 10.3) o cambiar los valores de los parámetros de desarrollo para un genotipo particular (desplazamientos horizontales de las posiciones de los genotipos en la Figura 10.3) o también puede cambiar la inestabilidad del desarrollo de cualquier genotipo o la arquitectura genética de inestabilidad en una población. Los resultados de esta tesis resaltan la independencia relativa de dos grandes sistemas de arquitectura genética faciales, uno agrupando ojos y orejas y otro con boca y nariz. Esta evidencia está confirmada independientemente en varios estudios GWAS realizados por el consorcio CANDELA, el primero de ellos identificando genes candidatos de la variación de la oreja (Adhikari et al. 2015), otro ulterior detectando una asociación de un grupo diferente de genes para la nariz (Fuentes-Guajardo et al., 2015) y uno más reciente identificando genes responsables de patrones fenotípicos de vello en rostro y pelo en la cabeza (Adhikari et al., 2016). En éstos estudios se reporta una epistasis baja entre genes, por lo que se refuerzan los hallazgos de integración morfológica y modularidad facial de esta tesis. En efecto, los grupos de genes candidatos corresponden a los patrones de covariación, integración y modularidad hallados aquí.

Hasta el momento, esta discusión ha considerado modelos en los que el fenotipo está representado por un solo rasgo escalar. Con fenotipos multidimensionales, la función de mapeo de desarrollo representa la relación entre el espacio de los parámetros de desarrollo y el espacio fenotípico. Algunos aspectos del fenotipo pueden covariar con algún conjunto de parámetros del desarrollo, de modo que los diferentes aspectos fenotípicos pueden ser más o menos asociados a procesos específicos de desarrollo y viceversa. Alternativamente, puede haber menos flexibilidad, donde un solo conjunto dominante de características representan la mayor parte de la variación, o puede estar relacionado con una característica que abarca todas las variaciones del desarrollo. Por ello, la atención se ha desplazado al mapeo del desarrollo para los patrones de covariación entre rasgos y parámetros. Además, debido a la variación fenotípica aleatoria de las perturbaciones en el sistema de desarrollo es probable que surjan direcciones de pendientes más pronunciadas de las funciones de mapeo de desarrollo, que posiblemente puedan ser identificadas a partir de las características de forma asociadas con los PCAs de la asimetría fluctuante (Klingenberg y McIntyre, 1998b; Klingenberg et al., 2002). Como se realizó en el capítulo VI mediante las comparaciones de las matrices de covariación que parecen indicar desproporcionalidad de las vías del desarrollo, lo que aunado a la discusión anterior representa una evidencia clara de la actuación de diferentes grupos de genes, programas del desarrollo y respuestas fenotípicas diferenciales, entre espacios de forma, contextos genéticos y módulos faciales.

En otras palabras y como conclusión, esta tesis sugiere que existen patrones de

expresión de asimetría diferenciales entre aquellos individuos heterocigotos y homocigotos. Además, cada submuestra de individuos presenta un patrón diferencial de asimetría fluctuante, lo que indica, en sintonía con lo propuesto por Klingenberg (2015), que los genotipos y fenotipos presentan respuestas de inestabilidad diferenciales. Asimismo, estos resultados son evidencia de estimaciones locales de las direcciones de desarrollo de funciones de mapeo de la forma. En combinación con enfoques comparativos y experimentales, también es posible que los métodos morfométricos se puedan utilizar para explorar la topografía a mayor escala de funciones de mapeo de desarrollo.

En otro contexto, y relacionando con algún punto de la discusión anterior, también existen análisis entorno a la relación de la asimetría fluctuante con la heterocigosidad (Woolf y Markow, 2003). Varios estudios han utilizado las formas de los cráneos y mandíbulas de ratones de zonas híbridas, con resultados variables incluyendo reducción de la asimetría fluctuante en los híbridos (Debat et al., 2000), sin diferencias aparentes (Mikula y Macholán, 2008) o con patrones asimétricos en gradiente (Mikula et al., 2010). Las relaciones entre asimetría fluctuante e hibridación también se han observado en otras especies, incluyendo alas de *Drosophila* (Rego et al., 2006; Carreira et al., 2008) y también con resultados contradictorios en algunos otros insectos como *Triatoma* (Nouvellet et al., 2011). La heterocigosidad se refiere a la estructura genética de la población y su relación con la asimetría fluctuante es también de interés en ese contexto. Existe una correlación negativa entre la heterocigosidad y asimetría fluctuante de forma para las mandíbulas de las musarañas en las islas escocesas y continentales, pero esta relación se ve influida considerablemente por la población de la isla más pequeña, donde la heterocigosidad y la asimetría son más altas (White y Searle, 2008). En hábitats cada vez más fragmentados, diferentes especies de insectos parecen responder de manera diferente en cuanto a su asimetría fluctuante (Habel et al., 2011, 2012). Por último, la evidencia de esta tesis (Quinto-Sánchez et al., 2015, ver anexo 6) y algún estudio más (Schaefer et al., 2006), muestran que la heterocigosidad es uno de los factores que puede influir disminuyendo la asimetría fluctuante facial en los humanos, lo anterior a reserva de la evidencia en contra discutida arriba (Windhager et al., 2014).

En resumen y en sintonía con Klingenberg, (2015), las correlaciones de asimetría fluctuante con diversas medidas de estrés o calidad genética son muy heterogéneas e incipientes. A pesar de que la asimetría fluctuante es relativamente fácil de medir (Klingenberg y McIntyre, 1998b; Klingenberg et al., 2002) y de su naturaleza multivariante (Leung et al., 2000), el estado del arte sugiere que la asimetría fluctuante no es un indicador fiable de estrés ambiental o de “calidad” genética. No obstante los resultados obtenidos aquí indican que la heterocigosidad correlaciona negativamente con la asimetría fluctuante, y que los patrones asimétricos difieren en las poblaciones parentales

Asimetría en una dimensión socioeconómica

Ya se ha discutido que la relación entre la asimetría fluctuante y la inestabilidad del desarrollo no es clara, por lo que menos lo será la evidencia de que la asimetría fluctuante sea

indicador de “calidad genética” del individuo como la psicología evolucionista propone. Sin embargo, en contra de esta evidencia varios trabajos asumen el universal de la relación entre asimetría fluctuante e inestabilidad y por ende la posibilidad del rastreo de niveles de asimetría característicos de algún estatus socioeconómico (Özener, 2010ab, Özener, 2011, Bigoni et al., 2013 Gawlikowska et al 2007, Deleon 2007). Contrario a lo expuesto por estos autores, esta tesis contradice sus predicciones, ya que no se halló ninguna asociación entre las asimetrías y los diversos índices construidos para inferir el estatus socioeconómico de los individuos CANDELA. Este resultado se mantiene aún cuando los efectos de la heterocigosidad son controlados. Es necesario enfatizar que el diseño y metodología determinan mucho del enfoque y perspectivas obtenidas previamente. La encuesta implementada en la iniciativa CANDELA, por ejemplo, y a diferencia del resto de los artículos, (ver Anexo 1) permitió evaluar de forma multivariante tres grandes aspectos socioeconómicos: educación, salario fijo mensual y un índice de bienestar. Si bien teóricamente se acepta que los bajos niveles socioeconómicos tendrán peores condiciones de vida en general, un estudio reciente revela que los individuos costarricenses mejor educados y más ricos están en peor situación cuando son observados indicadores de salud como la mortalidad y el síndrome metabólico (Rosero-Bixby y Dow, 2009). En contraste, la calidad de las medidas relacionadas con la vida, tales como discapacidades funcionales y cognitivas, fragilidad física y depresión, empeora claramente en niveles socioeconómicos bajos. Factores de riesgo cardiovascular, tales como la diabetes y el colesterol no resultaron significativamente relacionados con el estatus socioeconómico, pero la hipertensión y la obesidad son peores entre los individuos de alto nivel socioeconómico (Rosero-Bixby y Dow, 2009). El tabaquismo y la falta de ejercicio son más comunes entre niveles socioeconómicos bajos, pero las dietas altas en calorías son más comunes entre niveles altos. De igual manera, ya se ha destacado la relación de las determinantes sociales de la salud (Marmot y Wilkinson, 2005), aunque tradicionalmente se asociaba que la salud seguía un gradiente relacionado con la posición social, en la actualidad se reconoce que es un proceso más complejo. Esto implica que los puntos de partida conceptuales de la psicología evolucionista, en especial el que asume que las condiciones de salud son linealmente asociables al estatus socioeconómico, son de por sí, cuestionables.

Los científicos sociales han puesto atención en las consecuencias de la pobreza y la desigualdad social en el inicio del curso de vida (Aber et al., 1997) sobre todo en la cuestión del bajo peso al nacer (definido como menos de 2.500 gramos) y prematuros (de los cuales el peso al nacer es a menudo un buen indicador o *proxy*). El bajo peso al nacer es una medida de salud particularmente importante porque la investigación muestra que la tasa de mortalidad infantil (un indicador común de desarrollo social) es altamente sensible al peso al nacer (Luke et al., 1993; Mathews y MacDorman, 2007). Además, muchos estudios relacionan estatus socioeconómicos bajos con asimetría fluctuante alta en mujeres (Özener 2010a), en poblaciones con altos niveles de estrés (Deleon 2007), en cráneos modernos respecto de medievales (Gawlikowska 2007), o en cráneos de personas que murieron por causas degenerativas (Weisensee 2013). Contrario a estas ideas se han encontrado valores de asimetría fluctuante altos para muestras de mejor posición socioeconómica (Bigoni et al., 2013). La idea anterior da cuenta de la diversidad de patrones referentes de la asimetría individual facial humana. Todo ello se demarca dentro de un

programa científico denominado “biología de la pobreza” o “de la desventaja” (Tomas, 1998; Conley y Bennett, 2000; Shonkoff et al., 2009; Boyce, 2012), que es definida como la dinámica de cómo las personas ajustan sus constricciones alrededor de ellos usando su biología, organización social e ideología (Tomas, 1998).

Los datos presentados por esta disertación contradicen el fundamento de la biología de la pobreza e indirectamente de la psicología evolucionista sobre que las asimetrías y el ruido en el desarrollo, al estar fuertemente determinadas linealmente, son una evidencia tangible de la sumatoria de estrés acumulada en el rostro (Møller, 1990, 1992; Møller, et al., 1995; Møller y Thornhill, 1997, 1998; Parsons, 1992; Perret et al., 1994) y por ende una evidencia de la “calidad genética” individual (Møller y Swaddle, 1997; Møller y Thornhill, 1997; Thornhill y Møller, 1997; Gangestad y Simpson, 2000). El establecimiento de que los rasgos faciales humanos o expresiones son adaptaciones biológicas requiere de la formulación y comprobación de hipótesis evolutivas (Gómez-Valdés et al., 2013). Por lo tanto, la idea de que la cara contiene alguna señal de niveles sociales o interacciones es todavía un concepto muy crítico (Schmidt y Cohn, 2001; Gómez-Valdés et al., 2013). Ninguno de los trabajos que reportan la relación con el estatus socioeconómico omiten reconocer que un cierto grado de asimetría facial es común en individuos sanos “normales” (Ercan et al., 2008, Farrera et al., 2014), que la utilidad de la asimetría fluctuante como un indicador de la estabilidad del desarrollo individual es pobre, a menos de que la varianza de la estabilidad de desarrollo sea extremadamente grande (Houle, 2000), y que no necesariamente los valores bajos de estatus potencialmente pueden desencadenar acontecimientos de inestabilidad en el desarrollo que se deriven en niveles de asimetría fluctuante altos (Conley y Bennett, 2000; Debat y David, 2001; Ercan et al., 2008; Bigoni et al., 2013; Farrera et al., 2014).

En este contexto es importante discutir la idea de que la asimetría fluctuante es un indicador de mejor calidad genética (Møller y Swaddle, 1997; Møller y Thornhill, 1997; Thornhill y Møller, 1997; Gangestad y Simpson, 2000) o signo de “buenos genes”, ya que la tesis que subyace en la bibliografía especializada en el tema es que existe un eje de alta relación entre inestabilidad-asimetría-calidad genética. Al estar teóricamente correlacionada la mayor cantidad de asimetría fluctuante con una peor calidad genética (pensada en la frecuencia de elección de una pareja), se ha retomado ese concepto para poder proponer a la asimetría como un indicador universal de calidad genética. Sin embargo, es solo una extrapolación burda de evidencias de especies con contextos ecológicos radicalmente diferentes al ser humano.

Profundizando, el concepto de calidad genética definida como el valor genético de un individuo para la aptitud (*fitness*) total, es controversial. La teoría dice que un rasgo puede evolucionar tanto por su efecto directo sobre la aptitud o *fitness* (selección directa) o porque está correlacionado genéticamente con otros rasgos relacionados con el *fitness* (selección indirecta) (Lande y Arnold, 1983). En este sentido, la evolución de la elección de pareja por selección directa es relativamente incontrovertible, pero el papel de la selección indirecta es una fuente de debate en curso (Hunt et al., 2004). Se cree que las mujeres derivan un beneficio de *fitness* indirecta cuando eligen para aparearse a machos de alta calidad genética (aunque no se

describe cómo se determina que tiene esta calidad, ni mucho menos qué la define), porque las futuras generaciones de descendientes heredan tanto la elección subyacente de genes (aquellos definidos arbitrariamente como de calidad). La comprensión de la selección indirecta, por tanto, presupone una comprensión de la calidad genética. Toda la formulación teórica anterior se basa en la óptica pan-adaptacionista. Básicamente, se han definido dos grandes tipos de beneficios genéticos: aquellos que resultan de la “superioridad” general de los genotipos de algunos machos y los que resultan de las interacciones entre los genes que los hijos heredan de ambos padres (es decir, dominancia y epistasia). Hay más pruebas de que los beneficios de esta última compatibilidad genética son importantes en muchas especies (Zeh y Zeh, 2003). Es común en los estudios de selección indirecta que se usen uno o unos pocos componentes de *fitness* como índices de calidad genética, por ejemplo: la supervivencia, la tasa de crecimiento o la competencia inmunológica. De esta manera la selección indirecta es impulsada por su efecto sobre el rendimiento de la descendencia y no todos los hijos son de igual valor. Por ejemplo, una mujer exigente que “paga” un costo directo (menos descendencia) para aparearse con un macho más atractivo dejará más descendientes que sobreviven. Si el éxito de su apareamiento es elevado puede compensar los costos de la fecundidad que ella y sus hijas sufren. En este sentido, ¿qué ocurre con los sistemas de apareamiento en el que las mujeres prefieren un macho diferente y no reciben recursos de alguno de ellos? (por cierto muy común en la especie humana). Los investigadores han postulado que estas hembras también deben estar seleccionando machos que aumentan la calidad genética de su descendencia. Sin embargo, a diferencia de sistemas de apareamiento de “buenos” genes, en estos sistemas de apareamiento la calidad genética refleja la interacción entre los genomas paterno y materno, y es con base de las interacciones gen a gen, que la hipótesis de compatibilidad genética fue propuesta (Trivers, 1972; Zeh y Zeh, 1996; Zeh y Zeh, 1997). Esta hipótesis sugiere que las interacciones favorables entre los genes dentro de un individuo pueden conducir a un aumento de la supervivencia a través de, por ejemplo, la ventaja de heterocigotos (*overdominance*). Si bien algunas investigaciones empíricas sobre los sistemas de apareamiento *lek*, así como otros sistemas de apareamiento no basadas en recursos naturales, han confirmado la asociación entre la preferencia de pareja y una mayor viabilidad a la descendencia, los efectos de la aptitud aparecen tan sólo en un pequeño porcentaje (Møller y Alatalo, 1999; Jennions et al., 2001; Kirkpatrick y Barton, 1997). Pocos estudios han examinado la asociación entre la elección de pareja y el éxito de apareamiento posterior de la descendencia, lo que podría ser un componente particularmente importante de la aptitud en sistemas donde las hembras eligen compañeros (Hunt et al. 2004). Los intentos de resolver la paradoja han postulado que las mujeres reciben un beneficio indirecto en forma de aumento de la calidad genética de su descendencia. Específicamente, los modelos han demostrado que el macho preferido debe proporcionar genes que aumenten la supervivencia o el éxito del apareamiento de la descendencia en comparación con los genes proporcionados por los machos menos deseables (Kokko et al., 2003; Mead y Arnold 2004). Sin embargo, ninguna de las hipótesis anteriores han podido comprobarse en humanos y mucho menos lograr establecer un vínculo entre calidad genética (si es que ésta existe) y asimetrías; es más hay evidencias que indican lo contrario: ninguna relación entre la elección de pareja y la asimetría facial (Farrera et al., 2014).

La idea que subyace detrás de todo este programa es una visión idealista de la morfología, donde los fenotipos están condicionados por un *bauplan* (visión fijista-idealista de la morfología) en lugar de pensar en variación intra e interpoblacional como productora de respuestas fenotípicas plásticas espacio-temporales. En su contra, Gould y Lewontin, (1979) en “*The Spandrels of San Marco and the Panglossian Paradigm: A critique of the Adaptationist Programme*”, apoyan la visión pluralista de Darwin, resaltando la importancia de otros factores en la evolución de los organismos y no solo la selección natural. En consecuencia, contrariamente al pensamiento estrictamente adaptacionista, defienden la idea de que la forma de las estructuras no puede ser explicada exclusivamente por la selección natural. Así, se introduce la noción de “*trade-off*” (costo-beneficio), donde los organismos confrontan ante las demandas competitivas. Además se crea una atomización en rasgos del organismo y estos rasgos se explican como estructuras óptimamente diseñadas por la selección natural para sus funciones. Parece que la explicación de superioridad es muy relativa y se basa en supuestos que bajo el término de la dinámica evolutiva son locales, pero presentados como universales. Además, como detallan Gould y Lewontin, (1979) el pan-adaptacionismo falla al no incluir dentro de sus explicaciones alternativas a las historias de adaptación, creando dependencia de plausibilidad en un solo criterio para aceptar ideas especulativas; además, de no considerar procesos alternativos como la fijación aleatoria de alelos, la producción de estructuras no adaptativas por correlación del desarrollo con características seleccionadas (alometría, pleiotropía, la correlación forzada mecánicamente), etc. Finalmente, Gould y Lewontin, (1979) recalcan un error esencial del programa panadaptacionista: sus explicaciones no separan adaptación y selección. Además de dejar fuera el papel de las interacciones no lineales y multinivel de los n posibles picos adaptativos en un paisaje geno-fenotípico y la correlación de epifenómenos de estructuras no adaptativas. Luego entonces, el concepto de calidad genética a la luz de los avances de la biología evolutiva y la genómica adolece de sentido real y persistencia.

En poblaciones humanas, la apuesta es aún más compleja, empero la gran cantidad de análisis de elección de pareja y las eventuales explicaciones pan-adaptacionistas son, por algún motivo, recurrentes. Bajo la idea anterior, los datos de asimetría fluctuante tomados como indicadores de la calidad del individuo o población se proponen como indicadores directos e inequívocos de que los individuos de la muestra más pobres serían aquellos con “peor calidad” tanto del desarrollo, del *fitness* y por consiguiente de sus genes. Lo anterior, debido a que su estatus socioeconómico tiene desventajas (ello asumiendo que la calidad genética, la asimetría fluctuante y el estatus socioeconómico están correlacionados). Sin embargo, los datos aportados por esta tesis en poblaciones mestizas indican que independientemente del índice que se utilice no existe relación entre el estatus socioeconómico y la asimetría facial.

En conclusión, la supuesta relación recíproca y cruzada entre la “calidad genética”, asimetría, inestabilidad del desarrollo y estatus socioeconómico, no sólo adolece de puntos de partida conceptuales correctos, sino que no es soportada por las evidencias empíricas halladas en esta tesis y en otros trabajos previos. Por el contrario, los resultados aportados aquí indican que incluso los grupos de estatus altos (presumiblemente de mejor desarrollo y más “calidad” génica) presentan niveles de asimetría altos. Los resultados anteriores se mantienen aún cuando

el efecto de la ancestría genética sobre la asimetría, reportado en esta tesis, es controlado estadísticamente. Y lo que parece más importante de resaltar, el rango de variación de la asimetría fluctuante en los estatus bajos y altos tiene una dispersión enorme, conteniendo un rango de expresión desde valores muy bajos a muy altos. Lo anterior podría indicar que las poblaciones modernas están sujetas a otras formas de manifestar la asimilación de un ambiente con estrés o perturbaciones como bien algunos estudios reportan (ver Bigoni et al., 2013, Rosero-Bixby y Dow, 2009). Es importante en este punto explicar todo el gradiente del estatus socioeconómico o, en su defecto, caracterizar los estatus socioeconómicos mixtos (Rosero-Bixby y Dow, 2009), ya que los estudios que han identificado un efecto entre estas variables se han centrado en los extremos de la variación, pero obvian el fenómeno en los puntos intermedios de la misma donde se concentra la mayor variación de los datos.

Además de lo anterior, los estudios de psicología evolutiva que relacionan asimetría con calidad genética suelen presentar bajos tamaños muestrales (Moller, 1990, 1992; Møller et al., 1995; Møller y Thornhill, 1997, 1998; Parsons 1992, Perret et al., 1994; Møller y Swaddle, 1997; Møller y Thornhill, 1997; Thornhill y Møller, 1997; Gangestad y Simpson, 2000) o presentar valores de correlación muy bajos (para referencia ver Tabla 10.1). A pesar de estas limitantes, las conclusiones de los autores crean un dogma universalista de la relación entre la “calidad genética”, la asimetría fluctuante y la inestabilidad en el desarrollo. Si observamos la gráfica del artículo de Özener y Ertuğrul (2010), por tomar un ejemplo, se puede observar que la varianza en los individuos con bajos estatus no condiciona necesariamente a valores altos de asimetría, sino que el grupo también presenta valores bajos (Figura 10.4). Al igual que los resultados del capítulo VII, los datos muestran tendencias de $r^2= 0.413$ (para todo el modelo empleado en esta tesis) o $r^2=0.08$ (Özener, 2010a), para referencia del modelo de la tesis se puede ver la Figura 7.3.

Generalizando, y concluyendo, se puede decir que pertenecer a un grupo con estatus socioeconómico bajo sin duda alguna acarrea diversos problemas relacionados con la salud, no porque la calidad genética del individuo sea menos óptima sino por el contexto socioeconómico de segregación en que vive. Es tan así que los datos de las personas de menor estatus en la muestra CANDELA presentan un rango de varianza de la asimetría fluctuante muy grande.

Por este motivo y por los argumentos presentados antes, podemos desechar el intento de relacionar un estatus socioeconómico bajo a mayor cantidad de asimetría fluctuante.

Tabla 10.1 Coeficientes de la regresión múltiple de variables socioeconómicas del trabajo de Özener y Ertuğrul, (2010). Las celdas azules fuerte con casos significativos para $p<0.001$. Las celda azul claro son significativos para $p<0.01$

Variable	Correlación	Coefficiente estandarizado	Intervalo de confianza 95%	
Tamaño de familia	0.246	0.092	-0.086	0.019
Educación madre	-0.411	-0.353	-0.326	0.119
Educación padre	-0.352	-0.198	-0.138	0.086
Trabajo madre	-0.259	-0.047	-0.096	0.056
Trabajo padre	-0.406	-0.311	-0.318	0.109
Numero de hermanos	0.281	0.002	-0.058	0.057
Numero de cuartos	-0.258	-0.042	-0.115	0.061

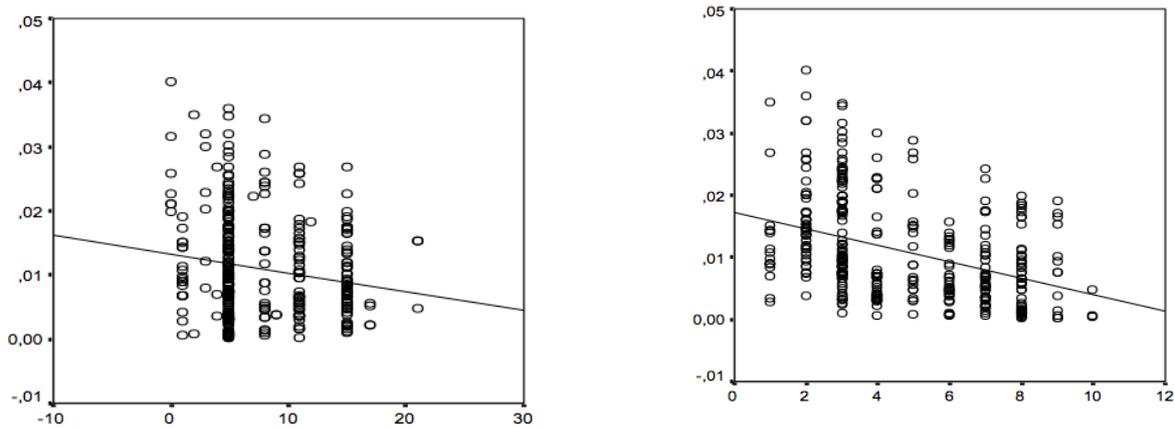


Figura 10.4 Gráficas de dispersión de las variables de la Tabla 10.1: educación de la madre, izquierda y trabajo del padre, derecha (eje x); ambas respecto del grado de asimetría fluctuante (eje y). Modificado de Özener y Ertuğrul, (2010)

Modularidad, integración morfológica y asimetría

El objetivo del uso de la asimetría fluctuante en los estudios de integración morfológica es que puede proporcionar información sobre los orígenes evolutivos o del desarrollo de la covariación entre rasgos (Klingenberg, 2003a, 2005). Para este trabajo era importante explorar cómo esta covariación se origina en el desarrollo. En éste sentido, los datos faciales muestran que las matrices de covariación de la asimetría fluctuante y la variación individual tienen una relativa proporcionalidad (Quinto-Sánchez et al., 2015), lo que indica que, en términos generales, las rutas del desarrollo de la cara serían una sola. Sin embargo, cuando diversas hipótesis de modularidad son examinadas el patrón de proporcionalidad de matrices cambia.

Existe un modelo general, con tres posibles escenarios, sobre el origen de la covariación entre rasgos (ver Riska, 1986). En el primero, un tejido precursor se divide en dos partes que, posteriormente, dan lugar a un rasgo diferente cada uno (Figura 10.5a). Debido al desarrollo compartido antes de la partición, cualquier variación que afecta a los primeros estadios tiene un efecto conjunto en ambos rasgos, que es medible como una covariación entre los rasgos (Figura 10.5a). Sin embargo, la división de un tejido precursor no es la única forma de generar tales patrones de covariación. Otra forma es que dos vías del desarrollo separadas produzcan un rasgo, y que por éste motivo estén conectados por una interacción de señalización de una vía a otra (Figura 10.5b). Durante esta interacción de señalización se puede pasar variación a otra vía, generando de ese modo covariación entre los dos rasgos. En los dos casos anteriores, las formas de generar covariación entre los rasgos implican interacciones directas entre las vías de las cuales se originan los rasgos, por la división de una vía en dos, o por la señalización de una vía a otra. En ambos modelos la interacción transmite variación directamente a múltiples rasgos,

es decir que genera covariación entre los rasgos por interacciones directas entre las vías de desarrollo (Klingenberg, 2015).

Un tercer modelo es la covariación entre los rasgos de variación en paralelo de vías del desarrollo independientes (Figura 10.5c). La covariación se origina por el efecto simultáneo de alguna fuente externa de variación en dos vías de desarrollo separadas (Klingenberg, 2003a, 2005). Las fuentes de variación pueden ser ambientales, tales como la variación en la temperatura o la nutrición, o pueden ser de origen genético, tales como la ocurrencia de diferentes alelos de un gen, las cuales deben tener alguna implicación en ambas vías (Klingenberg, 2005). En este último modelo, se destaca la no interacción entre las vías, que incluso pueden ocurrir en partes distantes del organismo. Por lo tanto, una constricción hace que la variación dentro de una de las vías sólo pueda afectar el rasgo que emerge de esa vía, pero no puede generar covariación entre los rasgos.

Distinguir cuál de los modelos podría estar operando en los datos CANDELA es de importancia, ya que el propósito del estudio era identificar o inferir las posibles bases del desarrollo de la integración morfológica, y de manera indirecta y secundaria, explorar sus posibles implicaciones evolutivas. Según Klingenberg, (2003b, 2005) la asimetría fluctuante cumple los requisitos para la inferencia de los modelos propuestos, debido a que los lados izquierdo y derecho de los individuos comparten el mismo genoma y posiblemente similares condiciones ambientales. Sabiendo que las diferencias entre los lados se originan a partir de fluctuaciones aleatorias en los procesos de desarrollo, la variación que surge dentro de las vías de desarrollo se acumula en las estructuras en estudio. Por lo tanto, la covariación de la asimetría fluctuante en diferentes rasgos debe ser exclusivamente debido a las interacciones directas entre las vías de desarrollo que generan esos rasgos (Klingenberg, 2003b, 2005). En el capítulo III, se planteó el argumento de que la comparación de los patrones de variación de la asimetría fluctuante y la variación individual es una herramienta útil al realizar inferencias sobre la base del desarrollo de la integración morfológica. Mientras que la covariación en la asimetría fluctuante se debe exclusivamente a las interacciones directas entre las vías de desarrollo, se espera que la covariación de la variación individual sea una mezcla de las contribuciones de las interacciones directas entre las vías del desarrollo y la variación paralela de vías separadas. No hay forma concreta de cuantificar las contribuciones relativas de los dos modos de la covariación de rasgos entre individuos, pero es plausible que la interacción directa de desarrollo desempeñe un papel primordial para la covariación cuando los patrones de covariación de la asimetría y la variación individual son similares (Klingenberg, 2003b, 2005).

El principal resultado obtenido en este sentido es que se hallaron diferencias en las proporcionalidades de las matrices de covarianza. Ojos, orejas y región neurocraneana serían afectadas por procesos de estabilidad-ruido del desarrollo similares o equivalentes. En cambio, la región sagital (boca y nariz) estaría gobernada por otro sistema. Es interesante, aunque obvio en cierta manera, que las estructuras con derivaciones embrionarias similares y rutas del desarrollo proporcionales tienen matrices correlacionadas significativamente. También hay que precisar que la nariz y boca, que son estructuras con mayor complejidad estructural y del

desarrollo, tienden a acumular una mayor cantidad de perturbaciones (Aparicio y Bonal, 2002). La boca y la nariz, como ya hemos citado, son estructuras en las que convergen gran cantidad de procesos funcionales, del desarrollo y crecimiento. Lo anterior bajo el supuesto de que una mayor complejidad estructural deriva en una mayor cantidad de asimetría fluctuante.

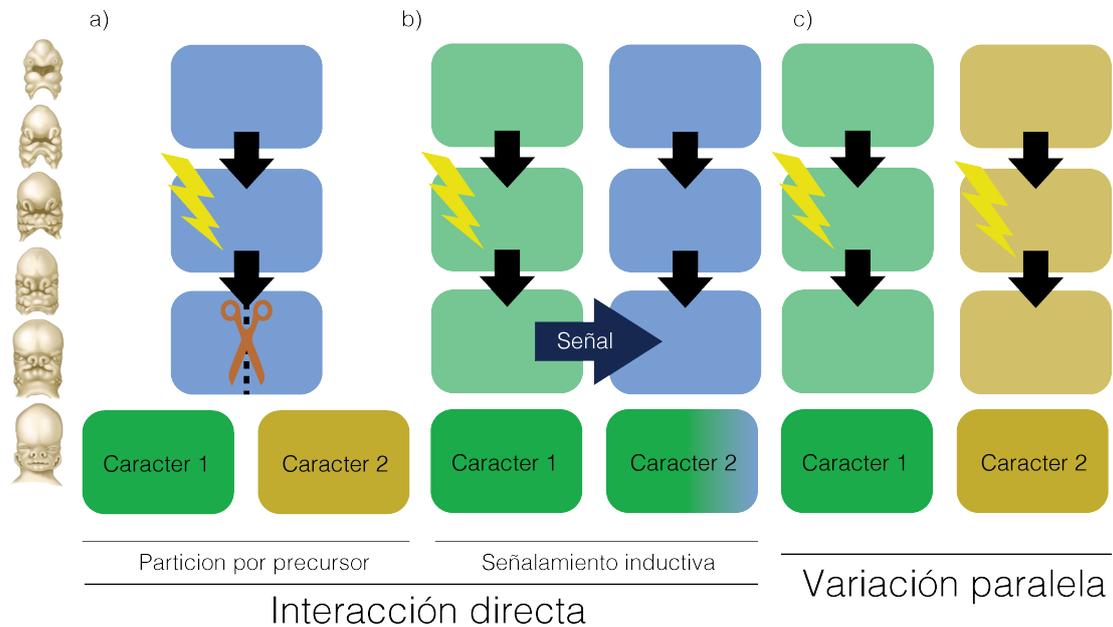


Figura 10.5. Origen de la covariación del desarrollo. Las cajas o celdas representan estadios del desarrollo que dan origen a los rasgos cuantitativos. Los rayos representan los efectos de la variación. a) Covariación por partición de la vía precursora. b) Covariación por señalamiento inductivo. c) Covariación por variación paralela (Modificado de Klingenberg, 2015).

Como un punto extra a los resultados antes descritos, ya se ha puntualizado que existe soporte asociativo genómico para las diferencias entre matrices de covariación. En dos trabajos realizados por el consorcio CANDELA, algunos SNPs cercanos a, o dentro de, los genes *DCHS2*, *RUNX2*, *GLI3* y *PAX1*, resultaron significativamente asociados a aspectos de la forma de la nariz como la inclinación de la columela, la amplitud del puente de la nariz y la amplitud alar de la nariz (para más detalle ver Fuentes-Guajardo et al., 2015). Asimismo, en el pabellón auditivo se detectó una asociación con siete regiones genómicas (con variantes de los genes *EDAR*, *TBX15* y *CART1*) que afectan el tamaño y forma del lóbulo, el plegado del antihelix, la torsión del helix, la extrusión de la oreja y el tamaño del antitragus (ver Adhikari et al., 2015, Figura 10.6). Con éstas dos evidencias queda por sentado que la modularidad genética es un componente importante dentro del modelo de expresión de los caracteres fenotípicos craneofaciales.

De esta manera, todo indica que ojos, orejas y neurocráneo son afectados por procesos de interacción directa por partición de precursores. En su revisión, Klingenberg (2015), reporta más de 22 trabajos que han encontrado relación entre asimetría fluctuante y la variación individual, ninguno en humanos. Alguno de estos trabajos no encuentran relación entre las variables en cuestión. En consecuencia, como propone Klingenberg, (2005), parece que las interacciones directas del desarrollo desempeñan un papel importante en la conformación de los patrones de integración para los rasgos morfológicos, pero la variación en paralelo de las vías

del desarrollo separadas también contribuye a la covariación.

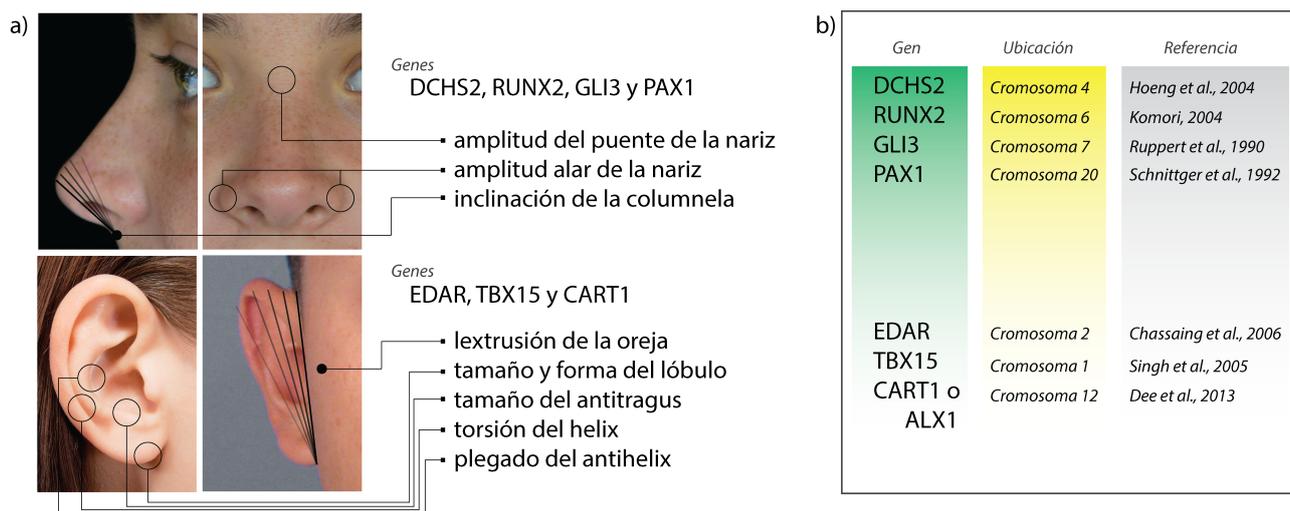


Figura 10.6. Genes identificados como asociados y posibles responsables de parte de la variación de algunas regiones de la nariz y oreja. a) Arriba, regiones de la nariz asociadas mediante GWAS: amplitud del puente y distancia alar, y la inclinación de la columnela. Abajo, regiones asociadas para la oreja: extrusión, tamaño y forma del lóbulo, tamaño del antitragus, torsión del hélix y plegado del antihelix. b) Referencia de los nombres, ubicaciones cromosomales y referencias bibliográficas del grupo de genes asociados a las regiones antes mencionadas. DCHS2, RUNX2, GLI3, PAX1 son los genes asociados a la nariz (ver Ruppert et al., 1990; Schnittger et al., 1992; Hoeng et al., 2004; Komori, 2008) y EDAR, TBX15 y CART1 o ALX1 a la oreja (Singh et al., 2005; Chassaing et al., 2006; Dee et al., 2013). Para mayor referencia véase los estudios de la iniciativa CANDELA (Adhikari et al., 2015, Fuentes-Guajardo et al., 2015).

Otro resultado importante encontrado aquí es que los espacios simétrico y asimétrico no tienen la misma propiedad modular. Es así que el componente asimétrico responde a un patrón funcional (ojos, nariz, boca, orejas) y el simétrico parece ajustarse a un patrón de módulos superior e inferior de la cara. De este modo, se concluye que la modularidad no tiene el mismo patrón cuando son analizados los morfoespacios de la forma, tal como algunos estudios previos resaltan en su importancia (Esteve-Altava et al., 2015; Klingenberg, 2015). Esta conclusión sirve como engranaje para la investigación de la relación entre la modularidad de la asimetría fluctuante, lo que podría evidenciar la base del desarrollo de la modularidad y la modularidad entre individuos y genotipos.

Asimetría en su dimensión geoespacial

Como ya se ha citado, la hipótesis de que los lados derecho e izquierdo serán iguales, en un entorno sin estrés e ideal, es muy problemática. Además, la evidencia de que la simple estocasticidad del proceso de división celular podría desencadenar procesos asimétricos complejiza mucho el estudio de los patrones de variación fenotípica asimétrica. En este sentido, las diferentes fluctuaciones en el medio pueden potencialmente limitar o potenciar los cambios entre los lados de una estructura o de los individuos en general. En este sentido, es lógico y observable que los factores ambientales son siempre heterogéneos en una escala espacial (si bien en condiciones de laboratorio se dan factores que crean una esfera de estabilidad o control,

la realidad es que siempre los ambientes son heterogéneos). Dicha heterogeneidad es, entonces, potencial promotora de la generación de variación dentro del individuo como la asimetría. Los caracteres cuantitativos exhiben una respuesta plástica a estos ambientes cambiantes, y dentro de toda la sumatoria de cambios algunos podrían estar relacionados a la inestabilidad en el desarrollo, estimada a través de la asimetría fluctuante.

La migración, un universal de la condición humana, permite que un individuo nacido en un ambiente x , se mueva a n diferentes ambientes durante su vida. La migración ha sido considerada una estrategia adaptativa de gran alcance para los humanos en el afán de mejorar su calidad de vida (Davis et al., 2013), por lo que desplazamientos locales a grandes ciudades o transnacionales han sido una constante en la historia del hombre del pasado y moderno.

En éste contexto, se cree que la asimetría fluctuante debería tener una distribución geográfica y estar relacionada con la perturbación de los ecosistemas por el humano. La idea detrás de esta hipótesis es que los individuos expuestos a similares condiciones ambientales que comparten un espacio geográfico contiguo deberán mostrar patrones de asimetría relacionados. Además, se ha enfatizado sobre la correspondencia entre los niveles de variación fenotípica y la distancia geográfica (Relethford, 2009). Sin embargo, los datos de la presente tesis parecen no estar estructurados geoespacialmente. Existe muy poco que agregar a la discusión ya realizada en el capítulo IV, ya que no abunda la teoría sobre la distribución espacial de las asimetrías, de modo que los resultados descritos estimulan un campo de profundo debate. En la bibliografía específica sobre asimetría fluctuante no hay reportes de patrones geoespaciales particulares y mucho menos para humanos.

En lo referente a la asimetría fluctuante y las perturbaciones ambientales en general, se ha sugerido una relación entre ambos fenómenos en especies de roedores, lagartos, cangrejos y musarañas (Marchand et al., 2003; Lazić et al., 2013; Sánchez-Chardi et al., 2013; Lazić et al., 2015 y Lezcano et al., 2015; Maestri et al., 2015). Únicamente los estudios que relacionan enfermedad con asimetrías pueden verse como la única evidencia del efecto de una perturbación en la presencia de asimetrías (Pound et al., 20014; Weisensee, 2013). Como ya se ha discutido, los individuos con mayor capacidad para amortiguar las perturbaciones de desarrollo son generalmente más vigorosos o resistentes y, por tanto, tendrían mayor aptitud. Así, la utilización de información geoespacial como los antropobiotomas (Elis y Ramankutty, 2008) fue utilizada para verificar la posible asociación con la asimetría fluctuante. Sin embargo, tal relación no existió: los biomas más perturbados no necesariamente presentan los valores de asimetría fluctuante más altos, y ambientes no tan alterados como campos de cultivo, pastizales y bosques también presentan valores altos de asimetría facial.

Modelo de análisis hiperdimensional de la asimetría

Hasta este punto han sido discutidos los aspectos más sobresalientes de cada uno de los ámbitos del modelo propuesto para el análisis de la asimetría individual (es decir, la asimetría fluctuante, direccional y el error). En esta sección únicamente se pretende indicar básicamente cómo el modelo planteado en la introducción se confronta con lo encontrado y discutido (Figura 10.7). Primero, la hipótesis de que en algunos individuos se podría observar una nula asimetría individual ($AI=0$) no es sustentada. La idea de un fenotipo sin modificaciones sutiles, es decir un *bauplan* perfectamente simétrico, no parece existir en poblaciones naturales. Una propuesta alternativa es la descripción del desarrollo en función de una norma de reacción, reconociendo que la plasticidad es un marco integrador además de las fuerzas moduladoras de la variación de los caracteres cuantitativos. Considerar la asimetría fluctuante como perturbaciones, rupturas o desviaciones sería incorrecto, siendo que éstas son una respuesta emergente y normal de los sistemas del desarrollo. Este hecho hace también aclarar que la asimetría fluctuante se relaciona no solo con aspectos de variación exógena, sino también endógena (como el caso del propio proceso de división celular o la bilateralidad de órganos internos del cuerpo). Además, la exploración multivariada de la integración morfológica y la modularidad permitió conocer el patrón y su aparición en los diferentes espacios y submuestras de individuos con diferentes estructuras genómicas. Para el caso de variables exógenas no se presentaron correlaciones importantes, salvo algunos casos que ya han sido referidos.

Por estas evidencias es que se puede asegurar que el axioma donde la asimetría fluctuante es un *proxy* de la inestabilidad del desarrollo no es plausible para las poblaciones estudiadas aquí. Se podría detallar que algunos factores endógenos como la edad, el BMI, etc., influyen en la conformación del patrón asimétrico, pero no se soporta la idea de que un individuo con una condición de vida desfavorable sería incapaz de amortiguar de igual forma, la inestabilidad en el desarrollo, en comparación con otro individuo en condiciones favorables. Por el contrario la norma de reacción de un individuo pobre o rico, en ambiente perturbado o no, con mayor o menor educación, presenta respuestas de estabilidad de desarrollo proporcionales.

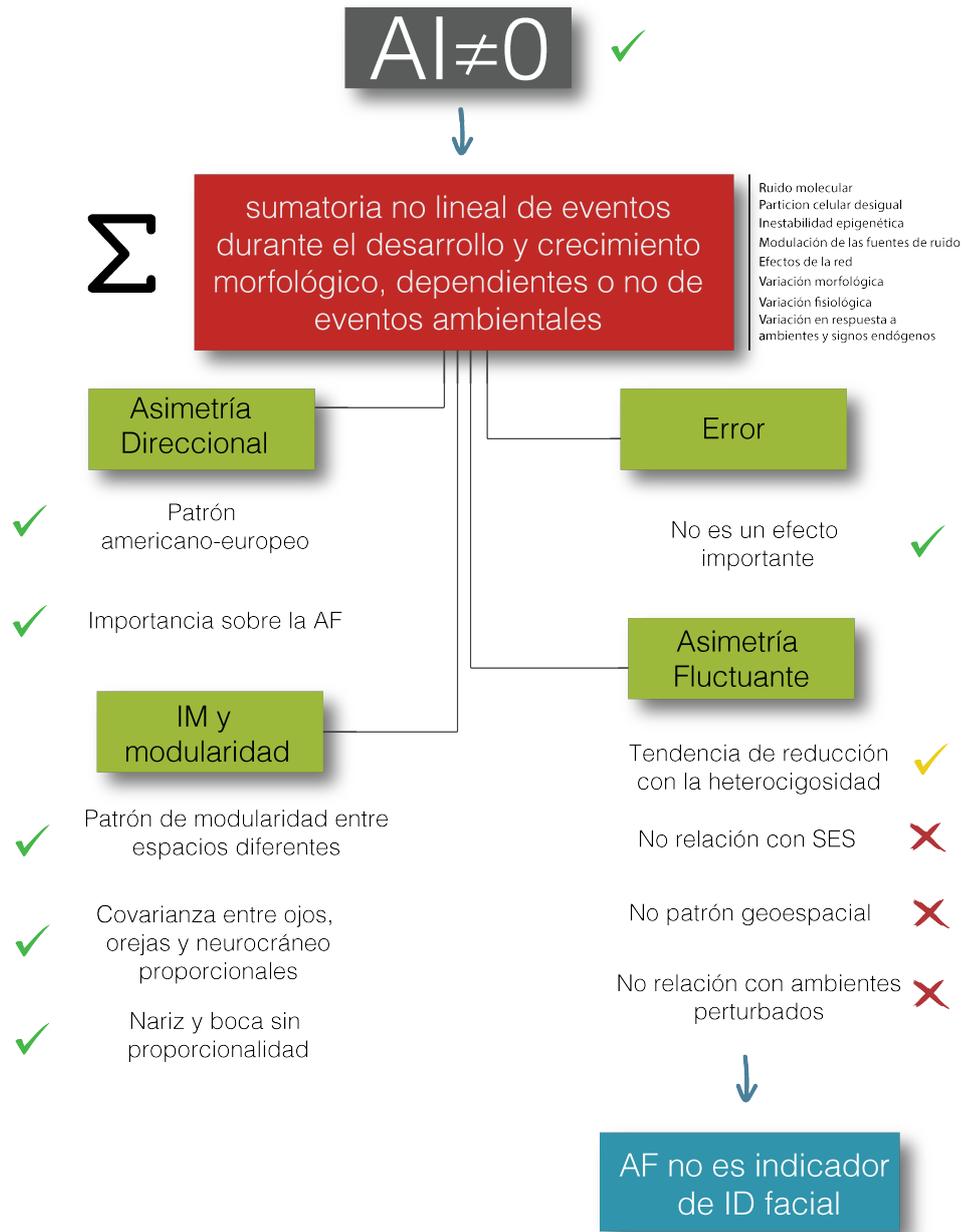


Figura 10.7 Integración de los resultados y discusiones con el modelo de análisis de la asimetría individual en la muestra CANDELA. Principales efectos contrastados en el modelo y su evaluación. El color amarillo denota la representación solo de una tendencia.

Conclusiones

1. A nivel de las poblaciones estudiadas en esta tesis, puede afirmarse que la asimetría individual es diferente de cero: cada individuo de la muestra presentó algún grado de asimetría, ya sea direccional o fluctuante.
2. La asimetría direccional es la principal fuente de variación en las poblaciones mestizas latinoamericanas estudiadas.
3. El eje de ancestría amerindio-europeo se caracteriza por presentar un gradiente de asimetría direccional.
4. Los individuos heterocigotos muestran una tendencia a menores valores de asimetría fluctuante.
5. La asimetría fluctuante está correlacionada con el sexo, la edad, el BMI y el modelo tri-híbrido presentado.
6. Los patrones de integración morfológica y modularidad son diferentes para los componentes simétrico y asimétrico, pero constantes en individuos con diferente composición genética.
7. Existe un patrón de integración común para el pabellón auditivo y los ojos, mientras que se detecta cierta disrupción entre nariz y boca.
8. La asimetría fluctuante no presenta correlación lineal con los datos socioeconómicos, geográficos y de perturbación del ambiente.

Bibliografía

- Abdulkareem S, Abdulkareem N. 2012. Accuracy and precision of a photographic system for the three-dimensional study of facial morphology. *J Baghdad Coll Dent* 24:138–145.
- Aber JL, Bennett NG, Conley DC, Li J. 1997. The Effects of Poverty on Child Health and Development. *Annu Rev Public Health* 18:463–483.
- Ackermann RR. 2010. Phenotypic traits of primate hybrids: recognizing admixture in the fossil record. *Evol Anthropol* 19:258–270.
- Ackermann RR, Rogers J, Cheverud JM. 2006. Identifying the morphological signatures of hybridization in primate and human evolution. *J Hum Evol* 51:632–45.
- Ackermann RR. 2005. Ontogenetic integration of the hominoid face. *J Hum Evol* 48:175–197.
- Adams DC, Rohlf FJ, Slice DE. 2004. Geometric morphometrics: ten years of progress following the “revolution.” *Ital J Zool* 71:5–16.
- Adhikari K, Fontanil T, Cal S, Mendoza-Revilla J, Fuentes-Guajardo M, Chacón-Duque J-C, Al-Saadi F, Johansson JA, Quinto-Sanchez M, Acuña-Alonzo V, Jaramillo C, Arias W, Barquera Lozano R, Macín Pérez G, Gómez-Valdés J, Villamil-Ramírez H, Hunemeier T, Ramallo V, Silva de Cerqueira CC, Hurtado M, Villegas V, Granja V, Gallo C, Poletti G, Schuler-Faccini L, Salzano FM, Bortolini M-C, Canizales-Quinteros S, Rothhammer F, Bedoya G, Gonzalez-José R, Headon D, López-Otín C, Tobin DJ, Balding D, Ruiz-Linares A. 2016. A genome-wide association scan in admixed Latin Americans identifies loci influencing facial and scalp hair features. *Nat Commun* 7:10815.
- Adhikari K, Reales G, Smith AJP, Konka E, Palmén J, Quinto-Sanchez M, Acuña-Alonzo V, Jaramillo C, Arias W, Fuentes M, Pizarro M, Barquera Lozano R, Macín Pérez G, Gómez-Valdés J, Villamil-Ramírez H, Hunemeier T, Ramallo V, Silva de Cerqueira CC, Hurtado M, Villegas V, Granja V, Gallo C, Poletti G, Schuler-Faccini L, Salzano FM, Bortolini M-C, Canizales-Quinteros S, Rothhammer F, Bedoya G, Calderón R, Rosique J, Cheeseman M, Bhutta MF, Humphries SE, Gonzalez-José R, Headon D, Balding D, Ruiz-Linares A. 2015. A genome-wide association study identifies multiple loci for variation in human ear morphology. *Nat Commun* 6:7500.
- Aksu M, Kaya D, Kocadereli I. 2010. Reliability of reference distances used in photogrammetry. *Angle Orthod* 80:482–9.
- Alibert P, Auffray JC. 2003. Genomic coadaptation, outbreeding depression, and developmental stability. In: Polak M, editor. *Developmental instability: causes and consequences*. Oxford: Oxford Univ. Press. p 116–134.
- Allenbach DM, Sullivan KB, Lydy MJ. 1999. Higher fluctuating asymmetry as a measure of susceptibility to pesticides in fishes. *Environ Toxicol Chem* 18:899–905.
- Alley, TR, Cunningham MR. 1991. Averaged Faces Are Attractive, but Very Attractive Faces Are Not Average. *Psychol Sci* 2:123–125.
- Alonso C. 2008. The molecular biology underlying developmental evolution. In: Minelli A, Fusco G, editors. *Evolving Pathways: Key Themes in Evolutionary Developmental Biology*. Cambridge, UK: Cambridge Univ Press. p 80–99.
- Anic-Milosevic S, Mestrovic S, Prlić A, Slaj M. 2010. Proportions in the upper lip-lower lip-chin area of the lower face as determined by photogrammetric method. *J Craniomaxillofac Surg* 38:90–5.
- Aparicio JM, Bonal R. 2002. Why do some traits show higher fluctuating asymmetry than others? A test of hypotheses with tail feathers of birds. *Heredity (Edinb)* 89:139–44.
- Arnqvist G, Martensson T. 1998. Measurement error in geometric morphometrics: empirical strategies to assess and reduce its impact on measures of shape. *Acta Zool Acad Sci Hungaricae* 44:73–96.
- Ashton K, Tracy M, Queiroz A. 2000. Is Bergmann’s Rule Valid for Mammals? *Am Nat* 156:390–415.

- Auffray JC, Debat V, Alibert P. 1999. Shape asymmetry and developmental stability. In: Chaplain MAJ, Singh GD, McLachlan JC, editors. *On Growth and Form: Spatio-Temporal Pattern Formation in Biology*. Chichester: Wiley. p 309–324.
- Azevedo J, Inchaust G, Sanfelice V. 2013. Decomposing the Recent Inequality Decline in Latin America. Policy Research working paper, no. WPS 6715. Washington, DC: World Bank Group.
- Babbitt GA. 2008. How accurate is the phenotype? An analysis of developmental noise in a cotton aphid clone. *BMC Dev Biol* 8:19.
- Badyaev A V, Foresman KR. 2004. Evolution of morphological integration. I. Functional units channel stress-induced variation in shrew mandibles. *Am Nat* 163:868–79.
- Badyaev A V. 2005. Stress-induced variation in evolution: from behavioural plasticity to genetic assimilation. *Proc Biol Sci* 272:877–86.
- Badyaev A V., Foresman KR, Fernandes M V. 2000. Stress and development stability: vegetation removal causes increased fluctuating asymmetry in shrews. *Ecology* 81:336–345.
- Bailit H, Workman P, Niswander J, Mac Lean C. 1970. Dental asymmetry as an indicator of genetic and environmental conditions in human populations. *Hum Biol* 42:626–638.
- Ballard ML. 1944. Asymmetry in Tooth Size: A Factor in the Etiology, Diagnosis and Treatment of Malocclusion. *Angle Orthod* 14:67–70.
- Banks GC, Batchelor JH, McDaniel MA. 2010. Smarter people are (a bit) more symmetrical: A meta-analysis of the relationship between intelligence and fluctuating asymmetry. *Intelligence* 38:393–401.
- Barber C, Dobkin D, Huhdanappa H. 1996. The quickhull algorithm for convex hulls. *ACM Trans Math Softw* 22:469–483.
- Barber N. 1995. The evolutionary psychology of physical attractiveness: Sexual selection and human morphology. *Ethol Sociobiol* 16:395–424.
- Barbujani G. 2000. Geographic patterns: how to identify them and why. *Hum Biol* 72:133–53.
- Barrett CK, Guatelli-Steinberg D, Sciulli PW. 2012. Revisiting dental fluctuating asymmetry in neandertals and modern humans. *Am J Phys Anthropol* 149:193–204.
- Bastir M, O'Higgins P, Rosas A, Higgins PO, Leo D. 2007. Facial ontogeny in Neanderthals and modern humans. *Proc R Soc B* 274:1125–1132.
- Bastir M, Rosas A, O'higgins P. 2006. Craniofacial levels and the morphological maturation of the human skull. *J Anat* 209:637–54.
- Bastir M, Rosas A. 2005. Hierarchical nature of morphological integration and modularity in the human posterior face. *Am J Phys Anthr* 128:26–34.
- Bastir M, Rosas A. 2008. Mosaic evolution of the basicranium in Homo and its relation to modular development. *Evol Biol* 36:57–70.
- Bastir M. 2008. A systems-model for the morphological analysis of integration and modularity in human craniofacial evolution. *J Anthropol Sci* 86:37–58.
- Bateson W. 1894. *Materials for the study of variation*. London: Macmillan & Company.
- Beacham TD. 1991. Developmental stability, heterozygosity, and genetic analysis of morphological variation in pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*). *Can J Zool* 69:274–278.
- Bechshøft TØ, Rigét FF, Wiig Ø, Sonne C. 2008. Fluctuating Asymmetry in Metric Traits; a Practical Example of Calculating Asymmetry, Measurement Error, and Repeatability. *Ann Zool Fennici* 45:32–38.

- Behjati S, Huch M, van Boxtel R, Karthaus W, Wedge DC, Tamuri AU, Martincorena I, Petljak M, Alexandrov LB, Gundem G, Tarpey PS, Roerink S, Blokker J, Maddison M, Mudie L, Robinson B, Nik-Zainal S, Campbell P, Goldman N, van de Wetering M, Cuppen E, Clevers H, Stratton MR. 2014. Genome sequencing of normal cells reveals developmental lineages and mutational processes. *Nature* 513:422–425.
- Benderlioglu Z, Dow E, Pyter LM. 2007. Neonatal exposure to short days and low temperatures blunts stress response and yields low fluctuating asymmetry in siberian hamsters. *Physiol Behav* 90:459–465.
- Bernal V, Perez SI, Gonzalez PN, Sardi ML, Pucciarelli M. 2010. Spatial patterns and evolutionary processes in southern South America: a study of dental morphometric variation. *Am J Phys Anthr* 104:95–104.
- Betti L, Balloux F, Hanihara T, Manica A. 2010. The relative role of drift and selection in shaping the human skull. *Am J Phys Anthr* 141:76–82.
- Biémont C. 1983. Homeostasis, enzymatic heterozygosity and inbreeding depression in natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetica* 61:179–189.
- Bigoni L, Krajčiček V, Sládek V, Velemínský P, Velemínská J. 2013. Skull shape asymmetry and the socioeconomic structure of an early medieval central European society. *Am J Phys Anthropol* 150:349–64.
- Bilissi E, Langford M. 2007. *Langford's Advanced Photography*. Burlington: Focal Press.
- Björklund M, Merilä J. 1997. Why some measures of fluctuating asymmetry are so sensitive to measurement error. *Ann Zool Fennici* 34:133–137.
- Bjorksten T, David P, Pomiankowski A, Fowler K. 2000. Fluctuating asymmetry of sexual and nonsexual traits in stalk-eyed flies: a poor indicator of developmental stress and genetic quality. *J Evol Biol* 13:89–97.
- Bjorksten T, Fowler K, Pomiankowski A. 2000. What does sexual trait FA tell us about stress? *Tree* 15:163–166.
- Blackith R, Reyment R. 1971. *Multivariate morphometrics*. London, UK: Academic Press.
- Bolker JA. 2000. Modularity in Development and Why It Matters to Evo-Devo. *Amer Zool* 40,:770–776.
- Bookstein FL. 1982. Foundations of Morphometrics. *Ann Rev Ecol Syst* 13:451–470.
- Bookstein FL. 1991. *Morphometric tools for landmark data*. Cambridge, Massachusetts, USA: Cambridge University Press.
- Bookstein FL. 1997. *Morphometric tools for landmark data*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Bookstein FL. 1998. A hundred years of morphometrics. *Acta Zool Acad Sci Hung* 44:7–59.
- Boothroyd LG, Perrett DI. 2006. Facial and bodily correlates of family background. *Proc R Soc London Ser B-Biological Sci* 273:2375–2380.
- Botwin MD, Buss DM, Shackelford T. 2006. Personality and mate preferences: Five factors in mate selection and marital selection. *J Pers* 65:107 – 136.
- Boyce WT. 2012. A Biology of Misfortune. *Focus (Madison)* 29:1–6.
- Bradshaw AD. 1965. *Advances in Genetics Volume 13*. Elsevier.
- Bräuer G. 2008. The origin of modern anatomy: By speciation or intraspecific evolution? *Evol Anthropol* 17:22–37.

- Braveman PA, Cubbin C, Egerter S, Chideya S, Marchi KS, Metzler M, Posner S. 2005. Socioeconomic status in health research: one size does not fit all. *JAMA* 294:2879–88.
- Breuker CJ, Debat V, Klingenberg CP. 2006. Functional evo-devo. *Trends Ecol Evol* 21:488–92.
- Britten HB. 1996. Meta-analyses of the association between multilocus heterozygosity and fitness. *Evolution* 50:2158–2164.
- Brown JB, Peterson L. 1946. Facial asymmetry and malocclusion from hyperplasia of the mandible correction by operation. *Plast Reconstr Surg* 1:284–7.
- Brown WM, Moore C. 2003. Fluctuating asymmetry and romantic jealousy. *Evol Hum Behav* 24:113–117.
- Bruce V, Young A. 1986. Understanding face recognition. *Br J Psychol* 77 (Pt 3):305–27.
- Burke PH. 1971. Stereophotogrammetric measurement of normal facial asymmetry in children. *Hum Biol* 43:536–48.
- Bush SF. 1930. Asymmetry and relative growth of parts in the two sexes of the hermit-crab, *eupagurus priedeauxi*. *Wilhelm Roux Arch Entwickl Mech Org* 123:39–79.
- Buss DM. 1996. La evolución del deseo: estrategias del emparejamiento humano. Madrid: Alianza.
- Buss DM. 1993. Sexual strategies theory: an evolutionary perspective on human mating. *Psychol Rev* 100:204–232.
- Carreira VP, Soto IM, Fanara JJ, Hasson E. 2008. A study of wing morphology and fluctuating asymmetry in interspecific hybrids between *Drosophila buzzatii* and *D. koepferae*. *Genet* 133:1–11.
- Carroll SP, Hendry AP, Reznick DN, Fox CW. 2007. Evolution on ecological time-scales. *Funct Ecol* 21:387–393.
- Cavalli-Sforza L, Menozzi P, Piazza A. 1994. *The History and Geography of Human Genes*. New Jersey: Princeton University Press.
- CELADE. 2010. Indicadores para el seguimiento Regional del programa de Accion de la CIRP. :1.
- Cerqueira CCS, Hünemeier T, Gomez-Valdés J, Ramallo V, Volasko-Krause CD, Barbosa AAL, Vargas-Pinilla P, Dornelles RC, Longo D, Rothhammer F, Bedoya G, Canizales-Quinteros S, Acuña-Alonzo V, Gallo C, Poletti G, González José R, Salzano FM, Callegari-Jacques SM, Schuler-Faccini L, Ruiz-Linares A, Cátira Bortolini M. 2014. Implications of the Admixture Process in Skin Color Molecular Assessment. *PLoS One* 9:e96886.
- Césarman E. 1997. *Termodinámica de la vida. Hombre y Entropía. Orden y Caos*. México, DF.: Gernika.
- Chakraborty R, Weiss KM. 1988. Admixture as a tool for finding linked genes and detecting that difference from allelic association between loci. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:9119–23.
- Chaurasia BD, Goswami HK. 1975. Functional asymmetry in the face. *Cells Tissues Organs* 91:154–160.
- Chebib FS, Chamma AM. 1981. Indices of craniofacial asymmetry. *Angle Orthod* 51:214–226.
- Chen E, Martin AD, Matthews KA. 2006. Socioeconomic status and health: do gradients differ within childhood and adolescence? *Soc Sci Med* 62:2161–70.
- Cheverud JM. 1995. Morphological integration in the saddle-back tamarin (*Saguinus fuscicollis*) cranium. *Am Nat* 145:63– 89.
- Cheverud JM. 1996. Developmental integration and the evolution of pleiotropy. *Am Zool* 36:44–50.

- Cheverud JM, Rutledge JJ, Atchley WR. 1983. Quantitative genetics of development: genetic correlations among age specific trait values and the evolution of ontogeny. *Evolution* 37:895–905.
- Cheverud JM. 1982. Relationships among ontogenetic, static, and evolutionary allometry. *Am J Phys Anthr* 59:139–149.
- Cheverud JM. 1984. Quantitative genetics and developmental constraints on evolution by selection. *J theor Biol* 110:155–171.
- Chhibber SR, Singh I. 1970. Asymmetry in muscle weight and one-sided dominance in the human lower limbs. *J Anat* 106:553–6.
- Chiari Y, Wang B, Rushmeier H, Caccone A. 2008. Using digital images to reconstruct three-dimensional biological forms: a new tool for morphological studies. *Biol J Linn Soc* 95:425–436.
- Claes P, Walters M, Shriver MD, Puts D, Gibson G, Clement J, Baynam G, Verbeke G, Vandermeulen D, Suetens P. 2012. Sexual dimorphism in multiple aspects of 3D facial symmetry and asymmetry defined by spatially dense geometric morphometrics. *J Anat* 221:97–114.
- Clarke GM. 1992. Fluctuating asymmetry: a technique for measuring developmental stress of genetic and environmental origin. *Acta Zool Fenn* 191:31–35.
- Clarke GM. 1993. Fluctuating asymmetry of invertebrate populations as a biological indicator of environmental quality. *Environ Pollut* 82:207–211.
- Clarke GM. 1994. The genetic basis of developmental stability. I. Relationships between stability, heterozygosity and genomic coadaptation. In: Markow TA, editor. *Developmental Instability: Its Origins and Evolutionary Implications*. Arizona: Kluwer Academic Publishers. p 17–25.
- Clarke GM. 1995. Relationships between fluctuating asymmetry and fitness: how good is the evidence? *Pacific Conserv Biol* 2:146.
- Clarke GM. 1998. Developmental stability and fitness: the evidence is not quite so clear. *Am Nat* 152:762–6.
- Clarke GM, Oldroyd BP. 1996. The genetic basis of developmental stability in *Apis mellifera* II. Relationships between character size, asymmetry and single-locus heterozygosity. *Genetica* 97:211–224.
- Coen E. 1999. *The art of genes: how organisms make themselves*. Oxford: Oxford University Press.
- Cole TM. 1996. Early anthropological contributions to “geometric morphometrics”. *Am J Phys Anthropol* 101:291–6.
- Conley D, Bennett NG. 2000. Is Biology Destiny? Birth Weight and Life Chances. *Am Sociol Rev* 65:458.
- Cordero DR, Brugmann S, Chu Y, Bajpai R, Jame M, Helms JA. 2011. Cranial neural crest cells on the move: their roles in craniofacial development. *Am J Med Genet A* 155A:270–9.
- Cox W. 1875. On the want of symmetry in the length of opposite sides of persons who have never been the subject of disease or injury to their lower extremities. *Am J Med Sci* 69:438–439.
- Cramon-Taubadel NV, Frazier BC, Lahr MM. 2007. The problem of assessing landmark error in geometric morphometrics: theory, methods, and modifications. *Am J Phys Anthr* 134:24–35.
- Cramon-Taubadel NV. 2009. Congruence of Individual Cranial Bone Morphology and Neutral Molecular Affinity Patterns in Modern Humans. *Am J Phys Anthr* 000.
- Cramon-Taubadel NV. 2009. Revisiting the homoiology hypothesis: the impact of phenotypic plasticity on the reconstruction of human population history from craniometric data. *J Hum Evol* 57:179–190.
- Crick F. 1966. *Of Molecules and Men*. Seattle, WA: University of Washington Press.

- Croizat L. 1964. *Space, Time, Form: The Biological Synthesis*. Caracas: Published by the author.
- D'Apuzzo N. 2002. Surface measurement and surface tracking of human body parts from multiimage video sequences. *ISPRS J Photogramm Remote Sens* 56:360–375.
- D'Arcy W. 1961. *On growth and form*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Darwin C. 1859. *On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life*. London: Murray.
- Darwin C. 1871. *The descent of man, and selection in relation to sex*. London: Murray.
- Darwin C. 1872. *The expression of the emotions in man and animals*. London: Murray.
- Davidson EH. 1993. Later embryogenesis: regulatory circuitry in morphogenetic fields. *Development* 118:665–90.
- De Azevedo S, Nocera A, Paschetta C, Castillo L, González M, González José R. 2011. Evaluating microevolutionary models for the early settlement of the New World: the importance of recurrent gene flow with Asia. *Am J Phys Anthropol* 146:539–52.
- Debat V, Alibert P, David P, Paradis E, Auffray JC. 2000. Independence between developmental stability and canalization in the skull of the house mouse. *Proc Biol Sci* 267:423–30.
- Debat V, David P. 2001. Mapping phenotypes: canalization, plasticity and developmental stability. *Trends Ecol Evol* 16:555–561.
- DeBruine LM, Jones BC, Little AC, Boothroyd LG, Perrett DI, Penton-Voak IS, Cooper PA, Penke L, Feinberg DR, Tiddeman BP. 2006. Correlated preferences for facial masculinity and ideal or actual partner's masculinity. *Proc Biol Sci* 273:1355–60.
- Decker P. 1974. The origin of molecular asymmetry through the amplification of “stochastic information” (noise) in bioids, open systems which can exist in several steady states. *J Mol Evol* 4:49–65.
- DeLeon VB, Richtsmeier JT. 2009. Fluctuating asymmetry and developmental instability in sagittal craniosynostosis. *Cleft Palate Craniofac J* 46:187–96.
- DeLeon VB. 2007. Fluctuating asymmetry and stress in a medieval Nubian population. *Am J Phys Anthropol* 132:520–34.
- Denevan W. 1992a. *The Native Population of the Americas in 1492*. Madison, WI: The University of Wisconsin Press.
- Denevan W. 1992b. The pristine myth: the landscape of the Americas in 1492. *Ann Assoc Am Geogr* 82:369–385.
- Denevan W. 2003. The native population of amazonia in 1942 reconsidered. *Rev Indias LXIII*:175–188.
- DiBennardo R, Bailit HL. 1978. Stress and dental asymmetry in a population of Japanese children. *Am J Phys Anthropol* 48:89–94.
- Diogo R, Wood B. 2013. The broader evolutionary lessons to be learned from a comparative and phylogenetic analysis of primate muscle morphology. *Biol Rev Camb Philos Soc* 88:988–1001.
- Djordjevic J, Pirttiniemi P, Harila V, Heikkinen T, Toma AM, Zhurov AI, Richmond S. 2013. Three-dimensional longitudinal assessment of facial symmetry in adolescents. *Eur J Orthod* 35:143–51.
- Doyle WJ, Johnston O. 1977. On the meaning of increased fluctuating dental asymmetry: a cross populational study. *Am J Phys Anthropol* 46:127–34.
- Dressino V, Lamas S. 2003. Teoría craneana funcional de Jakob Van Der Klaauw: una teoría sobre adaptacion morfológica. *Episteme* 16:99–110.

- Dryden I, Mardia K. 1998. *Statistical shape analysis*. Chichester. UK: John Wiley & Sons.
- Elis E, Ramankutty N. 2008. Putting people in the map: anthropogenic biomes of the world. *Front Ecol Environ* 6:439–447.
- Emlen JM, Freeman DC, Graham JH. 1993. Nonlinear growth dynamics and the origin of fluctuating asymmetry. *Genetica* 89:77–96.
- Enlow DH. 1990. *Facial growth*. Philadelphia: Saunders.
- Enlow DH. 1996. Growth of the mandible. In: Enlow DH, Hans M, editors. *Essentials of Facial Growth*. Philadelphia: Saunders. p 57–78.
- Eos-Systems. 2014. PhotoModeler. Available from: <http://www.photomodeler.com/>
- Ercan I, Ozdemir ST, Etoz A, Sigirli D, Tubbs RS, Loukas M, Guney I. 2008. Facial asymmetry in young healthy subjects evaluated by statistical shape analysis. *J Anat* 213:663–9.
- Escoufier Y. 1973. Le traitement des variables vectorielles. *Biometrics* 29:751–760.
- Eshel I, Matessi C. 1998. Canalization, genetic assimilation and preadaptation. A quantitative genetic model. *Genetics* 149:2119–33.
- Esteve-Altava B, Diogo R, Smith C, Boughner JC, Rasskin-Gutman D. 2015a. Anatomical networks reveal the musculoskeletal modularity of the human head. *Sci Rep* 5:8298.
- Esteve-Altava B, Marugán-Lobón J, Botella H, Bastir M, Rasskin-Gutman D. 2013. Grist for Riedl's mill: a network model perspective on the integration and modularity of the human skull. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 320:489–500.
- Esteve-Altava B, Rasskin-Gutman D. 2014. Beyond the functional matrix hypothesis: a network null model of human skull growth for the formation of bone articulations. *J Anat* 225:306–16.
- Evans GW, Kim P. 2007. Childhood poverty and health: cumulative risk exposure and stress dysregulation. *Psychol Sci* 18:953–7.
- Everitt B, Hothorn T. 2011. *An Introduction to Applied Multivariate Analysis with R*. New York: Springer.
- Fabra M, Demarchi DA. 2011. Geographic patterns of craniofacial variation in pre-Hispanic populations from the Southern Cone of South America. *Hum Biol* 83:491–507.
- Fagundes NJR, Kanitz R, Bonatto SL. 2008a. A reevaluation of the Native American mtDNA genome diversity and its bearing on the models of early colonization of Beringia. *PLoS One* 3:e3157.
- Fagundes NJR, Kanitz R, Eckert R, Valls ACS, Bogo MR, Salzano FM, Smith DG, Silva Jr. WA, Zago MA, Ribeiro-dos-Santos AK, Santos SEB, Petzl-Erler ML, Bonatto SL. 2008b. Mitochondrial population genomics Supports a single pre-Clovis origin with a coastal route for the peopling of the Americas. *J Hum Genet* 82:583–592.
- Falconer D, Mackay T. 1997. *Introduction to Quantitative Genetics*. Edimburgh: Longman.
- Farkas LG, Bryson W, Klotz J. 1980. Is photogrammetry of the face reliable? *Plast Reconstr Surg* 66:346–55.
- Farkas LG, Cheung G. 1981. Facial asymmetry in healthy North American Caucasians. An anthropometrical study. *Angle Orthod* 51:70–7.
- Farkas LG, Eiben OG, Sivkov S, Tompson B, Katic MJ, Forrest CR. 2004. Anthropometric measurements of the facial framework in adulthood: age-related changes in eight age categories in 600 healthy white North Americans of European ancestry from 16 to 90 years of age. *J Craniofac Surg* 15:288–98.

- Farkas LG, Katic MJ, Hreczko TA, Deutsch C, Munro IR. 1984. Anthropometric proportions in the upper lip-lower lip-chin area of the lower face in young white adults. *Am J Orthod* 86:52–60.
- Farrera A, Villanueva M, Quinto-Sánchez M, González José R. 2014. The relationship between facial shape asymmetry and attractiveness on mexican students. *Am J Hum Biol* in press.
- Farrera A. 2011. Evaluación de la asimetría facial mediante morfometría geométrica. Análisis de la simetría facial en una muestra de población mexicana. Tesis de Licenciatura. ENAH. México.
- Ferrario VF, Sforza C, Ciusa V, Dellavia C, Tartaglia GM. 2001. The effect of sex and age on facial asymmetry in healthy subjects: a cross-sectional study from adolescence to mid-adulthood. *J Oral Maxillofac Surg* 59:382–8.
- Ferrario VF, Sforza C, Miani A, Serrao G. 1995. A three-dimensional evaluation of human facial asymmetry. *J Anat* 186:103–10.
- Fields SJ, Spiers M, Hershkovitz I, Livshits G. 1995. Reliability of reliability coefficients in the estimation of asymmetry. *Am J Phys Anthropol* 96:83–7.
- Fink B, Neave N, Manning JT, Grammer K. 2005. Facial symmetry and the “big-five” personality factors. *Pers Individ Dif* 39:523–529.
- Fink B, Penton-Voak I. 2002. Evolutionary Psychology of Facial Attractiveness. *Curr Dir Psychol Sci* 11:154–158.
- Floate KD, Fox AS. 2000. Flies under stress: a test of fluctuating asymmetry as biomonitor of environmental quality. *Ecol Appl* 10:1541–1550.
- Furlow B, Gangestad SW, Armijo-Prewitt T. 1998. Developmental stability and human violence. *Proc Biol Sci* 265:1–6.
- Galantucci LM, Percoco G, Dal Maso U. 2008. Coded targets and hybrid grids for photogrammetric 3D digitisation of human faces. *Virtual Phys Prototyp* 3:167–176.
- Gangestad SW, Bennett KL, Thornhill R. 2001. A latent variable model of developmental instability in relation to men’s sexual behaviour. *Proc Biol Sci* 268:1677–84.
- Gangestad SW, Merriman LA, Emery Thompson M. 2010. Men’s oxidative stress, fluctuating asymmetry and physical attractiveness. *Anim Behav* 80:1005–1013.
- Gangestad SW, Simpson JA. 2000. The evolution of human mating: trade-offs and strategic pluralism. *Behav Brain Sci* 23:573–87; discussion 587–644.
- Gangestad SW, Thornhill R, Garver-Apgar CE. 2005. Women’s sexual interests across the ovulatory cycle depend on primary partner developmental instability. *Proc Biol Sci* 272:2023–2027.
- Gangestad SW, Thornhill R, Yeo RA. 1994. Facial attractiveness, developmental stability and fluctuating asymmetry. *Ethol Sociobiol* 15:73–85.
- Gangestad SW, Thornhill R. 2003. Facial masculinity and fluctuating asymmetry. *Evol Hum Behav* 24:231–241.
- Gatherer D. 2010. So what do we really mean when we say that systems biology is holistic? *BMC Syst Biol* 4:22.
- Gawlikowska A, Szczurowski J, Czerwiński F, Miklaszewska D, Adamiec E, Dzieciolowska E. 2007. The fluctuating asymmetry of medieval and modern human skulls. *Homo* 58:159–72.
- Ghalambor CK, McKay JK, Carroll SP, Reznick DN. 2007. Adaptive versus non-adaptive phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environments. *Funct Ecol* 21:394–407.

- Gibson G, Wagner G. 2000. Canalization in evolutionary genetics: a stabilizing theory? *Bioessays* 22:372–80.
- Gilbert SF. 2005. *Developmental biology*. Sunderland, MA: Sinauer.
- Gilbert SF, Opitz JM, Raff RA. 1996. Resynthesizing evolutionary and developmental biology. *Dev Biol* 173:357–72.
- Gilligan DM, Woodworth LM, Montgomery ME, Nurthen RK, Briscoe DA, Frankham R. 2000. Can fluctuating asymmetry be used to detect inbreeding and loss of genetic diversity in endangered populations? *Anim Conserv* 3:97–104.
- Gjuvsland AB, Wang Y, Plahte E, Omholt SW. 2013. Monotonicity is a key feature of genotype-phenotype maps. *Front Genet* 4:216.
- Gomarasca M. 2009. *Basics of Geomatics*. Dordrecht: Springer Science & Business Media.
- Gómez-Valdés J, Hünemeier T, Quinto-Sánchez M, Paschetta C, de Azevedo S, González MF, Martínez-Abadías N, Esparza M, Pucciarelli HM, Salzano FM, Bau CHD, Bortolini MC, González-José R. 2013. Lack of support for the association between facial shape and aggression: a reappraisal based on a worldwide population genetics perspective. *PLoS One* 8:e52317.
- Gonzalez PN, Oyhenart EE, Hallgrímsson B. 2011. Effects of environmental perturbations during postnatal development on the phenotypic integration of the skull. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 316:547–61.
- Gonzalez PN, Hallgrímsson B, Oyhenart EE. 2011a. Developmental plasticity in covariance structure of the skull: effects of prenatal stress. *J Anat* 218:243–57.
- González José R, Bortolini MC, Santos FR, Bonatto SL. 2008. The peopling of America: craniofacial shape variation on a continental scale and its interpretation from an interdisciplinary view. *Am J Phys Anthropol* 137:175–187.
- González José R, Dahinten S, Hernández M. 2001. The settlement of Patagonia: a matrix correlation study. *Hum Biol an Int Rec Res*.
- González José R, Martínez-Abadías N, González-Martín A, Bautista-Martínez J, Gómez-Valdés J, Quinto M, Hernández M. 2007. Detection of a population replacement at the Classic-Postclassic transition in Mexico. *Proc Biol Sci* 274:681–8.
- González José R, Van der Molen S, González-Pérez E, Hernandez M. 2004. Patterns of phenotypic covariation and correlation in modern humans as viewed from morphological integration. *Am J Phys Anthropol* 123:69–77.
- González José R, Martínez-Abadías N, Van der Molen S, García-Moro C, Dahinten S, Hernández M. 2004a. Hipótesis acerca del poblamiento de Tierra del Fuego-Patagonia a partir del análisis genético-poblacional de la variación craneofacial. *Magallania (Punta Arenas)* 32:79–98.
- Goodall C. 1991. Procrustes Methods in the Statistical Analysis of Shape. *J R Stat Soc Ser B* 53:285–339.
- Goodrich JT. 2005. Skull base growth in craniosynostosis. *Childs Nerv Syst* 21:871–9.
- Goswami A, Binder WJ, Meachen J, O’Keefe FR. 2015. The fossil record of phenotypic integration and modularity: A deep-time perspective on developmental and evolutionary dynamics. *Proc Natl Acad Sci* 112:4891–4896.
- Gould SJ, Lewontin R. 1979. The spandrels of San Marco and the Panglossian paradigm: critique of the adaptationist programme. *Proc R Soc L B* 205:581–598.
- Gould SJ. 2003. *La falsa medida del hombre*. Barcelona: Crítica.
- Gower JC. 1975. Generalized procrustes analysis. *Psychometrika* 40:33–51.

- Graham JH, Freeman DC, Emlen JM. 1993. Antisymmetry, directional asymmetry, and dynamic morphogenesis. *Genetica* 89:121–137.
- Grammer K, Thornhill R. 1994. Human (*Homo sapiens*) facial attractiveness and sexual selection: the role of symmetry and averageness. *J Comp Psychol* 108:233–42.
- Gray PB, Marlowe F. 2009. Fluctuating asymmetry of a foraging population: the Hadza of Tanzania. *Ann Hum Biol* 29:495–501.
- Greene DL. 1931. Asymmetry of the head and face in infants and in children. *Arch Pediatr Adolesc Med* 41:1317.
- Greene DL. 1984. Fluctuating dental asymmetry and measurement error. *Am J Phys Anthropol* 65:283–9.
- Groves C, Humphrey N. 1973. Asymmetry in Gorilla Skulls: Evidence of Lateralized Brain Function? *Nature* 244:53–54.
- Guyot L, Dubuc M, Richard O, Philip N, Dutour O. 2003. Comparison between direct clinical and digital photogrammetric measurements in patients with 22q11 microdeletion. *Int J Oral Maxillofac Surg* 32:246–52.
- Habel JC, Engler JO, Rödder D, Schmitt T. 2012. Contrasting genetic and morphologic responses on recent population decline in two burnet moths (*Lepidoptera*, *Zygaenidae*). *Conserv Genet* 13:1293–1304.
- Habel JC, Reuter M, Drees C, Pfaender J. 2011. Does isolation affect phenotypic variability and fluctuating asymmetry in the endangered Red Apollo? *J Insect Conserv* 16:571–579.
- Hackett BP. 2002. Formation and malformation of the vertebrate left-right axis. *Curr Mol Med* 2:39–66.
- Haldane J. 1940. The Blood-Group Frequencies of European Peoples, and Racial Origins. *Hum Biol* 12:457–480.
- Hall B. 1999. *Evolutionary Developmental Biology*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer.
- Hallgrímsson B, Jamniczky H, Young NM, Rolian C, Parsons TE, Boughner JC, Marcucio RS. 2009. Deciphering the Palimpsest: Studying the Relationship Between Morphological Integration and Phenotypic Covariation. *Evol Biol* 36:355–376.
- Hallgrímsson B, Lieberman DE, Young NM, Parsons T, Wat S. 2007. Evolution of covariance in the mammalian skull. *Tinkering microevolution Dev*:164–190.
- Hallgrímsson B. 1999. Ontogenetic Patterning of Skeletal Fluctuating Asymmetry in Rhesus Macaques and Humans: Evolutionary and Developmental Implications. *Int J Primatol* 20:121–151.
- Halperin G. 1931. Normal asymmetry and unilateral hypertrophy. *Arch Intern Med* 48:676.
- Hamilton M. 2009. *Population genetics*. Chichester: Wiley-Blackwell.
- Hancock PJB, Bruce V, Burton AM. 2000. Recognition of unfamiliar faces. *Trends Cogn Sci* 4:330–337.
- Hansen TF. 2003. Is modularity necessary for evolvability? Remarks on the relationship between pleiotropy and evolvability. *BioSystems* 69:83–94.
- Hansen TF. 2006. The Evolution of Genetic Architecture. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 37:123–157.
- Hansen TF, Pélabon C, Houle D. 2011. Heritability is not Evolvability. *Evol Biol (New York)* 38:258–277.
- Hardman J. 1939. Asymmetry of the Skull in Relation to Subdural Collections of Fluid. *Br J Radiol* 12:455–461.

- Harris EF, Nweeia MT. 1980. Dental asymmetry as a measure of environmental stress in the Ticuna Indians of Colombia. *Am J Phys Anthropol* 53:133–42.
- Hartl GB, Suchentrunk F, Willing R, Petznek R. 1995. Allozyme Heterozygosity and Fluctuating Asymmetry in the Brown Hare (*Lepus europaeus*): A Test of the Developmental Homeostasis Hypothesis. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 350:313–323.
- Harvati K, Weaver TD. 2006. Human cranial anatomy and the differential preservation of population history and climate signatures. *Anat Rec* 288:1225–1233.
- Hendrickx F, Maelfait JP, Lens L. 2003. Relationship between fluctuating asymmetry and fitness within and between stressed and unstressed populations of the wolf spider *Pirata piraticus*. *J Evol Biol* 16:1270–9.
- Hennessy RJ, Lane A, Kinsella A, Larkin C, Callaghan EO, Waddington JL, O’Callaghan E. 2004. 3D morphometrics of craniofacial dysmorphology reveals sex-specific asymmetries in schizophrenia. *Schizophr Res* 67:261–268.
- Henrich J, Boyd R, Richerson PJ. 2012. The puzzle of monogamous marriage. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 367:657–69.
- Hermisson J, Hansen TF, Wagner GP. 2003. Epistasis in polygenic traits and the evolution of genetic architecture under stabilizing selection. *Am Nat* 161:708–734.
- Hermisson J, Wagner GP. 2004. The population genetic theory of hidden variation and genetic robustness. *Genetics* 168:2271–2284.
- Heyer E, Tremblay M, Desjardins B. 1997. Seventeenth-century European origins of hereditary diseases in the Saguenay population (Quebec, Canada). *Hum Biol* 69:209–25.
- Hill WG, Zhang X-S. 2012. On the pleiotropic structure of the genotype-phenotype map and the evolvability of complex organisms. *Genetics* 190:1131–7.
- Hirokawa N, Tanaka Y, Okada Y, Takeda S. 2006. Nodal flow and the generation of left-right asymmetry. *Cell* 125:33–45.
- Hoadley M, Pearson K. 1929. On measurement of the internal diameters of the skull in relation: (I) to the prediction of its capacity, (II) to the “pre-eminence” of the left hemisphere. *Biometrika* 21:85–123.
- Hope D, Bates T, Penke L, Gow AJ, Starr JM, Deary IJ. 2013. Symmetry of the face in old age reflects childhood social status. *Econ Hum Biol* 11:236–44.
- Houle D. 2000. A simple model of the relationship between asymmetry and developmental stability. *J Evol Biol* 13:720–730.
- Howells WW. 1989. *Skull Shapes and the Map: Craniometric Analyses in the Dispersion of Modern Homo*. Cambridge, MA: Papers of the Peabody Museum of Archaeology and Ethnology.
- Howells WW. 1995. *Who’s Who in Skulls: Ethnic Identification of Crania from Measurements*. Cambridge, MA: Papers of the Peabody Museum of Archaeology and Ethnology.
- Hubbe M, Hanihara T, Harvati K. 2009. Climate signatures in the morphological differentiation of worldwide modern human populations. *Anat Rec A* 292:1720–1733.
- Hugenberg K, Bodenhausen G V. 2003. Facing prejudice: implicit prejudice and the perception of facial threat. *Psychol Sci* 14:640–3.
- Humphry. 1870. A case of asymmetry of the two halves of the body. *J Anat Physiol* 4:226–9.
- Hünemeier T, Gómez-Valdés J, De Azevedo S, Quinto-Sánchez M, Passaglia L, Salzano FM, Sánchez-Mejorada G, Alonzo VA, Martínez-Abadías N, Bortolini M-C, González José R. 2014. FGFR1 signaling is associated with the magnitude of morphological integration in human head shape. *Am J Hum Biol* 26:164–75.

- Hunt J, Bussière LF, Jennions MD, Brooks R. 2004. What is genetic quality? *Trends Ecol Evol* 19:329–33.
- Huxley JS. 1932. *Problems of relative growth*. New York.: Lincoln Mac Veagh—The Dial Press,.
- IUPAC. 1997. *Compendium of chemical terminology*. Oxford, UK: Blackwell Scientific.
- Jardine N. 1969. The observational and theoretical components of homology: a study based on the morphology of the dermal skull-roofs of rhipistidian fishes. *J Linn Soc* 1:327–349.
- Jennions MD, Møller AP, Petrie M. 2001. Sexually selected traits and adult survival: a meta-analysis. *Q Rev Biol* 76:3–36.
- Jones BC, Little AC, Penton-Voak IS, Tiddeman BP, Burt DM, Perrett DI. 2001. Facial symmetry and judgements of apparent health: Support for a 'good genes' explanation of the attractiveness-symmetry relationship. *Evol Hum Behav* 22:417–429.
- Jones D. 1996. An evolutionary perspective on physical attractiveness. *Evol Anthropol* 5:97–109.
- Jones JS. 1987. An asymmetrical view of fitness. *Nature* 325:298–299.
- Kahn DM, Shaw RB. 2010. Overview of current thoughts on facial volume and aging. *Facial Plast Surg* 26:350–5.
- Kark S, Safriel UN, Tabarroni C, Randi E. 2001. Relationship between heterozygosity and asymmetry: a test across the distribution range. *Heredity (Edinb)* 86:119–27.
- Kellner JR, Alford RA. 2003. The Ontogeny of Fluctuating Asymmetry. *Am Nat* 161:931–947.
- Kent JT, Mardia K V. 2001. Shape, Procrustes tangent projections and bilateral symmetry. *Biometrika* 88:469–485.
- Kidder J, Jantz RL, Smith F. 1992. Defining modern humans: A multivariate approach. In: *Continuity or Replacement: Con- troversies in Homo sapiens Evolution*. Rotterdam: A. A. Balkema. p 157–77.
- Kirkpatrick M, Barton NH. 1997. Evolution of a species' range. *Am. Nat.* 150 : 1–23.
- Kirschner M, Gerhart J. 1998. Evolvability. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:8420–8427.
- Klimentidis YC, Shriver MD. 2009. Estimating genetic ancestry proportions from faces. *PLoS One* 4:e4460.
- Klingenberg CP. 2003a. Developmental instability as a research tool: using patterns of fluctuating asymmetry to infer the developmental origins of morphological integration. In: Polak M, editor. *Developmental instability: causes and consequences*. New York: Oxford University Press. p 427–442.
- Klingenberg CP. 2003b. A developmental perspective on developmental instability: Theory, models and mechanisms. In: Polak M, editor. *Developmental instability: causes and consequences*. New York: Oxford University Press. p 14–34.
- Klingenberg CP. 2004. Dominance, nonlinear developmental mapping and developmental stability. In: Veitia R., editor. *The Biology of Genetic Dominance*. Austin, TX: Landes Bioscience. p 37–51.
- Klingenberg CP. 2005. Developmental constraints, modules and evolvability. In: *Variation: A Central Concept in Biology*. Burlington, MA: Elsevier. p 219–247.
- Klingenberg CP. 2015. Analyzing fluctuating asymmetry with geometric morphometrics: concepts, methods, and applications. *Symmetry (Basel)* 7:843–934.
- Klingenberg CP, Badyaev A V, Sowry SM, Beckwith NJ. 2001. Inferring Developmental Modularity from Morphological Integration : Analysis of Individual Variation and Asymmetry in Bumblebee Wings. *Am Nat* 157.

- Klingenberg CP, Barluenga M, Meyer A. 2002. Shape analysis of symmetric structures: quantifying variation among individuals and asymmetry. *Evolution* (N Y) 56:1909–1920.
- Klingenberg CP, Duttke S, Whelan S, Kim M. 2012. Developmental plasticity, morphological variation and evolvability: A multilevel analysis of morphometric integration in the shape of compound leaves. *J Evol Biol* 25:115–129.
- Klingenberg CP, Leamy LJ, Cheverud JM. 2004. Integration and modularity of quantitative trait locus effects on geometric shape in the mouse mandible. *Genetics* 166:1909–1921.
- Klingenberg CP, Leamy LJ. 2001. Quantitative genetics of geometric shape in the mouse mandible. *Evolution* 55:2342–2352.
- Klingenberg CP, McIntyre GS, Zaklan SD. 1998a. Left \pm right asymmetry of \bar{y} wings and the evolution of body axes. *Proc R Soc London Ser B-Biological Sci* 1998:1255–1259.
- Klingenberg CP, McIntyre GS. 1998b. Geometric morphometrics of developmental instability: Analyzing patterns of fluctuating asymmetry with Procrustes methods. *Evolution* (N Y) 52:1363–1375.
- Klingenberg CP, Mebus K, Auffray JC. 2003. Developmental integration in a complex morphological structure: how distinct are the modules in the mouse mandible? *Evol Dev* 5:522–531.
- Klingenberg CP, Nijhout HF. 1999. Genetics of fluctuating asymmetry: A developmental model of developmental instability. *Evolution* (N Y) 53:358–375.
- Klingenberg CP, Polak M. 2003. Developmental instability as a research tool: using patterns of fluctuating asymmetry to infer the developmental origins of morphological integration. In: *Developmental instability: causes and consequences*. New York: Oxford University Press. p 427–442.
- Klingenberg CP, Wetherill L, Rogers J, Moore E, Ward R, Autti-Rämö I, Fagerlund A, Jacobson SW, Robinson LK, Hoyme HE, Mattson SN, Li TK, Riley EP, Foroud T. 2010. Prenatal alcohol exposure alters the patterns of facial asymmetry. *Alcohol* 44:649–57.
- Klingenberg CP, Zaklan SD. 2000. Morphological intergration between development compartments in the *Drosophila* wing. *Evolution* (N Y) 54:1273–1285.
- Klingenberg CP. 2004b. Integration, modules, and development: molecules to morphology to evolution. In: Pigliucci M, Preston K, editors. *Phenotypic integration: studying the ecology and evolution of complex phenotypes*. New York: Oxford University Press. p 213–230.
- Klingenberg CP. 2008. Morphological Integration and Developmental Modularity. *Ann Rev Ecol Syst* 39:115–132.
- Klingenberg CP. 2009. Morphometric integration and modularity in configurations of landmarks: tools for evaluating a priori hypotheses. *Evol Dev* 11:405–421.
- Klingenberg CP. 2011. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Mol Ecol Resour* 11:353–357.
- Koehler N, Simmons LW, Rhodes G, Brown M. 2004. The relationship between sexual dimorphism in human faces and fluctuating asymmetry. *Proc Biol Sci* 271 Suppl:S233–6.
- Kokko H, Brooks R, Jennions MD, Morley J. 2003 The evolution of mate choice and mating biases *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 270 653–664
- Konigsberg L. 2000. Quantitative variation and genetics. In: Stinson S, Bogin B, Huss-Ashmore R, O'Rourke D, editors. *Human biology: an evolutionary and biocultural perspective*. New York: Wiley-Liss. p 135–162.
- Kraus K. 2007. *Photogrammetry: Geometry from Images and Laser Scans*. Berlin: Walter de Gruyter.
- Krogman W, Iscan MY. 1986. *Human skeleton in forensic medicine*. Charles C Thomas Pub Ltd.

- Kurzban R, Leary MR. 2005. HurryDate: Mate preferences in action. *Evol Hum Behav* 26:227–244.
- Lahr MM, Wright RVS. 1996. The question of robusticity and the relationship between cranial size and shape in *Homo sapiens*. *J Hum Evol* 31:157–91.
- Lahr MM. 1996. *The Evolution of Modern Human Diversity: A Study of Cranial Variation*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Lam Y, Pearson O, Smith C. 1996. Chin morphology and sexual dimorphism in the fossil hominid mandible sample from Klasies River Mouth. *Am J Phys Anthropol* 100:545–57.
- Lande R, Arnold S. 1983. The measurement of selection on correlated characters. *Evolution (N Y)* 37:1210–1226.
- Lande R. 1979. Quantitative genetic analysis of multivariate evolution, applied to brain: body size allometry. *Evolution (N Y)* 33:402–416.
- Langlois JH, Roggman LA. 1990. Attractive Faces Are Only Average. *Psychol Sci* 1:115–121.
- Langlois JH, Roggman LA, Mori A, Musselman L. 1994. What Is Average and What Is Not Average about Attractive Faces? *Psychol Sci* 5:214–220.
- Larrabee W, Makielski K, Henderson J. 2004. Variations in facial anatomy with race, sex, and age. In: Larrabee WF, Makielski K, Henderson J, editors. *Surgical anatomy of the face*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. p 22–28.
- Latarjet M, Ruiz Liard A. 2008. *Anatomía humana*. Buenos Aires: Medica Panamericana.
- Latimer HB, Lowrance EW. 1965. Bilateral asymmetry in weight and in length of human bones. *Anat Rec* 152:217–224.
- Lazić M, Carretero MA, Crnobrnja-Isailović J, Kaliontzopoulou A. 2015. Effects of environmental disturbance on phenotypic variation: An integrated assessment of canalization, developmental stability, modularity, and allometry in lizard head shape. *Am Nat* 185:44–58.
- Lazić MM, Kaliontzopoulou A, Carretero MA, Crnobrnja-Isailović J. 2013. Lizards from urban areas are more asymmetric: using fluctuating asymmetry to evaluate environmental disturbance. *PLoS One* 8:e84190.
- Le Gros Clark W. 1934. The Asymmetry of the Occipital Region of the Brain and Skull. *Man* 34:35–37.
- Leamy LJ, Atchley W. 1985. Directional selection and developmental stability: evidence from fluctuating asymmetry of morphometric characters in rats. *Growth* 49:8–18.
- Leamy LJ, Pomp D, Eisen E, Cheverud JM. 2000. Quantitative trait loci for directional but not fluctuating asymmetry of mandible characters in mice. *Genet Res* 76:27–40.
- Leamy LJ, Routman E, Cheverud JM. 1997. A Search for Quantitative Trait Loci Affecting Asymmetry of Mandibular Characters in Mice. *Evolution (N Y)* 51:957–969.
- Leamy LJ. 1984. Morphometric Studies in Inbred and Hybrid House Mice. V. Directional and Fluctuating Asymmetry. *Am Nat* 123:579–593.
- Leamy LJ, Klingenberg CP. 2005. The Genetics and Evolution of Fluctuating Asymmetry. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 36:1–21.
- Leamy LJ, Meagher S, Taylor S, Carroll L, Potts WK. 2001. Size and fluctuating asymmetry of morphometric characters in mice: their associations with inbreeding and t-haplotype. *Evolution* 55:2333–41.
- Leamy LJ, Routman EJ, Cheverud JM. 1998. Quantitative trait loci for fluctuating asymmetry of discrete skeletal characters in mice. *Heredity (Edinb)* 80:509–18.

- Leamy LJ, Routman EJ, Cheverud JM. 1999. Quantitative Trait Loci for Early- and Late-Developing Skull Characters in Mice: A Test of the Genetic Independence Model of Morphological Integration. *Am Nat* 153:201–214.
- Leamy LJ. 1999. Heritability of directional and fluctuating asymmetry for mandibular characters in random-bred mice. *J Evol Biol* 12:146–155.
- Leamy LJ. 2003. Dominance, epistasis, and fluctuating asymmetry. In: Polak M, editor. *Developmental Instability: Causes and Consequences*. New York: Oxford University Press. p 1–21.
- Leary RF, Allendorf F, Knudsen K. 1984. Superior developmental stability of heterozygotes at enzyme loci in salmonid fishes. *Am Nat* 124:540–551.
- Leary RF, Allendorf F, Knudsen K. 1984. Superior developmental stability of heterozygotes at enzyme loci in salmonid fishes. *Am Nat* 124:540–551.
- Leary RF, Allendorf FW. 1989. Fluctuating asymmetry as an indicator of stress: Implications for conservation biology. *Trends Ecol Evol* 4:214–7.
- Lele R, Richtsmeier JT. 2001. *An Invariant Approach to Statistical Analysis of Shapes*. Boca Raton, Florida: Chapman & Hall/CRS.
- Lens L, Van Dongen S, Kark S, Matthysen E. 2002. Fluctuating asymmetry as an indicator of fitness: can we bridge the gap between studies? *Biol Rev Camb Philos Soc* 77:27–38.
- Lens L, Van Dongen S, Matthysen E. 2002b. Fluctuating Asymmetry as an Early Warning System in the Critically Endangered Taita Thrush. *Conserv Biol* 16:479–487.
- Lens L, Van Dongen S. 2008. Fluctuating and directional asymmetry in natural bird populations exposed to different levels of habitat disturbance, as revealed by mixture analysis. *Ecol Lett* 3:516–522.
- Letzer G, Kronman J. 1967. A posteroanterior cephalometric evaluation of craniofacial asymmetry. *Angle Orthod* 37:205–211.
- Leung B, Forbes M. 1997. Modelling fluctuating asymmetry in relation to stress and fitness. *Oikos* 78:397–405.
- Leung B, Forbes MR, Houle D. 2000. Fluctuating asymmetry as a bioindicator of stress: Comparing efficacy of analyses involving multiple traits. *Am Nat* 155:101–115.
- Levin M. 2005. Left-right asymmetry in embryonic development: a comprehensive review. *Mech Dev* 122:3–25.
- Levine RA, Garza JR, Wang PTH, Hurst CL, Dev VR. 2003. Adult facial growth: applications to aesthetic surgery. *Aesthetic Plast Surg* 27:265–8.
- Lewontin R. 1972. The apportionment of human diversity. *Evol Biol* 6:391–98.
- Lezcano AH, Rojas Quiroga ML, Liberoff AL, van der Molen S. 2015. Marine pollution effects on the southern surf crab *Ovalipes trimaculatus* (Crustacea: Brachyura: Polybiidae) in Patagonia Argentina. *Mar Pollut Bull* 91:524–529.
- Li NP, Bailey JM, Kenrick DT, Linsenmeier JAW. 2002. The necessities and luxuries of mate preferences: Testing the tradeoffs. *J Pers Soc Psychol* 82:947–955.
- Lieberman DE. 1998. Sphenoid shortening and the evolution of modern human cranial shape. *Nature* 393:158–162.
- Lieberman DE. 2011. *The evolution of the human head*. The Belkna. Cambridge: The Belknap Press of Harvard University Press.

- Lieberman DE, Pearson OM, Mowbray KM. 2000. Basicranial influence on overall cranial shape. *J Hum Evol* 38:291–315.
- Lieberman DE, Ross CF, Ravosa MJ. 2000b. The primate cranial base: ontogeny, function, and integration. *Am J Phys Anthr Suppl* 31:117–169.
- Liebreich R. 1908. *Die Asymmetrie des Gesichtes und ihre Entstehung*. J. F. Bergmann.
- Limon E, Ortiz F, Stara M. 1988. Strabismus in plagiocephaly. *Arch J Pediatr Ophtalmol strabismus* 25:180–190.
- Linder W. 2009. *Digital Photogrammetry A Practical Course*. Berlin Heidelberg: Springer.
- Little AC, Apicella CL, Marlowe FW. 2007. Preferences for symmetry in human faces in two cultures: data from the UK and the Hadza, an isolated group of hunter-gatherers. *Proc Biol Sci* 274:3113–7.
- Little AC, Burt DM, Penton-Voak IS, Perrett DI. 2001. Self-perceived attractiveness influences human female preferences for sexual dimorphism and symmetry in male faces. *Proc R Soc* 268:39–44.
- Little AC, Jones BC, Penton-Voak IS, Burt DM, Perret DI. 2002. Partnership status and the temporal context of relationships influence human female preferences for sexual dimorphism in male face shape. *Proc R Soc* 269:1095–1100.
- Little AC, Jones BC. 2003. Evidence against perceptual bias views for symmetry preferences in human faces. *Proc Biol Sci* 270:1759–63.
- Little AC, Paukner A, Woodward RA, Suomi SJ. 2012. Facial asymmetry is negatively related to condition in female macaque monkeys. *Behav Ecol Sociobiol* 66:1311–1318.
- Liu F, van der Lijn F, Schurmann C, Zhu G, Chakravarty MM, Hysi PG, Wollstein A, Lao O, de Bruijne M, Ikram MA, van der Lugt A, Rivadeneira F, Uitterlinden AG, Hofman A, Niessen WJ, Homuth G, de Zubicaray G, McMahon KL, Thompson PM, Daboul A, Puls R, Hegenscheid K, Bevan L, Pausova Z, Medland SE, Montgomery GW, Wright MJ, Wicking C, Boehringer S, Spector TD, Paus T, Martin NG, Biffar R, Kayser M. 2012. A genome-wide association study identifies five loci influencing facial morphology in Europeans. *PLoS Genet* 8:e1002932.
- Livshits G, Kobylansky E. 1985. Lerner's concept of developmental homeostasis and the problem of heterozygosity level in natural populations. *Heredity (Edinb)* 55 (Pt 3):341–53.
- Livshits G, Kobylansky E. 1991. Fluctuating asymmetry as a possible measure of developmental homeostasis in humans: a review. *Hum Biol* 63:441–66.
- Livshits G, Smouse PE. 1993. Relationship between fluctuating asymmetry, morphological modality and heterozygosity in an elderly Israeli population. *Genetica* 89:155–166.
- Lizcano F. 2005. Composición étnica de las tres áreas culturales del continente americano al comienzo del Siglo XXI. *Convergencia*:185–232.
- Llamosa L, Contreras L, Arbelaez M. 2007. Estudio de repetibilidad y reproducibilidad utilizando el método de promedios y rangos para el aseguramiento de la calidad de los resultados de calibración de acuerdo con la norma técnica NTC-ISO/IEC 17025. *Sci Tech XIII*:455–460.
- Lotto FP, Gonzalez PN. 2014. Inestabilidad del desarrollo en estructuras cráneo-faciales de poblaciones humanas sudamericanas. *Rev Argentina Antropol Biológica* 16:17–29.
- Lougheed S, Arnold T, Bailey R. 1991. Measurement error of external and skeletal variables in birds and its effect on principal components. *Auk* 108:432–436.
- Lu KH. 1966. An orthogonal analysis of the form, symmetry and asymmetry of the dental arch. *Arch Oral Biol* 11:1057–1069.
- Ludwig W. 1932. *Das Rechts-Links-Problem im Tierreich und beim Menschen*. Berlin, Heidelberg.

- Luke B, Williams C, Minogue J, Keith L. 1993. The changing pattern of infant mortality in the US: the role of prenatal factors and their obstetrical implications. *Int J Gynaecol Obstet* 40:199–212.
- Lundström A. 1961. Some asymmetries of the dental arches, jaws, and skull, and their etiological significance. *Am J Orthod* 47:81–106.
- Luxen MF, Van De Vijver FJR. 2006. Facial attractiveness, sexual selection, and personnel selection: when evolved preferences matter. *J Organ Behav* 27:241–255.
- Lynch M, Walsh B. 1998. *Genetics and Analysis of Quantitative Traits*. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Lynnerup N, Andersen M, Lauritsen HP. 2003. Facial image identification using Photomodeler. *Leg Med (Tokyo)* 5:156–60.
- MacLeod N. 2002. Geometric morphometrics and geological shape-classification systems. *Earth-Sci Rev* 59:27–47.
- Maestri R, Fornel R, Galiano D, DeFreitas TRO. 2015. Niche suitability affects development: skull asymmetry increases in less suitable areas. *PLoS One* 10:e0122412.
- Malécot G. 1959. Les modèles stochastiques en génétique de population. *Publ L'Institut Stat l'Université Paris* 8:173–210.
- Manning JT, Koukoulakis K, Brodie DA. 1997. Fluctuating asymmetry, metabolic rate and sexual selection in human males. *Evol Hum Behav* 18:15–21.
- Manning JT. 1995. Fluctuating asymmetry and body weight in men and women: Implications for sexual selection. *Ethol Sociobiol* 16:145–153.
- Mantel N. 1967. The Detection of Disease Clustering and a Generalized Regression Approach. *Cancer Res* 27:209–220.
- Marchand H, Paillat G, Montuire S, Butet A. 2003. Fluctuating asymmetry in bank vole populations (Rodentia, Arvicolinae) reflects stress caused by landscape fragmentation in the Mont-Saint-Michel Bay. *Biol J Linn Soc* 296:37–44.
- Marcucio RS, Young NM, Hu D, Hallgrimsson B. 2011. Mechanisms that underlie co-variation of the brain and face. *Genesis* 49:177–89.
- Mardia KV, Bookstein FL, Moreton IJ. 2000. Statistical assessment of bilateral symmetry of shapes. *Biometrika* 87:285–300.
- Marmot M, Wilkinson R. 2005. *Social determinants of health*. Oxford: Oxford University Press.
- Marroig G, Cheverud JM. 2001. A comparison of phenotypic variation and covariation patterns and the role of phylogeny, ecology, and ontogeny during cranial evolution of new world monkeys. *Evolution* 55:2576–600.
- Marroig G, Melo DAR, Garcia G. 2012. Modularity, noise, and natural selection. *Evolution* 66:1506–24.
- Martínez-Abadías N, Esparza M, Sjøvold T, González José R, Santos M, Hernández M, Klingenberg CP. 2012. Pervasive genetic integration directs the evolution of human skull shape. *Evolution (N Y)* 66:1010–23.
- Martínez-Abadías N, González José R, González-Martín A, Van der Molen S, Talavera A, Hernández P, Hernández M. 2006. Phenotypic evolution of human craniofacial morphology after admixture: a geometric morphometrics approach. *Am J Phys Anthropol* 129:387–98.
- Martínez-Abadías N, Heuzé Y, Wang Y, Jabs EW, Aldridge K, Richtsmeier JT. 2011. FGF/FGFR signaling coordinates skull development by modulating magnitude of morphological integration: evidence from Apert syndrome mouse models. *PLoS One* 6:e26425.

- Mason MF, Cloutier J, Macrae CN. 2006. On Construing Others: Category and Stereotype Activation from Facial Cues. *Soc Cogn* 24:540–562.
- Masten MG. 1936. Asymmetry: unilateral atrophy and facial hypertrophy. *Arch Neurol Psychiatry* 35:136.
- Mathews TJ, MacDorman MF. 2007. Infant mortality statistics from the 2004 period linked birth/infant death data set. *Natl Vital Stat Rep* 55:1–32.
- Mayr E. 1956. Geographical character gradients and climatic adaptation. *Evolution (N Y)* 10:105–108.
- Mayr E. 1963. *Animal, Species and Evolution*. Harvard University Press.
- Mayr E. 2006. ¿Por qué es única la biología? Consideraciones sobre la autonomía de una disciplina científica. Buenos Aires: Katz.
- Mazzocchi F. 2008. Complexity in biology. Exceeding the limits of reductionism and determinism using complexity theory. *EMBO Rep* 9:10–4.
- McAdams HH, Arkin A. 1999. It's a noisy business! Genetic regulation at the nanomolar scale. *Trends Genet* 15:65–9.
- McCurdy H. 1949. Experimental notes on the asymmetry of the human face. *J Abnorm Soc Psychol* 44:553–555.
- Mcdade TW, Adair LS. 2001. Defining the “urban” in urbanization and health: a factor analysis approach. *Soc Sci Med* 53:55–70.
- McGrath J, Somlo S, Makova S, Tian X, Brueckner M. 2003. Two populations of node monocilia initiate left-right asymmetry in the mouse. *Cell* 114:61–73.
- McIntyre GT, Mossey PA. 2002. Asymmetry of the parental craniofacial skeleton in orofacial clefting. *J Orthod* 29:299–305.
- McKenzie JA, Clarke GM. 1988. Diazinon resistance, fluctuating asymmetry and fitness in the Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Genetics* 120:213–20.
- McKenzie JA, Yen JL. 1995. Genotype, environment and the asymmetry phenotype. Dieldrin-resistance in *Lucilia cuprina* (the Australian sheep blowfly). *Heredity (Edinb)* 75 (Pt 2):181–7.
- McKenzie JA. 1997. Stress and asymmetry during arrested development of the Australian sheep blowfly. *Proc Biol Sci* 264:1749–56.
- Mead LS, Arnold SJ. 2004. Quantitative genetic models of sexual selection. *Trends Ecol. Evol.* 19:264–271.
- Mellion ZJ, Behrents RG, Johnston LE. 2013. The pattern of facial skeletal growth and its relationship to various common indexes of maturation. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 143:845–54.
- Mendez I, Namihira D, Moreno L, Sosa C. 2006. *El protocolo de investigación*. México DF: Trillas.
- Menezes M, Rosati R, Allievi C, Sforza C. 2009. A photographic system for the three-dimensional study of facial morphology. *Angle Orthod* 79:1070.
- Merilä J, Björklund M. 1995. Fluctuating Asymmetry and Measurement Error. *Syst Biol* 44:97–101.
- Meruane M, Smok C, Rojas M. 2012. Desarrollo de Cara y Cuello en Vertebrados. *Int J Morphol* 30:1373–1388.
- Metzenbaum M. 1932. Asymmetry of Nares: Positive Diagnostic Sign or Entity Establishing Anatomic Displacement of Lower End of Cartilaginous Nasal Septum. *Arch Otolaryngol - Head Neck Surg* 16:690–697.

- Mezey JG, Cheverud JM, Wagner GP. 2000. Is the Genotype-Phenotype Map Modular?: A Statistical Approach Using Mouse Quantitative Trait Loci Data. *Genetics* 156:305–311.
- Mikula O, Auffray JC, Macholán M. 2010. Asymmetric size and shape variation in the Central European transect across the house mouse hybrid zone. *Biol J Linn Soc* 101:13–27.
- Mikula O, Macholán M. 2008. There is no heterotic effect upon developmental stability in the ventral side of the skull within the house mouse hybrid zone. *J Evol Biol* 21:1055–1067.
- Miller G. 2000. Sexual selection for indicators of intelligence. In: Bock GR, Goode JA, Webb K, editors. *The nature of the intelligence*. Chichester. p 260–275.
- Milne BJ, Belsky J, Poulton R, Thomson WM, Caspi A, Kieser J. 2003. Fluctuating asymmetry and physical health among young adults. *Evol Hum Behav* 24:53–63.
- Mitteroecker P, Bookstein F. 2007. The conceptual and statistical relationship between modularity and morphological integration. *Syst Biol* 56:818–36.
- Mitton JB. 1993. Enzyme heterozygosity, metabolism, and developmental stability. *Genetica* 89:47–65.
- Mitton JB. 1995. Enzyme heterozygosity and developmental stability. *Acta Theriol Suppl* 40(Suppl.:33–54.
- Møller AP. 1996. Development of fluctuating asymmetry in tail feathers of the barn swallow *Hirundo rustica*. *J Evol Biol* 9:677–694.
- Møller AP, Alatalo RV 1999 Good-genes effects in sexual selection. *Proc. R. Soc. B.* 266, 85–91.
- Møller AP, Pomiankowski A. 1993. Fluctuating asymmetry and sexual selection. *Genetica* 89:267–279.
- Møller AP, Soler M, Thornhill R. 1995. Breast asymmetry, sexual selection, and human reproductive success. *Ethol Sociobiol* 16:207–219.
- Møller AP, Swaddle J. 1997. *Asymmetry, developmental stability and evolution*. Oxford: Oxford University Press.
- Møller AP, Thornhill R. 1997. A meta-analysis of the heritability of developmental stability. *J Evol Biol* 10:1–16.
- Møller AP, Thornhill R. 1997. Developmental stability is heritable. *J Evol Biol* 10:69–76.
- Møller AP, Thornhill R, Gangestad SW. 2005. Direct and indirect tests for publication bias: asymmetry and sexual selection. *Anim Behav* 70:497–506.
- Møller AP. 1990. Fluctuating asymmetry in male sexual ornaments may reliably reveal male quality. *Anim Behav* 40:1185–1187.
- Møller AP. 1992. Female swallow preference for symmetrical male sexual ornaments. *Nature* 357:238–40.
- Møller AP. 2010. *Developmental Stability Is Related to Fitness*. The University of Chicago Press.
- Moran P. 1950. Notes on Continuous Stochastic Phenomena. *Biometrika* 37:17–23.
- Moreno-Estrada A, Gignoux CR, Fernández-López JC, Zakharia F, Sikora M, Contreras A V, Acuña-Alonzo V, Sandoval K, Eng C, Romero-Hidalgo S, Ortiz-Tello P, Robles V, Kenny EE, Nuño-Arana I, Barquera-Lozano R, Macín-Pérez G, Granados-Arriola J, Huntsman S, Galanter JM, Via M, Ford JG, Chapela R, Rodríguez-Cintron W, Rodríguez-Santana JR, Romieu I, Sienra-Monge JJ, del Río Navarro B, London SJ, Ruiz-Linares A, García-Herrera R, Estrada K, Hidalgo-Miranda A, Jimenez-Sanchez G, Carnevale A, Soberón X, Canizales-Quinteros S, Rangel-Villalobos H, Silva-Zolezzi I, Burchard EG, Bustamante CD. 2014. Human genetics. The genetics of Mexico recapitulates Native American substructure and affects biomedical traits. *Science* 344:1280–5.
- Morton NE. 1975. Kinship, information and biological distance. *Theor Popul Biol* 7:246–255.

- Mosier CI. 1939. Determining a simple structure when loadings for certain tests are known. *Psychometrika* 4:149–162.
- Moss M, Young R. 1960. A functional approach to craniology. *Am J Phys Anthropol* 18:281–92.
- Moss ML, Salentijn L. 1969. The primary role of functional matrices in facial growth. *Am J Orthod* 55:566–577.
- Mulick JF. 1965. An investigation of craniofacial asymmetry using the serial twin-study method. *Am J Orthod* 51:112–129.
- Muñoz-Muñoz F, Perpiñán D. 2010. Measurement Error in Morphometric Studies: Comparison between Manual and Computerized Methods. *Ann Zool Fennici* 47:46–56.
- Muñoz-Muñoz F, Sans-Fuentes MA, López-Fuster MJ, Ventura J. 2011. Evolutionary modularity of the mouse mandible: dissecting the effect of chromosomal reorganizations and isolation by distance in a Robertsonian system of *Mus musculus domesticus*. *J Evol Biol* 24:1763–1776.
- Murren CJ. 2012. The integrated phenotype. *Integr Comp Biol* 52:64–76.
- Nadeau JH, Burrage LC, Restivo J, Pao Y-H, Churchill G, Hoit BD. 2003. Pleiotropy, homeostasis, and functional networks based on assays of cardiovascular traits in genetically randomized populations. *Genome Res* 13:2082–91.
- Neale W, Hessel D, Terpstra T. 2011. Photogrammetric measurement error associated with lens distortion. *SAE Tech Pap* 01-0286:1–54.
- Neby M, Ivar F. 2013. Ranking fluctuating asymmetry in a dot figure and the significant impact of imagining a face. *Perception* 42:321–9.
- Ness AR. 1967. A measure of asymmetry of the skulls of odontocete whales. *J Zool* 153:209–221.
- Neves WA, Hubbe M. 2005. Cranial morphology of early Americans from Lagoa Santa, Brazil: implications for the settlement of the New World. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:18309–18314.
- Noback ML, Harvati K, Spoor F. 2011. Climate-related variation of the human nasal cavity. *Am J Phys Anthropol* 145:599–614.
- Norberg RA. 1978. Skull Asymmetry, Ear Structure and Function, and Auditory Localization in Tengmalm's Owl, *Aegolius funereus* (Linne). *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 282:325–410.
- North KE, Crawford MH, Relethford JH. 1999. Spatial variation of anthropometric traits in Ireland. *Hum Biol* 71:823–845.
- Nouvellet P, Ramirez-Sierra MJ, Dumonteil E, Gourbière S. 2011. Effects of genetic factors and infection status on wing morphology of *Triatoma dimidiata* species complex in the Yucatán peninsula, Mexico. *Infect Genet Evol* 11:1243–1249.
- O'Higgins P, Chadfield P, Jones N. 2001. Facial growth and the ontogeny of morphological variation within and between the primates *Cebus apella* and *Cercocebus torquatus*. *J Zool* 254:337–357.
- Olson EC, Miller RL. 1958. *Morphological integration*. Chicago: University of Chicago Press.
- Özener B, Ertuğrul B. 2010. Multiple regression analysis of the relationship between some predictors of socioeconomic status and developmental instability. *Eurasian J Anthropol* 1:18–25.
- Özener B, Fink B. 2010. Facial symmetry in young girls and boys from a slum and a control area of Ankara, Turkey. *Evol Hum Behav* 31:436–441.
- Özener B. 2010a. Brief communication: Facial fluctuating asymmetry as a marker of sex differences of the response to phenotypic stresses. *Am J Phys Anthropol* 143:321–4.

- Özener B. 2010b. Fluctuating and directional asymmetry in young human males: effect of heavy working condition and socioeconomic status. *Am J Phys Anthropol* 143:112–20.
- Özener B. 2010c. Tall men with medium body fat mass percentage display more developmental stability. *Homo* 61:459–66.
- Özener B. 2011. Does urban poverty increase body fluctuating asymmetry? *Coll Antropol* 35:1001–5.
- Palmer AR, Strobeck C, Chippindale A. 1994. Bilateral variation and the evolutionary origin of macroscopic asymmetries. In: Markow T, editor. *Developmental Instability: Its Origins and Evolutionary Implications*. Tempe, Arizona: Springer. p 203–220.
- Palmer AR, Strobeck C. 2003. Fluctuating asymmetry analysis revisited. In: Polak M., editor. *Developmental instability. Causes and consequences*. Oxford, UK. p 279–319. Available from: Oxford University Press
- Palmer AR. 1994. Fluctuating asymmetry analyses: A primer. In: Markow T, editor. *Developmental Instability: Its Origins and Evolutionary Implications*. Kluwer, Dordrecht. p 335–364.
- Palmer AR, Strobeck C. 1986. Fluctuating Asymmetry: Measurement, Analysis, Patterns. *Annu Rev Ecol Syst* 17:391–421.
- Palmer AR, Strobeck C. 1992. Fluctuating asymmetry as a measure of development stability: implications of non-normal distributions and power of statistical tests. *Acta Zool Fenn* 191:57–72.
- Palmer AR. 1999. Detecting publication bias in meta-analyses: a case study of fluctuating asymmetry and sexual selection. *Am Nat* 154:220–233.
- Palmer AR. 2000. Quasireplication and the contract of error: lessons from sex ratios, heritabilities and fluctuating asymmetry. *Annu Rev Ecol Syst* 31:441–480.
- Palmer AR. 1996. Waltzing with asymmetry. *Bioscience* 46:518–532.
- Parada C. 2009. Evolución y desarrollo facial: perspectiva molecular. *Univ Odontol* 28:75–85.
- Parsons KJ, Son YH, Craig Albertson R. 2011. Hybridization Promotes Evolvability in African Cichlids: Connections Between Transgressive Segregation and Phenotypic Integration. *Evol Biol* 38:306–315.
- Parsons PA. 1990. Fluctuating asymmetry: an epigenetic measure of stress. *Biol Rev Camb Philos Soc* 65:131–45.
- Parsons PA. 1992. Fluctuating asymmetry: a biological monitor of environmental and genomic stress. *Heredity (Edinb)* 68 (Pt 4):361–4.
- Paschetta C. 2010. The influence of masticatory loading on craniofacial morphology: A test case across technological transitions in the Ohio valley. *Am J Phys Anthr* 141:297–314.
- Paternoster L, Zhurov AI, Toma AM, Kemp JP, St Pourcain B, Timpson NJ, McMahon G, McArdle W, Ring SM, Smith GD, Richmond S, Evans DM. 2012. Genome-wide association study of three-dimensional facial morphology identifies a variant in PAX3 associated with nasion position. *Am J Hum Genet* 90:478–85.
- Patterson B, Paton J. 1990. Fluctuating asymmetry and allozymic heterozygosity among natural populations of pocket gophers (*Thomomys bottae*). *Biol J ...* 40:21–36.
- Pavlicev M, Cheverud JM, Wagner GP. 2009. Measuring Morphological Integration Using Eigenvalue Variance. *Evol Biol*.
- Payne M. 2013. The reliability of facial soft tissue landmarks with photogrammetry.
- Pélabon C, Hansen TF, Carter AJR, Houle D. 2006. Response of fluctuating and directional asymmetry to selection on wing shape in *Drosophila melanogaster*. *J Evol Biol* 19:764–776.

- Pélabon C, Hansen TF. 2008. On the adaptive accuracy of directional asymmetry in insect wing size. *Evolution* (N Y) 62:2855–2867.
- Pellegrino A. 2000. Trends in International Migration in Latin America and the Caribbean. *Int Soc Sci J* 52:395–408.
- Penfield W. 1943. Growth asymmetry due to lesions of the postcentral cerebral cortex. *Arch Neurol Psychiatry* 50:405.
- Peng S, Tan J, Hu S, Zhou H, Guo J, Jin L, Tang K. 2013. Detecting Genetic Association of Common Human Facial Morphological Variation Using High Density 3D Image Registration. *PLoS Comput Biol* 9:e1003375.
- Penton-Voak IS, Jones BC, Little AC, Baker S, Tiddeman B, Burt DM. 2001. Symmetry, sexual dimorphism in facial proportions and male facial attractiveness. *Proc R Soc* 268:1617–1623.
- Perego UA, Achilli A, Angerhofer N, Accetturo M, Pala M, Olivieri A, Hooshiar Kashani B, Ritchie KH, Scozzari R, Kong Q-P, Myres NM, Salas A, Semino O, Bandelt H-J, Woodward SR, Torroni A. 2009. Distinctive Paleo-Indian migration routes from Beringia marked by two rare mtDNA haplogroups. *Curr Biol* 19:1–8.
- Pereña L. 1992. *Genocidio en América*. Madrid: Mapfre.
- Peres-Neto PR, Jackson DA, Somers KM, Somer KM. 2005. How many principal components? stopping rules for determining the number of non-trivial axes revisited. *Comput Stat Data An* 49:974–997.
- Perez SI, Bernal V, Gonzalez PN. 2007. Morphological differentiation of aboriginal human populations from Tierra del Fuego (Patagonia): implications for South American peopling. *Am J Phys Anthr* 133:1067–1079.
- Perez SI, Diniz-Filho JA, Bernal V, Gonzalez PN. 2010. Spatial regression techniques for inter-population data: studying the relationships between morphological and environmental variation. *J Evol Biol* 23:237–248.
- Perez SI, Monteiro LR. 2009. Nonrandom factors in modern human morphological diversification: a study of craniofacial variation in southern South American populations. *Evolution* (N Y) 63:978–993.
- Perrett DI, Burt DM, Penton-Voak IS, Lee KJ, Rowland DA, Edwards R. 1999. Symmetry and Human Facial Attractiveness. *Evol Hum Behav* 20:295–307.
- Perrett DI, Lee KJ, Penton-Voak I, Rowland D, Yoshikawa S, Burt DM, Henzi SP, Castles DL, Akamatsu S. 1998. Effects of sexual dimorphism on facial attractiveness. *Nature* 394:884–7.
- Perzigian AJ. 1977. Fluctuating dental asymmetry: variation among skeletal populations. *Am J Phys Anthropol* 47:81–8.
- Peters M, Simmons LW, Rhodes G. 2009. Preferences across the menstrual cycle for masculinity and symmetry in photographs of male faces and bodies. *PLoS One* 4:1–7.
- Pigliucci M, Preston K. 2004. *Phenotypic integration: studying the ecology and evolution of complex phenotypes*. New York: Oxford University Press.
- Pigliucci M. 2001. *Phenotypic Plasticity*. Baltimore: Johns Hopkins University Press.
- Piot P, Greener R, Russell S. 2007. Squaring the circle: AIDS, poverty, and human development. *PLoS Med* 4:1571–5.
- Plato CC, Wood JL, Norris AH. 1980. Bilateral asymmetry in bone measurements of the hand and lateral hand dominance. *Am J Phys Anthropol* 52:27–31.
- Pound N, Lawson DW, Toma AM, Richmond S, Zhurov AI, Penton-Voak IS. 2014. Facial fluctuating asymmetry is not associated with childhood ill-health in a large British cohort study. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 281:e20141639.

- Pound N, Penton-Voak IS, Brown WM. 2007. Facial symmetry is positively associated with self-reported extraversion. *Pers Individ Dif* 43:1572–1582.
- Pucciarelli HM. 2008. Evolución y diversificación biológica humana desde la perspectiva craneofuncional. Mexico. DF: IIA-UNAM, ENAH.
- Pucciarelli HM, Dressino V, Niveiro MH. 1990. Changes in skull components of the squirrel monkey evoked by growth and nutrition: an experimental study. *Am J Phys Anthropol* 81:535–43.
- Pucciarelli HM. 1980. The effects of race, sex, and nutrition on craniofacial differentiation in rats. A multivariate analysis. *Am J Phys Anthropol* 53:359–68.
- Pucciarelli HM. 1981. Growth of the functional components of the rat skull and its alteration by nutritional effects. A multivariate analysis. *Am J Phys Anthropol* 56:33–41.
- Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MAR, Bender D, Maller J, Sklar P, de Bakker PIW, Daly MJ, Sham PC. 2007. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 81:559–75.
- Puts DA. 2005. Mating context and menstrual phase affect women's preferences for male voice pitch. *Evol Hum Behav* 26:388–397.
- Puts DA. 2010. Beauty and the beast: mechanisms of sexual selection in humans. *Evol Hum Behav* 31:157–175.
- QGIS Development Team. 2009. QGIS Geographic Information System. Available from: <http://qgis.osgeo.org>
- Quinto-Sánchez M, Adhikari K, Acuña-Alonzo V, Cintas C, Silva de Cerqueira CC, Ramallo V, Castillo L, Farrera A, Jaramillo C, Arias W, Fuentes M, Everardo P, de Avila F, Gomez-Valdés J, Hunemeier T, Gibbon S, Gallo C, Poletti G, Rosique J, Bortolini MC, Canizales-Quintero S, Rothhammer F, Bedoya G, Ruiz-Linares A, Gonzalez-José R. 2015. Facial asymmetry and genetic ancestry in Latin American admixed populations. *Am J Phys Anthropol* 157:58–70.
- R Development Core Team. 2008. R: A language and environment for statistical computing.
- Rabinovich S. 1994. *Measurement Errors: theory and practice*. New York: Amer Inst of Physics.
- Rae T, Viðarsdóttir U, Jeffery N, Steegmann Jr. AT. 2006. Developmental response to cold stress in cranial morphology of *Rattus*: implications for the interpretation of climatic adaptation in fossil hominins. *Proc* 273:2605–2610.
- Ramachandran S, Deshpande O, Roseman CC, Rosenberg NA, Feldman MW, Cavalli-Sforza LL. 2005. Support from the relationship of genetic and geographic distance in human populations for a serial founder effect originating in Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:15942–15947.
- Ramírez Rozzi FV, González José R, Pucciarelli HM. 2005. Cranial growth in normal and low-protein-fed *Saimiri*. An environmental heterochrony. *J Hum Evol* 49:515–35.
- Randles RH, Fligner MA, II GEP, Wolfe DA. 1980. An Asymptotically Distribution-Free Test for Symmetry versus Asymmetry. *J Am Stat Assoc* 75:168–172.
- Ras F, Habets LL, van Ginkel FC, Prah-Andersen B. 1994. Facial left-right dominance in cleft lip and palate: three-dimension evaluation. *Cleft Palate Craniofac J* 31:461–5.
- Reader J. 1998. *Africa A Biography of the Continent*. New York: Knopf.
- Rego C, Matos M, Santos M. 2006. Symmetry breaking in interspecific *Drosophila* hybrids is not due to developmental noise. *Evolution (N Y)* 60:746–761.
- Reich D, Patterson N, Campbell D, Tandon A, Mazieres S, Ray N, Parra M V, Rojas W, Duque C, Mesa N, García LF, Triana O, Blair S, Maestre A, Dib JC, Bravi CM, Bailliet G, Corach D, Hunemeier T, Bortolini MC, Salzano FM, Petzl-Erler ML, Acuña-Alonzo V, Aguilar-Salinas C, Canizales-Quinteros S, Tusié-

Luna T, Riba L, Rodríguez-Cruz M, Lopez-Alarcón M, Coral-Vazquez R, Canto-Cetina T, Silva-Zolezzi I, Fernandez-Lopez JC, Contreras A V, Jimenez-Sanchez G, Gómez-Vázquez MJ, Molina J, Carracedo A, Salas A, Gallo C, Poletti G, Witonsky DB, Alkorta-Aranburu G, Sukernik RI, Osipova L, Fedorova SA, Vasquez R, Villena M, Moreau C, Barrantes R, Pauls D, Excoffier L, Bedoya G, Rothhammer F, Dugoujon J-M, Larrouy G, Klitz W, Labuda D, Kidd J, Kidd K, Di Rienzo A, Freimer NB, Price AL, Ruiz-Linares A. 2012. Reconstructing Native American population history. *Nature* 488:370–4.

Reis VA, Zaidel DW. 2001. Functional asymmetry in the human face: Perception of health in the left and right sides of the face. *Laterality* 6:225–231.

Relethford JH. 1994. Craniometric variation among modern human populations. *Am J Phys Anthropol* 53:62–95.

Relethford JH. 2004. Global Patterns of Isolation by Distance Based on Genetic and Morphological Data. *Hum Biol* 76:499–513.

Relethford JH. 2012. *Human Population Genetics*. Hoboken, New Jersey: Wiley-Blackwell Publishing, Inc.

Relethford JH. 2008. Geostatistics and spatial analysis in biological anthropology. *Am J Phys Anthr* 136:1–10.

Relethford JH. 2009. Race and global patterns of phenotypic variation. *Am J Phys Anthr* 139:16–22.

Rhodes G, Louw K, Evangelista E. 2009. Perceptual adaptation to facial asymmetries. *Psychon Bull Rev* 16:503–8.

Rhodes G, Proffitt F, Grady JM, Sumich A. 1998. Facial symmetry and the perception of beauty. *Psychon Bull Rev* 5:659–669.

Rhodes G, Sumich A, Byatt G. 1999. Are Average Facial Configurations Attractive Only Because of Their Symmetry? *Psychol Sci* 10:52–58.

Rhodes G, Zebrowitz LA, Clark A, Kalick SM, Hightower A, McKay R. 2001. Do facial averageness and symmetry signal health? *Evol Hum Behav* 22:31–46.

Richtsmeier JT, Cole III TM, Lele SR. 2005. An invariant approach to the study of fluctuating asymmetry: developmental instability in a mouse model for down syndrome. In: Slice D, editor. *Modern Morphometrics in Physical Anthropology*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers. p 187–212.

Richtsmeier JT, DeLeon VB, Lele S. 2002. The promise of geometric morphometrics. *Yearb Phys Anthr* 45:63–91.

Richtsmeier JT, DeLeon VB. 2009. Morphological integration of the skull in craniofacial anomalies. *Orthod Craniofac Res* 12:149–58.

Richtsmeier JT, Paik CH, Elfert PC, Cole TM, Dahlman HR. 1995a. Precision, repeatability, and validation of the localization of cranial landmarks using computed tomography scans. *Cleft Palate Craniofac J* 32:217–27.

Rikowski A, Grammer K. 1999. Human body odour, symmetry and attractiveness. *Proc Biol Sci* 266:869–74.

Riska B. 1986. Some models for development, growth, and morphometric correlation. *Evolution* (N Y) 40:1303–1311.

Rohlf FJ, Slice D. 1990. Extensions of the Procrustes Method for the Optimal Superimposition of Landmarks. *Syst Zool* 39:40.

Rohlf FJ. 2003. Bias and error in estimates of mean shape in geometric morphometrics. *J Hum Evol* 44:665–683.

Rosas A, Bastir M. 2002. Thin-Plate Spline Analysis of Allometry and Sexual Dimorphism in the Human Craniofacial Complex. *Am J Phys Anthr* 245:236–245.

- Roseman CC, Weaver TD. 2007. Molecules vs. morphology? Not for the human cranium. *Bioessays* 29:1185–88.
- Roseman CC, Weaver TD. 2004. Multivariate apportionment of global human craniometric diversity. *Am J Phys Anthr* 125:257–263.
- Roseman CC. 2004. Detecting interregionally diversifying natural selection on modern human cranial form by using matched molecular and morphometric data. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:12824–9.
- Rosenblat A. 1954. La Población Indígena y el Mestizaje en América. I. La Población Indígena en América, 1492–1950. Buenos Aires: Nova.
- Rosero-Bixby L, Dow WH. 2009. Surprising SES Gradients in Mortality, Health, and Biomarkers in a Latin American Population of Adults. *Journals Gerontol Ser B Psychol Sci Soc Sci* 64B:105–117.
- Ross AH, Williams S. 2008. Testing repeatability and error of coordinate landmark data acquired from crania. *J Forensic Sci* 53:782–5.
- Rout L. 1976. *The African Experience in Spanish America: 1502 to the Present Day*. New York: Cambridge University Press.
- Rouvière H, Delmas A. 2005. *Anatomía humana*. Barcelona: Masson-Elsevier España. Volumen 1 de *Anatomía humana: descriptiva, topográfica y funcional*.
- Ruiz-Linares A, Adhikari, Kaustubh Acuña-Alonzo V, Quinto-Sánchez, Mirsha Jaramillo C, Arias W, Fuentes M, Pizarro M, Everardo P, de Avila F, Gómez-Valdés J, León-Mimila P, Hunemeier T, Ramallo V, Silva de Cerqueira CC, Burley M-W, Konka E, Zagonel de Oliveira M, Veronez MR, Rubio-Codina M, Attanasio O, Gibbon S, Gallo C, Poletti G, Rosique J, Schuler-Faccini L, Salzano FM, Bortolini M-C, Canzales-Quinteros S, Rothhammer F, Bedoya G, Balding D, Gonzalez-José R. 2014. Admixture in Latin America: geographic structure, phenotypic diversity and self-perception of ancestry based on 7,342 individuals. *PLoS Genet* 10:e1004572.
- Sadler T. 2012. *Medical embryology*. Philadelphia: Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins.
- Salzano FM, Bortolini MC. 2002. *The Evolution and Genetics of Latin American Populations*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Salzano FM, Callegari-Jacques SM. 1988. *South American Indians: A Case Study in Evolution*. Oxford: Clarendon Press.
- Salzano FM, Sans M. 2014. Interethnic admixture and the evolution of Latin American populations. *Genet Mol Biol* 37:151–170.
- Salzano FM. 2011. The Prehistoric Colonization of the Americas: Evidence and Models. *Evol Educ Outreach* 4:199–204.
- Sánchez Sobrino J. 2007. *Introducción a la fotogrametría*. Madrid. Available from: http://delegacion.camino.upm.es/apuntes/ICCP/3_tercero/Topografia/Fotogrametría.pdf
- Sánchez-Chardi A, García-Pando M, López-Fuster MJ. 2013. Chronic exposure to environmental stressors induces fluctuating asymmetry in shrews inhabiting protected Mediterranean sites. *Chemosphere* 93:916–923.
- Santos M. 2002. Genetics of wing size asymmetry in *Drosophila buzzatii*. *J Evol Biol* 15:720–734.
- Savriama Y, Gómez JM, Perfectti F, Klingenberg CP. 2012. Geometric morphometrics of corolla shape: Dissecting components of symmetric and asymmetric variation in *Erysimum mediohispanicum* (Brassicaceae). *New Phytol* 196:945–954.
- Scammon R. 1930. *The measurement of man*. Mineapolis.: University of Mineapolis Press.
- Schaefer K, Fink B, Grammer K, Mitteroecker P, Gunz P, Bookstein FL. 2006. Female appearance: facial and bodily attractiveness as shape. *Psychol Sci* 48:187–204.

- Schaefer K, Lauc T, Mitteroecker P, Gunz P, Bookstein FL. 2006. Dental arch asymmetry in an isolated Adriatic community. *Am J Phys Anthropol* 129:132–42.
- Scheib JE, Gangestad SW, Thornhill R. 1999. Facial attractiveness, symmetry and cues of good genes. *Proc Biol Sci* 266:1913–7.
- Scheiner SM, Caplan RL, Lyman RF. 1991. The genetics of phenotypic plasticity. III. Genetic correlations and fluctuating asymmetries. *J Evol Biol* 4:51–68.
- Schenk T. 2005a. Introduction to Photogrammetry. Columbus.
- Schenk T. 2005b. Mathematical models for registering imagery to 3Dpoint clouds, Tech. Notes Photogramm. 23, 18 pp., Dep. of Civil and Environ. Eng. and Geod. Sci., Ohio State Univ., Columbus.
- Scheuer L, Black S. 2004. The juvenile skeleton. London, UK: Elsevier Academic Press.
- Schlichting C, Pigliucci M. 1998. Phenotypic evolution. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Schlichting C. 1989. Phenotypic integration and environmental change. *Bioscience* 39:460–64.
- Schlueter J, Brand T. 2007. Left-right axis development: examples of similar and divergent strategies to generate asymmetric morphogenesis in chick and mouse embryos. *Cytogenet Genome Res* 117:256–67.
- Schmidt K, Cohn J. 2001. Human facial expressions as adaptations: Evolutionary questions in facial expression research. *Am J Phys ... Suppl* 33:3–24.
- Schmidt K, Cohn J. 2001. Human facial expressions as adaptations: Evolutionary questions in facial expression research. *Am J Phys Anthropol Suppl* 33:3–24.
- Schurr TG, Sherry ST. 2004. Mitochondrial DNA and Y Chromosome Diversity and the Peopling of the Americas : Evolutionary and Demographic Evidence. *Am J Hum Biol* 16:420–439.
- Schwartz J, Tattersall I. 2000. The human chin revisited: What is it and who has it? *J Human Evol* 38:367–409.
- Schwartz J. 1995. Skeletons keys. Oxford: Oxford University Press.
- Sciulli PW, Doyle WJ, Kelley C, Siegel P, Siegel MI. 1979. The interaction of stressors in the induction of increased levels of fluctuating asymmetry in the laboratory rat. *Am J Phys Anthropol* 50:279–84.
- Sell A, Cosmides L, Tooby J, Sznycer D, von Rueden C, Gurven M. 2008. Human adaptations for the visual assessment of strength and fighting ability from the body and face. *Proc R Soc London B* 276:575–584.
- Serrano E, Angibault J-M, Cargnelutti B, Hewison JM. 2008. Density dependence of developmental instability in a dimorphic ungulate. *Biol Lett* 4:512–514.
- Shah S, Joshi M. 1978. An Assessment of Asymmetry in the Normal Craniofacial Complex. *Angle Orthod* 48:141–148.
- Shaner DJ, Peterson AE, Beattie OB, Bamforth JS. 2000. Assessment of soft tissue facial asymmetry in medically normal and syndrome-affected individuals by analysis of landmarks and measurements. *Am J Med Genet* 93:143–54.
- Shonkoff JP, Boyce WT, McEwen BS. 2009. Neuroscience, molecular biology, and the childhood roots of health disparities: building a new framework for health promotion and disease prevention. *JAMA* 301:2252–9.
- Siegel MI, Doyle WJ. 1975a. The effects of cold stress on fluctuating asymmetry in the dentition of the mouse. *J Exp Zool* 193:385–9.

- Siegel MI, Doyle WJ. 1975b. Stress and fluctuating limb asymmetry in various species of rodents. *Growth* 39:363–9.
- Siegel MI, Doyle WJ. 1975c. The differential effects of prenatal and postnatal audiogenic stress on fluctuating dental asymmetry. *J Exp Zool* 191:211–4.
- Siikamäki P, Lammi A, Mustajärvi K. No relationship between fluctuating asymmetry and fitness in *Lychnis viscaria*. *Evol Ecol* 16:567–577.
- Simmons LW. 2004. Are human preferences for facial symmetry focused on signals of developmental instability? *Behav Ecol* 15:864–871.
- Simon H. 1962. The architecture of complexity: hierarchic systems. *Proc Amer Phil Soc* 106:467–482.
- Singer W. 2007. Understanding the brain. How can our intuition fail so fundamentally when it comes to studying the organ to which it owes its existence? *EMBO Rep* 8 Spec No:S16–9.
- Singh D. 1993. Body shape and women's attractiveness : The critical role of waist-to-hip ratio. *Hum Nat* 4:297–321.
- Singleton M. 2002. Patterns of cranial shape variation in the Papionini (Primates: Cercopithecinae). *J Hum Evol* 42:547–578.
- Slarkin M. 1985. Gene Flow in Natural Populations. *Annu Rev Ecol Syst* 16:393–430.
- Slice DE. 2005. Modern morphometrics in physical anthropology. New York:Springer.
- Small C. 1996. The statistical theory of shape. New York: Springer-Verlag.
- Smith DR, Crespi BJ, Bookstein FL. 1997. Fluctuating asymmetry in the honey bee, *Apis mellifera*: effects of ploidy and hybridization. *J Evol Biol* 10:551–574.
- Smith WM. 2000. Hemispheric and facial asymmetry: gender differences. *Laterality* 5:251–8.
- Sneath PHA. 2009. Trend-surface analysis of transformation grids. *J Zool* 151:65–122.
- Sokal RR, Jacquez G, Wooten M. 1989. Spatial autocorrelation analysis of migration and selection. *Genetics* 121:845–855.
- Sokal RR, Livshits G. 1993. Geographic variation of six dermatoglyphic traits in Eurasia. *Am J Phys Anthropol* 90:393–407.
- Sokal RR, Oden NL. 2008. Spatial autocorrelation in biology: 1. Methodology. *Biol J Linn Soc* 10:199–228.
- Sokal RR, Rohlf FJ. 1995. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. San Francisco: W. H. Freeman.
- Som PM, Naidich TP. 2014. Illustrated review of the embryology and development of the facial region, part 2: Late development of the fetal face and changes in the face from the newborn to adulthood. *AJNR Am J Neuroradiol* 35:10–8.
- Sonnweber RS, Stobbe N, Zavala Romero O, Slice DE, Fieder M, Wallner B. 2013. A new method for the analysis of soft tissues with data acquired under field conditions. *PLoS One* 8:e67521.
- Soule M. 1967. Phenetics of Natural Populations. II. Asymmetry and Evolution in a Lizard. *Am Nat* 101:141–160.
- Soulé M. 1979. Heterozygosity and Developmental Stability: Another Look. *Evolution (N Y)* 33:396–401.
- Spencer H. 1864. The principles of biology. William and Norgate. Londres.

- Sperber GH. 2001. Craniofacial development. Hamilton, Ontario: BC Decker Inc.
- Sperber GH. 2006. New Insights in Facial Development. *Semin Orthod* 12:4–10.
- Stannard D. 1993. *American Holocaust: The Conquest of the New World*. New York: Oxford University Press.
- Stevens WP. 1997. Reconstruction of three-dimensional anatomical landmark coordinates using video-based stereophotogrammetry. *J Anat* 19:277–84.
- Stige LC, David B, Alibert P. 2006. On hidden heterogeneity in directional asymmetry—can systematic bias be avoided? *J Evol Biol* 19:492–499.
- Stone JH, Chew K, Ross AH, Verano JW. 2015. Craniofacial plasticity in ancient Peru. *Anthropol Anzeiger* 72:169–83.
- Strait DS. 2001. Integration, phylogeny, and the hominid cranial base. *Am J Phys Anthropol* 114:273–97.
- Strasburg JL, Rieseberg LH. 2013. Methodological challenges to realizing the potential of hybridization research. *J Evol Biol* 26:259–60.
- Swaddle JP, Witter M, Cuthill I. 1994. The analysis of fluctuating asymmetry. *Anim Behav* 48:986–989.
- Swaddle JP, Cuthill IC. 1995. Asymmetry and human facial attractiveness: symmetry may not always be beautiful. *Proc Biol Sci* 261:111–6.
- Takao D, Nemoto T, Abe T, Kiyonari H, Kajiura-Kobayashi H, Shiratori H, Nonaka S. 2013. Asymmetric distribution of dynamic calcium signals in the node of mouse embryo during left-right axis formation. *Dev Biol* 376:23–30.
- Tanner JM, Weiner JS. 1949. The reliability of the photogrammetric method of anthropometry, with a description of a miniature camera technique. *Am J Phys Anthropol* 7:145–186.
- Taylor B, Kuyatt C. 2009. Guidelines for evaluating and expressing the uncertainty of NIST measurement results. NIST Technical Note 1297-DIANE Publishing.
- Teixeira CP, Hirsch A, Perini H, Young RJ. 2006. Marsupials from space: fluctuating asymmetry, geographical information systems and animal conservation. *Proc Biol Sci* 273:1007–1012.
- Thomas HB. 1936. Partial gigantism: Overgrowth and asymmetry of bones and skeletal muscle. *Am J Surg* 32:108–168.
- Thompson JR. 1943. Asymmetry of the Face. *J Am Dent Assoc* 30:1859–1871.
- Thornhill R, Gangestad SW. 1993. Human facial beauty : Averageness, symmetry, and parasite resistance. *Hum Nat* 4:237–69.
- Thornhill R, Gangestad SW. 1999. Facial attractiveness. *Trends Cogn Sci* 3:452–460.
- Thornhill R, Gangestad W, Comer R. 1995. Human female orgasm and mate fluctuating asymmetry. *Anim Behav* 50:1601–1615.
- Thornhill R, Møller AP. 1997. Developmental stability, disease and medicine. *Biol Rev Camb Philos Soc* 72:497–548.
- Thornton R. 1987. *American Indian Holocaust and Survival: A Population History Since 1492*. University of Oklahoma Press.
- Thornton R. 2000. Population history of Native North Americans. In: Haines M, Steckel R, editors. *A population history of North America*. Cambridge: Cambridge University Press. p 9–50.

- Tomas R. 1998. The evolution of human adaptability paradigms: towards a biology of poverty. In: Goodman A, Leatherman T, editors. *Building a New Biocultural Synthesis: Political-economic Perspectives on Human Biology*. Michigan: The University of Michigan Press. p 43–73.
- Trinkaus E. 1978. Bilateral asymmetry of human skeletal non-metric traits. *Am J Phys Anthropol* 49:315–8.
- Trinkaus E. 2003. Neandertal faces were not long; modern human faces are short. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8142–5.
- Trivers R, Manning JT, Thornhill R, Singh D, McGuire M. 1999. Jamaican Symmetry Project: long-term study of fluctuating asymmetry in rural Jamaican children. *Hum Biol.* 71:417–30.
- Trotsky L. 1932. *The History of the Russian Revolution*. (Pr P, editor.). Michigan: Pr, Pathfinder.
- Van Der Klaauw C. 1945. Cerebral skull and facial skull. A contribution to the knowledge of skull-structure. *Arch Néerlandaises Zool* 7:16–37.
- Van Dongen S, Lens L. 2000. The evolutionary potential of developmental instability. *J Evol Biol* 13:326–335.
- Van Dongen S, Sprengers E, Löfstedt C. 1999. Correlated development, organism-wide asymmetry and patterns of asymmetry in two moth species. *Genetica* 105:81–91.
- Van Dongen S, Sprengers E, Löfstedt C. 2001. Lack of evolutionary potential of developmental instability of front tibia length in the Indian meal moth. *Belgian J Zool* 131:75–82.
- Van Dongen S, Wijnaendts LCD, Ten Broek CMA, Galis F. 2009. Fluctuating asymmetry does not consistently reflect severe developmental disorders in human fetuses. *Evolution* 63:1832–44.
- Van Regenmortel MH V. 2004. Reductionism and complexity in molecular biology. Scientists now have the tools to unravel biological and overcome the limitations of reductionism. *EMBO Rep* 5:1016–20.
- Van Valen L. 1962. A Study of Fluctuating Asymmetry. *Evolution (N Y)* 16:125–142.
- Vannier M, Pilgram T, Bhatia G, Brunsden B, Nemecek J, Young V. 1993. Quantitative three-dimensional assessment of face-lift with an optical facial surface scanner. *Ann Plast Surg* 30:204–211.
- Velayos J. 1998. *Anatomía de la cabeza con enfoque odontoestomatológico*. 2da ed. Madrid: Médica Panamericana.
- Vig P, Hewitt A. 1975. Asymmetry of the Human Facial Skeleton. *Angle Orthod* 45:125–129.
- Vijg J. 2014. Somatic mutations, genome mosaicism, cancer and aging. *Curr Opin Genet Dev* 26:141–149.
- Vlahov D, Freudenberg N, Proietti F, Ompad D, Quinn A, Nandi V, Galea S. 2007. Urban as a determinant of health. *J Urban Health* 84:i16–26.
- Vøllestad LA, Hindar K. 1997. Developmental stability and environmental stress in *Salmo salar* (Atlantic salmon). *Heredity (Edinb)* 78 (Pt 2):215–22.
- Vøllestad LA. 1999. A meta-analysis of fluctuating asymmetry in relation to heterozygosity.
- Vrijenhoek R, Lerman S. 1982. Heterozygosity and developmental stability under sexual and asexual breeding systems. *Evolution (N Y)* 36:768–776.
- Vyas S, Kumaranayake L. 2006. Constructing socio-economic status indices: how to use principal components analysis. *Health Policy Plan* 21:459–68.
- Waddington C. 1942. Canalization of development and the inheritance of acquired characters. *Nature* 150:563–565.

- Wagner GP. 1984. On the eigenvalue distribution of genetic and phenotypic dispersion matrices: evidence for a nonrandom organization of quantitative character variation. *J Math Biol* 21:77–95.
- Wagner GP. 1996. Homologues, Natural Kinds and the Evolution of Modularity. *Integr Comp Biol* 36:36–43.
- Wagner GP, Altenberg L. 1996. Complex Adaptations and the Evolution of Evolvability. *Evolution (N Y)* 50:967–976.
- Wagner GP, Pavlicev M, Cheverud JM. 2007. The road to modularity. *Nat Rev Genet* 8:921–31.
- Wagner GP, Zhang J. 2011. The pleiotropic structure of the genotype-phenotype map: the evolvability of complex adaptations. *Nat Rev Genet* 12:204–213.
- Wagner GP. 1990. A comparative study of morphological integration in *Apis mellifera* (Insecta, Hymenoptera). *J Zool Syst Evol Res* 28:48–61.
- Wainwright PC, Alfaro ME, Bolnick DI, Hulseley CD. 2005. Many-to-One Mapping of Form to Function: A General Principle in Organismal Design? *Integr Comp Biol* 45:256–62.
- Wang S, Ray N, Rojas W, Parra M V., Bedoya G, Gallo C, Poletti G, Mazzotti G, Hill K, Hurtado AM, Camrena B, Nicolini H, Klitz W, Barrantes R, Molina JA, Freimer NB, Bortolini MC, Salzano FM, Petzl-Erler ML, Tsuneto LT, Dipierri JE, Alfaro EL, Bailliet G, Bianchi NO, Llop E, Rothhammer F, Excoffier L, Ruiz-Linares A. 2008. Geographic Patterns of Genome Admixture in Latin American Mestizos. *PLoS Genet* 4:e1000037.
- Watson PJ, Thornhill R. 1994. Fluctuating asymmetry and sexual selection. *Trends Ecol Evol* 9:21–5.
- Wedekind C, Seebeck T, Bettens F, Paepke AJ. 1995. MHC-dependent mate preferences in humans. *Proc Biol Sci* 260:245–9.
- Weinberg S, Naidoo S, Govier D, Martin R, Kane A, Marazita M. 2006. Anthropometric Precision and Accuracy of Digital Three-Dimensional Photogrammetry: Comparing the Genex and 3dMD Imaging Systems with One Another and with Direct Anthropometry. *J Craniofac Surg* 17:477–483.
- Weisensee KE. 2013. Assessing the relationship between fluctuating asymmetry and cause of death in skeletal remains: a test of the developmental origins of health and disease hypothesis. *Am J Hum Biol* 25:411–7.
- Wells JCK, Hallal P, Manning J, Victora C. 2006. A trade-off between early growth rate and fluctuating asymmetry in Brazilian boys. *Ann Hum Biol* 63:112.
- Wells JCK, Hallal PC, Manning JT, Victora CG. 2015. A trade-off between early growth rate and fluctuating asymmetry in Brazilian boys. *Ann Hum Biol*.
- West-Eberhard M. 2003. *Developmental plasticity and evolution*. New York: Oxford University Press.
- White T. 2000. *Human Osteology*. Elsevier Ltd, Oxford.
- White TA, Searle JB. 2008. Mandible asymmetry and genetic diversity in island populations of the common shrew, *Sorex araneus*. *J Evol Biol* 21:636–41.
- Wijsman EM, Cavalli-Sforza LL. 1984. Migration and Genetic Population Structure with Special Reference to Humans. *Annu Rev Ecol Syst* 15:279–301.
- Wiley DF, Amenta N, Alcantara DA, Ghosh D, Kil YJ, Delson E, Harcourt-Smith W, Rohlf FJ, St. John K, Hamann B. 2005. Evolutionary Morphing. In: *VIS IEEE Visualization*. IEEE. p 431–438.
- Wilkins AS. 2002. *The Evolution of Developmental Pathways*. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Wilkins AS. 1997. Canalization: a molecular genetic perspective. *Bioessays* 19:257–62.

- Willmore KE, Klingenberg CP, Hallgrímsson B, Illmore K, Lingenberg C. 2005. The relationship between fluctuating asymmetry and environmental variance in rhesus macaque skulls. *Evolution (N Y)* 59:898–909.
- Willmore KE, Leamy L, Hallgrímsson B. 2006. Effects of developmental and functional interactions on mouse cranial variability through late ontogeny. *Evol Dev* 8:550–567.
- Wilson JM, Manning JT. 1996. Fluctuating asymmetry and age in children : evolutionary implications for the control of developmental stability. *J Hum Evol* 30:529–537.
- Windhager S, Patocka K, Schaefer K. 2013. Body fat and facial shape are correlated in female adolescents. *J Hum Biol* 25:847–850.
- Windhager S, Schaschl H, Schaefer K, Mitteroecker P, Huber S, Wallner B, Fieder M. 2014. Variation at genes influencing facial morphology are not associated with developmental imprecision in human faces. *PLoS One* 9:e99009.
- Witelson SF. 1977. Anatomic asymmetry in the temporal lobes: its documentation, phylogenesis, and relationship to functional asymmetry. *Ann N Y Acad Sci* 299:328–54.
- Woo T. 1931. On the asymmetry of the human skull. *Biometrika* 22:324–352.
- Wood-Jones F. 1931a. The non-metrical Morphological Characters of the Skull as Criteria for Racial Diagnosis: Part II: The non-metrical Morphological Characters of the Hawaiian Skull. *J Anat* 65:368–78.
- Woolf CM, Gianas AD. 1976. Congenital cleft lip and fluctuating dermatoglyphic asymmetry. *Am J Hum Genet* 28:400–3.
- Woolf CM, Gianas AD. 1977. A study of fluctuating dermatoglyphic asymmetry in the sibs and parents of cleft lip propositi. *Am J Hum Genet* 29:503–7.
- Woolf CM, Markow TA. 2003. Genetic models for developmental homeostasis: Historical perspectives. In: Polak M, editor. *Developmental Instability: Causes and Consequences*. New York: Oxford University Press. p 99–115.
- Wooten MC, Smith MH. 1986. Fluctuating Asymmetry and Genetic Variability in a Natural Population of *Mus musculus*. *J Mammal* 67:725–732.
- Worboys M, Duckham M. 2004. *GIS: A computing perspective*. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Wright S. 1943. Isolation by Distance. *Genetics* 28:114–38.
- Xue F, Wang J-Z, Hu P, Li G-R. 2005. The “Kriging” model of spatial genetic structure in human population genetics. *Yi Chuan Xue Bao* 32:219–33.
- Xue F, Wang Y, Xu S, Zhang F, Wen B, Wu X, Lu M, Deka R, Qian J, Jin L. 2008. A spatial analysis of genetic structure of human populations in China reveals distinct difference between maternal and paternal lineages. *Eur J Hum Genet* 16:705–17.
- Yang J, Lee SH, Goddard ME, Visscher PM. 2011. GCTA: a tool for genome-wide complex trait analysis. *Am J Hum Genet* 88:76–82.
- Yerkes R. 1901. A Study of Variation in the Fiddler Crab *Gelasimus Pugnator* Latr. *Proc Am Acad Arts Sci* 36:417–442.
- Yezerinac SM, Loughheed SC, Handford P. 1992. Measurement Error and Morphometric Studies: Statistical Power and Observer Experience. *Syst Biol* 41:471–482.
- Young RL, Haselkorn TS, Badyaev A V. 2007. Functional equivalence of morphologies enables morphological and ecological diversity. *Evolution* 61:2480–92.

- Zaidel DW, Cohen JA. 2005. The face, beauty, and symmetry: perceiving asymmetry in beautiful faces. *Int J Neurosci* 115:1165–73.
- Zaidel DW, Deblieck C. 2007. Attractiveness of natural faces compared to computer constructed perfectly symmetrical faces. *Int J Neurosci* 117:423–31.
- Zaidel DW, Hessamian M. 2010. Asymmetry and Symmetry in the Beauty of Human Faces. *Symmetry (Basel)* 2:136–149.
- Zeh JA, Zeh DW. 1996. The evolution of polyandry I: intragenomic conflict and genetic incompatibility. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 263: 1711–1717.
- Zeh JA, Zeh DW. 1997. The evolution of polyandry II: postcopulatory defences against genetic incompatibility. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 264: 69–75.
- Zeh JA, Zeh DW. 2003. Toward a New Sexual Selection Paradigm: Polyandry, Conflict and Incompatibility (Invited Article). *Ethology* 109:929–950.
- Zelditch ML, Swiderski DL, Sheets HD, Fink WL. 2004. *Geometric morphometrics for biologists: a primer*. San Diego: Elsevier Academic Press.
- Zhou W, Tan Y, Anderson DJ, Crist EM, Ruohola-Baker, H. Salipante SJ, Horwitz MS. 2013. Use of somatic mutations to quantify random contributions to mouse development. *BMC Genomics* 14:39.

PROYECTO CANDELA

Cuestionario Individual

El documento que posee en sus manos contiene una serie de preguntas sencillas, a fin de registrar información básica sobre usted, sobre su auto-percepción y sobre sus impresiones con relación a ciertos aspectos de esta investigación. Una palabra utilizada aquí con frecuencia es “ancestralidad” y se refiere al porcentaje de sus antepasados que podrían ser nativos americanos, europeos o africanos.

Por favor, en caso que usted no comprendiese alguna palabra o pregunta de este documento, siéntase completamente libre de hacer cualquier consulta a los investigadores presentes. Del mismo modo, le solicitamos que responda de manera sincera. Toda la información aquí registrada es completa y absolutamente CONFIDENCIAL.

Investigador responsable: _____

Código: _____

Fecha: ____ / ____ / ____

1. **Edad:**años

2. **Sexo (marque con una X según corresponda):** () Femenino () Masculino

3. **ESCOLARIDAD (por favor, marque cuál fue su último nivel concluido):**

() Pos-universitario

() Universitario

() Superior no universitario - Formación técnica - Magisterio

() Polimodal / Secundario

() EGB / Primaria

() Ningún estudio formal

4. **¿Posee o habita en vivienda propia?**

() Si

() No

5. **Ingreso mensual aproximado (en salarios mínimos - \$2785):**

6. Para cada uno de los siguientes servicios o ítems, por favor, indique la cantidad que posee. En caso de no poseer ninguno, marque cero (0):

- () 6.1. Televisión
- () 6.2. Radio
- () 6.3. Baño
- () 6.4. Automóvil
- () 6.5. Servicio doméstico
- () 6.6. Aspiradora
- () 6.7. Lavarropas
- () 6.8. Videocasete/DVD
- () 6.9. Heladera
- () 6.10. Freezer
- () 6.11. Computadora
- () 6.12. Lavaplatos
- () 6.13. Motocicleta
- () 6.14. Bicicleta

7. Ocupación. Señale por favor en cuál de las 5 categorías presentadas abajo se encuadraría su trabajo actual. En caso de estar desempleado, indique cuál fue su último trabajo:

Prestador de Servicios	Autónomo	Empleado	Servidor Público	Otro
() Auxiliar de Servicios Generales	() Trabajador autónomo	() Industrial	() Gobierno	() Estudiante
() Técnico	() Agricultor	() Empleado calificado	() Profesor	() Jubilado
() Responsable Técnico	() Empresario	() Gerenciamiento	() Policía o Militar	() Pasante y/o becario

8. Lugar de nacimiento (ciudad, provincia, país):

.....

9. Lugar de nacimiento (ciudad, provincia, país) e idioma/lengua materna (además del español) de sus antepasados:

	Lugar	Idioma
Madre		
Padre		
Abuela materna		
Abuelo materno		
Abuela paterna		
Abuelo paterno		

10. ¿Alguna vez se preguntó quienes serían sus antepasados?

- Si
- No

11. ¿Tiene curiosidad sobre su ancestralidad?

- Si
- No

12. ¿Sabe o posee algún conocimiento sobre estudios genéticos y ancestralidad?

- Si
- No

13. ¿Escuchó hablar sobre estudios genéticos y ancestralidad?

- Si
- No

14. En caso de saber algo sobre estudios genéticos y ancestralidad ¿cómo adquirió esa información? (marque todas las alternativas que sean necesarias)

- Radio, televisión
- Diarios, revistas, libros
- Conferencias, actividades académicas/escolares
- Internet
- Otras:

15. ¿Usted considera que los estudios genéticos pueden ser útiles o importantes?

- Si

- No
- Tal vez
- No sé

16. ¿Usted considera que los estudios genéticos pueden tener riesgos?

- Si
- No
- Tal vez
- No sé

17. ¿Usted ya se preguntó o indagó sobre el origen de sus antepasados?

- Si
- No

18. Sabe si alguno de sus antepasados era:

	Si	No
Nativo americano	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Afrodescendiente	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Eurodescendiente	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

19. Si fuese posible ¿le gustaría saber su ancestralidad?

- Si
- No
- Tal vez
- No sé

20. ¿Considera usted que existe racismo en Argentina?

- () Si
- () No

21. ¿Considera usted que los estudios genéticos pueden ayudar a aumentar o disminuir el racismo?

- () Aumentar
- () Disminuir
- () No sabe

22. Si usted considera que es importante hacer un examen genético para conocer su ancestralidad, por favor, marque EN CADA LINEA la alternativa con la que está más de acuerdo.

	<i>Concuerto totalmente</i>	<i>Concuerto parcialmente</i>	<i>Da igual</i>	<i>Disiento parcialmente</i>	<i>Disiento totalmente</i>
Para saber sobre sus antepasados	1	2	3	4	5
Para saber sobre su salud personal y familiar	1	2	3	4	5
Para saber sobre su nacionalidad	1	2	3	4	5
Para ayudar a entender el pasado	1	2	3	4	5
Para influir en el futuro	1	2	3	4	5
Para saber su identidad	1	2	3	4	5
Para saber más sobre sus raíces	1	2	3	4	5
Por curiosidad	1	2	3	4	5

Otro (Por favor, describa con sus palabras):

23. ¿Cuáles son sus sentimientos con relación a su ancestralidad? Por favor, marque EN CADA LINEA la alternativa con la que está más de acuerdo.

	<i>Concuerdo totalmente</i>	<i>Concuerdo parcialmente</i>	<i>Da igual</i>	<i>Disiento parcialmente</i>	<i>Disiento totalmente</i>
Orgullo	1	2	3	4	5
Felicidad	1	2	3	4	5
Vergüenza	1	2	3	4	5
Indiferencia	1	2	3	4	5
Tristeza	1	2	3	4	5
Curiosidad	1	2	3	4	5

Otro (Por favor, describa con sus palabras):

24. Usted se considera:

- Afrodescendiente
- Mulato
- Indígena
- Moreno
- Mestizo
- Eurodescendiente
- Otro:

25. ¿Usted considera que existe alguna relación entre su apariencia y su ancestralidad?

- Sí
- No
- Tal vez
- No sé

26. ¿Considera que las siguientes variables afectan su apariencia física? Marque en CADA LINEA la alternativa con la que este más de acuerdo.

	<i>No afecta</i>	<i>Afecta poco</i>	<i>Afecta bastante</i>
Lugar de nacimiento	0	1	2
La "raza" de sus antepasados	0	1	2
Su estilo de vida	0	1	2
Su alimentación	0	1	2
Su trabajo	0	1	2
Su salud	0	1	2
El dinero que posea	0	1	2
Su comportamiento	0	1	2
Sus creencias	0	1	2

27. ¿Qué porcentaje aproximada considera que posee usted de origen indígena, afrodescendiente o eurodescendiente?

|

Marque con una X la categoría que considere que corresponde Si piensa que no posee ningún porcentaje de determinada ancestralidad, **marque la categoría 0-20%**.

Indígena		Afrodescendiente		Eurodescendiente	
0 – 20% (nula o muy baja)		0 – 20% (nula o muy baja)		0 – 20% (nula o muy baja)	
20 – 40% (baja)		20 – 40% (baja)		20 – 40% (baja)	
40 – 60% (media)		40 – 60% (media)		40 – 60% (media)	
60 – 80% (alta)		60 – 80% (alta)		60 – 80% (alta)	
80 – 100% (muy alta o total)		80 – 100% (muy alta o total)		80 – 100% (muy alta o total)	

Si considera que posee otra ancestralidad, por favor, indique cuál:

MUCHAS GRACIAS POR SU PARTICIPACIÓN

Anexo 2: Ejemplos de consentimiento informado e información sobre el proyecto proporcionado a cada voluntario que participaba en el proyecto CANDELA.



Hoja Informativa Proyecto Diversidad Latinoamericana

– Versión 2– septiembre de 2011

HOJA DE INFORMACION PARA ESTE ESTUDIO

“DIVERSIDAD DE LA POBLACIONES LATINOAMERICANAS”

Versión de esta hoja de información: No 2

Fecha: Septiembre 2011

Título corto del proyecto: Diversidad Latino Americana

Numero Total de páginas: 3

Lo estamos invitando a hacer parte en un estudio sobre la diversidad biológica de los latinoamericanos.

OBJETIVOS DEL ESTUDIO

El objetivo de este estudio es documentar la diversidad biológica de los individuos latinoamericanos y sus posiciones acerca de la diversidad. Adicionalmente, evaluaremos el papel de factores genéticos y no-genéticos en el desarrollo de esta diversidad.

PROCEDIMIENTOS

Este estudio involucra los siguientes procedimientos:

Entrevista y examen físico

Realizaremos una serie de preguntas con el fin de determinar como juzga Usted su composición racial que denominaremos ancestría. La entrevista nos permitirá guardar información acerca del color de sus ojos y su pelo, la cantidad de pérdida de cabello y encanecimiento, que tan rizado es su cabello y desarrollar una evaluación visual de su ancestría. También obtendremos una serie de medidas corporales como la talla, el peso y algunas medidas directas de su cabeza.. La entrevista y el examen físico tendrá una duración total de aproximadamente 30 minutos.

Fotografías

Tomaremos muchas fotografías de su cara. Estas serán tomadas con una cámara común, a corta distancia con usted en posición sentado. Una vez tomadas las fotos serán identificadas con un código el cual se utilizara como referencia para todo uso posterior de las fotos. En ningún caso su nombre se asociará a sus fotografías. Estas fotografías serán analizadas usando programas de computador con el fin de medir varios aspectos de su cara. Las fotos codificadas también podrán ser vistas por otros participantes de esta investigación con el fin de que den su opinión sobre ellas.

Evaluación de fotografías

Se le mostraran una serie de fotografías de la cara de otros participantes de esta investigación. Las fotos le serán presentadas en forma anónima sin ninguna identificación de quien es la persona a quien le fueron tomadas. Se le harán algunas preguntas sobre la impresión que le producen esas fotos. Sus respuestas serán confidenciales.

Toma de muestra de Sangre

Anexo 3: Protocolo de extracción de DNA en el proyecto CANDELA.

Partir de sangre total fresca o congelada (-80°C) con EDTA como anticoagulante.

- Transferir 5 ml de sangre total (ó 1 ml de concentrado leucocitario-buffy coat) a un tubo cónico de 15 ml y agregar 5 ml de buffer TKM1 con 125 µl de Triton X-100 para lisar las células. Mezclar bien suavemente.
- Centrifugar a 4000 rpm por 15 min a temperatura ambiente.
- Eliminar el sobrenadante por inversión y conservar el pellet nuclear (pellet pequeño).
- Lavar el pellet con 5 ml de buffer TKM1. Resuspender usando pipeta pasteur.
- Centrifugar a 4000 rpm por 15 min a temperatura ambiente.
- Resuspender suavemente el pellet en 800 µl de buffer TKM2, usar una pipeta pasteur de ser necesario. (Se recomienda su uso para la resuspensión total del pellet).
- Agregar 50 µl de SDS 10 %. Mezclar bien, pudiendo dar un pequeño toque de vortex.
- Incubar 10 min o más si es necesario, a 55 °C. Se recomienda incubar 5 min, verificar la disolución del pellet siendo necesario un toque de vortex, y luego incubar otros 5 min. Al término del período, si el precipitado no está completamente disuelto, vortexear nuevamente y/o incubar por otro período similar.
- Agregar 300 µl de NaCl saturado y mezclar bien, hasta observar la formación de un precipitado de proteínas. Se recomienda agregar el NaCl una vez que el tubo tiene una temperatura inferior a la de incubación (dejar enfriar unos minutos).
- Centrifugar a 4000 rpm por 15 min a temperatura ambiente.
- Agregar al sobrenadante 2 volúmenes de Etanol 99.9 % a temperatura ambiente.
- Agregar el sobrenadante al tubo cónico de 15 ml, que previamente se lleno con Etanol 99.9% y mezclar suavemente por inversión. Descartar el pellet de proteínas. Al invertir el tubo, cuide de no agitarlo, ya que el pellet es débil y puede desprenderse con facilidad.
- Remover el DNA precipitado con la ayuda de una punta de pipeta y transferirlo a un tubo de 1.5 ml que contiene 1 ml de Etanol 70 % frío. (mantener en hielo o en freezer).
- Centrifugar a 12000 rpm por 5 min a 4 °C. (puede ser a tª ambiente)
- Eliminar el sobrenadante, dejar secar el precipitado a temperatura ambiente por 15 a 30 min. (en realidad este tiempo es bastante fluctuante, dependiendo de la cantidad de DNA obtenido entre otras cosas, por lo que la mejor manera de dejar

deshidratar la molécula es dejarla secar a T^a ambiente hasta que los bordes del pellet se tornen transparentes)

- Una vez deshidratado, resuspender el DNA en 100 a 500 µl de buffer TE PCR ó en NaOH 8 mM. (el volumen de buffer a agregar depende de la consistencia del pellet obtenido en el paso anterior)

- **Anticoagulante a usar:** K3 EDTA 15% (equivale a 57 µl para 5 ml de sangre total). Este tipo de anticoagulante viene incluido en los tubos de 5 ml VACUTAINER, comúnmente conocidos como los “tubos vacutainer de tapa morada”.

En caso de no disponer de tubos de este tipo (aunque creo que es lo mejor por tiempo y seguridad), el anticoagulante a usar es EDTA 0.5 M, pH 8.0 filtrado. Usar un volumen de 70 µl para 5 ml de sangre total, o 100 µl para 10 ml. Es recomendable tomar las muestras en duplicado de ser posible, frente a cualquier eventualidad. Este AC debe ser dispensado en tubos estériles de 15 ml, cónicos. Luego sobre estos mismos tubos se trabaja la extracción.

-**Duración de la muestra:** De ser posible, la muestra debe procesarse de inmediato o a la brevedad posible (alrededor de 2 a 3 horas a temp. ambiente). De no ser así, debe ser refrigerada a 4 °C por un período no superior a 48 horas (la hemólisis de los Glóbulos rojos comienza casi de inmediato una vez extraídos).

Referencia: Lahiri D, Nurnberger J. 1991 A rapid non enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. Nucl Acid Res 19: 5444
(Este protocolo ha sido modificado por Moraga y Henríquez, pers. comun.)

Anexo 4: estimación de la asociación de genoma completo y caracteres cuantitativos.

En un GWAS de un carácter cuantitativo, probamos las asociaciones entre SNPs y el rasgo por el siguiente modelo de regresión simple,

$$y_j = \mu + x_{ij}a_i + e_j$$

donde y_j es el valor fenotípico del individuo j -ésimo; μ es el término medio; a_i es el efecto sustitución alelo de SNP i ; x_{ij} es un indicador variable que toma el valor de 0, 1 o 2 si el genotipo del individuo j -ésimo en el SNP i es bb, Bb o BB (alelos se denominan arbitrariamente B o b), respectivamente; y e_j es el efecto residual, $e_j \sim N(0, \sigma_e^2)$, con σ_e^2 siendo la varianza residual.

Suponiendo que pudiéramos determinar el genotipo de los sujetos en las variantes causales, podemos incluir a todos en el modelo

$$y_j = \mu + g_i + e_j \quad \text{y} \quad g_i = \sum_{i=1}^m z_{ij}u_i$$

donde g_i es el efecto genético total de un individuo j ; m es el número de loci causal; u_i es el efecto aditivo a escala de la variante causal i -ésimo; z_{ij} toma el valor de $-2f_i/\sqrt{2f_i(1-f_i)}$, $(1-2f_i)/\sqrt{2f_i(1-f_i)}$ o $-2(1-f_i)/\sqrt{2f_i(1-f_i)}$ si el genotipo del individuo j -ésimo en el locus i es qq, Qq o QQ respectivamente, con la f_i la frecuencia del alelo Q en el locus i (alelos se denominan arbitrariamente Q o q) 20,29(citas).

$$E_{(z_{ij})} = 0 \text{ y } \text{var}_{(z_{ij})} = 1.$$

En notación de matrices, $y = \mu\mathbf{1} + g + e$ y $g = Z\mathbf{u}$. Tratamos a \mathbf{u} como efectos aleatorios y asumimos $\mathbf{u} \sim N(0, I\sigma_u^2)$ con σ_u^2 siendo la varianza de los efectos causales; entonces $g_j \sim N(0, \sigma_u^2 = m\sigma_u^2)$, donde σ_u^2 es la varianza de los efectos totales genéticos aditivos, y la matriz de varianza-covarianza de y (el vector de observaciones) se puede expresar como:

$$\text{var}_{(y)} = ZZ'\sigma_u^2 + I\sigma_e^2 = \frac{ZZ'\sigma_g^2}{m} + I\sigma_e^2 = G\sigma_g^2 + I\sigma_e^2$$

donde G es la matriz de relación genética entre pares de individuos en los loci causal. Esta ecuación muestra la equivalencia entre la definición clásica de heredabilidad ($h^2 = \sigma_g^2 / \sigma_p^2$) con σ_p^2 siendo la variación fenotípica, y la proporción de la varianza fenotípica explicada por las variantes causales en total.

En la práctica, sabemos poco sobre el número y la posición de las variantes causales, por lo que no podemos obtener la matriz G directamente. Sin embargo, podemos calcular la relación de una muestra de todo el genoma de SNPs (A) usando la misma fórmula que para G. Eso es:

$$A = WW' / N$$

donde N es el número de SNPs $w_{ij} = (x_{ij} - 2p_i) / (\sqrt{2p_i(1-p_i)})$, con p_i la frecuencia de los alelos en SNP i . Esta fórmula para A ignora el error de muestreo asociado a cada SNP. Podemos mejorar la estimación de A mediante el cálculo de un promedio ponderado entre los SNPs. Para un SNP i , cuando $j \neq k$ (individuos j y k), $\text{var}(A_{ikj}) = \frac{\text{var}(x_{ij}-2p_i)\text{var}(x_{ik}-2p_i)}{4p_i^2(1-p_i)^2} = 1$, en otras palabras, es el mismo para todos los SNPs independientemente de la frecuencia de alelos. Cuando $j = k$, $\text{var}(A_{ijj}) = \frac{\text{var}[(x_{ij}-2p_i)^2]}{4p_i^2(1-p_i)^2} = \frac{1-2p_i(1-p_i)}{2p_i^2(1-p_i)}$; en otras palabras, es dependiente de la frecuencia de los alelos del SNPs. Por lo tanto, utilizamos la siguiente ecuación para calcular A_{ij} ,

$$A_{ijj} = 1 + \frac{(x_{ij}^2 - 2p_i)x_{ij} + 2p_i^2}{2p_i(1-p_i)}$$

Lo que proporciona una estimación no sesgada del coeficiente de endogamia (F), con una media de $1 + F$, y tiene varianza de muestreo de 1 cuando $F = 0$.

Para obtener una relación de todo el genoma, combinamos A_{ikj} para todos los SNPs utilizando un sistema de ponderación con sentido común,

$$A_{jk} = \frac{1}{N} \sum_i A_{ijk} = \begin{cases} \frac{1}{N} \sum_i \frac{(x_{ij} - 2p_i)(x_{ik} - 2p_i)}{2p_i(1-p_i)}, j \neq k \\ 1 + \frac{1}{N} \sum_i \frac{x_{ij}^2 - (1 + 2p_i)x_{ij} + 2p_i^2}{2p_i(1-p_i)}, j = k \end{cases}$$

Las estimaciones de las relaciones son siempre relativas a una población base arbitraria en la que la relación media es cero. Se usan los individuos de la muestra como la base para que la relación promedio entre todos los pares de individuos sea 0 y la relación media de un individuo con él o ella misma sea 1.

Nota: la anterior metodología se ha traducido de Yang et al., (2010). Los procedimientos realizados en ésta tesis se realizaron por medio del uso del programa PLINK (Purcell et al., 2007) y GCTA (Yang et al., 2011).

Anexo 5: Procrustes ANOVA por módulos.

Tabla A. Cuadrados medios resultado del Procrustes ANOVA como indicadores de varianza. Se muestra el indicador para cada módulo facial empleado en la tesis.

	Módulo	IND	AD	AF	Error	IM
Neuro-cara	Neurocráneo	0.00014	0.00403	0.00002	0.00002	0.07087
	Esplacnocráneo	0.00013	0.00454	0.00002	0.00001	0.05984
	Ojo	0.00018	0.00976	0.00005	0.00003	0.11952
Funcional	Orejas	0.00014	0.00194	0.00003	0.00002	0.10028
	Nariz	0.00109	0.08570	0.00016	0.00010	0.06329
	Boca	0.00115	0.10113	0.00021	0.00013	0.13720
Cara	Superior	0.00022	0.01989	0.00003	0.00002	0.10182
	Inferior	0.00093	0.05349	0.00014	0.00011	0.10060
	Sagital	0.00039	0.02338	0.00006	0.00003	0.05388
Linea Media	Midsagital	0.00018	0.00976	0.00005	0.00003	0.11952
	Lateral	0.00014	0.00194	0.00003	0.00002	0.10028

Anexo 6: Publicaciones asociadas a la tesis, en orden: la publicación directa de la tesis, el artículo de presentación del proyecto CANDELA y un el primer trabajado sobre GWAS.

AMERICAN JOURNAL OF PHYSICAL ANTHROPOLOGY 00:00-00 (2015)

Facial Asymmetry and Genetic Ancestry in Latin American Admixed Populations

Mirsha Quinto-Sánchez,¹ Kaustubh Adhikari,² Víctor Acuña-Alonzo,^{2,3} Celia Cintas,¹ Caio Cesar Silva de Cerqueira,¹ Virginia Ramallo,¹ Lucia Castillo,¹ Arodi Farrera,⁴ Claudia Jaramillo,⁵ Williams Arias,⁵ Macarena Fuentes,⁶ Paola Everardo,³ Francisco de Avila,³ Jorge Gomez-Valdés,⁷ Tábata Hünemeier,⁸ Shara Gibbon,⁹ Carla Gallo,¹⁰ Giovanni Poletti,¹⁰ Javier Rosique,⁵ María Cátira Bortolini,⁸ Samuel Canizales-Quinteros,¹¹ Francisco Rothhammer,⁶ Gabriel Bedoya,⁵ Andres Ruiz-Linares,² and Rolando González-José^{1*}

¹Centro Nacional Patagónico, CONICET, Puerto Madryn, Argentina

²Department of Genetics, Evolution and Environment, and UCL Genetics Institute, University College London, London, UK

³Escuela Nacional de Antropología e Historia, Instituto Nacional de Antropología e Historia, Distrito Federal, Mexico

⁴Posgrado en Antropología, Facultad de Filosofía y Letras, UNAM, México City, Mexico

⁵Departamento de Antropología, Facultad de Ciencias Humanas y Sociales, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

⁶Instituto de Alta Investigación Universidad de Tarapacá, Programa de Genética Humana ICBM Facultad de Medicina Universidad de Chile y Centro de Investigaciones del Hombre en el Desierto, Arica, Chile

⁷Facultad de Medicina, UNAM, Distrito Federal, Mexico

⁸Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

⁹Department of Anthropology, University College London, London, UK

¹⁰Laboratorios de Investigación y Desarrollo, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú

¹¹Unidad de Genómica de Poblaciones Aplicada a la Salud, Facultad de Química, UNAM-Instituto Nacional de Medicina Genómica

KEY WORDS facial directional asymmetry; facial fluctuating asymmetry; genetic ancestry; Latin America; geometric morphometrics

ABSTRACT Fluctuating and directional asymmetry are aspects of morphological variation widely used to infer environmental and genetic factors affecting facial phenotypes. However, the genetic basis and environmental determinants of both asymmetry types is far from being completely known. The analysis of facial asymmetries in admixed individuals can be of help to characterize the impact of a genome's heterozygosity on the developmental basis of both fluctuating and directional asymmetries. Here we characterize the association between genetic ancestry and individual asymmetry on a sample of Latin-American admixed populations. To do so, three-dimensional (3D) facial shape attributes were explored on a sample of 4,104 volunteers aged between 18 and 85 years. Individual ancestry and heterozygosity was estimated using more than 730,000 genome-wide markers. Multivariate techniques applied to geometric morphometric data were used to evaluate the magnitude

and significance of directional and fluctuating asymmetry (FA), as well as correlations and multiple regressions aimed to estimate the relationship between facial FA scores and heterozygosity and a set of covariates. Results indicate that directional and FA are both significant, the former being the strongest expression of asymmetry in this sample. In addition, our analyses suggest that there are some specific patterns of facial asymmetries characterizing the different ancestry groups. Finally, we find that more heterozygous individuals exhibit lower levels of asymmetry. Our results highlight the importance of including ancestry-admixture estimators, especially when the analyses are aimed to compare levels of asymmetries on groups differing on socioeconomic levels, as a proxy to estimate developmental noise. *Am J Phys Anthropol* 000:000–000, 2015. © 2014 Wiley Periodicals, Inc.

Grant sponsor: CONICET Latin-American Grant Program, The Leverhulme Trust, BBSRC (UK), Universidad de Antioquia; Grant sponsor: CONICET Latin American grand program; Grant number: 41488 (to M.Q.-S.); Grant sponsor: Leverhulme Trust; Grant number: F/07 134/DF (to A.R.-L.); Grant sponsor: BBSRC; Grant number: BB/I021213/1 (to A.R.-L.); Grant sponsor: Universidad de Antioquia; Grant number: Sostenibilidad de grupos 2013-2014 (to GB).

*Correspondence to: Rolando González-José, Bvd. Brown 2915, U9120ACD Puerto Madryn, Argentina.
E-mail: rolando@cenpat-conicet.gob.ar

Received 6 June 2014; revised 3 December 2014; accepted 11 December 2014

DOI: 10.1002/ajpa.22688

Published online 00 Month 2015 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

© 2014 WILEY PERIODICALS, INC.

Facial asymmetries have been the focus of extensive research from several perspectives, including the assessment of variation in facial asymmetries on healthy young adult subjects (Ercan et al., 2008), facial dysmorphologies produced by prenatal alcohol exposure (Klingenberg et al., 2010b), sexual dimorphism (Claes et al., 2012), the relationship among asymmetries and growth and development (Wilson and Manning, 1996; Ferrario et al., 2001; Djordjevic et al., 2013), and the evaluation of dental fluctuating asymmetry (FA) as an indicator of developmental stress on Neanderthals and anatomically modern populations (Barrett et al., 2012), among others. As a whole, this vast array of studies suggest that the interest of researchers about asymmetry is not only focused on its genetic basis, but also on the putative environmental effects that affect its expression and, obviously, on the way in which both effects interact during the development.

Asymmetry, defined as the lack or absence of symmetry (Van Valen, 1962), has three observable patterns in nature: fluctuating asymmetry (FA), antisymmetry (AS), and directional asymmetry (DA). FA constitute small, random departures from perfect symmetry, and its variation is normally distributed around a mean of zero; AS involve a pattern of left-right variation distributed about a mean of zero, but the frequency distribution departs from normality in the direction of platykurtosis or bimodality; finally, DA displays a pattern of left-right variation distributed about a mean that is significantly different from zero. Mardia et al. (2000) and Schaefer et al. (2006) defined the individual asymmetry (IA) component as the additive decomposition of DA, FA, and measurement error. Among the different asymmetries defined by Van Valen (1962), FA can be seen as the most relevant concerning studies of facial variation because it is considered a common indicator of developmental instability that can be measured directly on bilateral human phenotypic attributes (Palmer and Strobeck, 1986; Møller and Swaddle, 1997; Milne et al., 2003; Little et al., 2008; DeLeon and Richtsmeier, 2009; Özener and Fink, 2010; Özener, 2010; Weisensee, 2013), and it is observable in other animals as well (e.g., Leary and Allendorf, 1989; Clarke, 1993; Møller, 1996; Allenbach et al., 1999; Lens and Van Dongen, 2008; Little et al., 2012). Some previous analyses, however, challenged the existence of such straightforward relationship between FA and developmental instability (McKenzie and Clarke, 1988; Graham et al., 1993; Bjorksten et al., 2000; Lens et al., 2002).

The main goal of the investigations focused on IA has been the characterization of the “*deviation*” of a normal *bauplan*, as a response to a wide array of factors such as sexual selection (Gangestad et al., 2001, 2010), heavy working conditions and socioeconomic status (Özener and Fink, 2010; Özener, 2010a), or attractiveness (Scheib et al., 1999; Gangestad and Thornhill, 2003; Little and Jones, 2003; Rhodes et al., 2009; Zaidel and Hessianian, 2010; Neby and Ivar, 2013). In addition, DA has been reported in humans (McIntyre and Mossey, 2002; Schaefer et al., 2006; DeLeon, 2007; Ercan et al., 2008; Klingenberg et al., 2010b), although it is considered a subtle phenomenon.

Recently, Bigoni et al. (2013) reported a significant relationship between DA/FA and socioeconomic structure. Their analysis identified highest values of DA in the lower socioeconomic levels of the sample. In general, DA is considered to be more determined by genetic fac-

tors, since in principle, one can know the probability of which side of the face will be more or less developed (Møller and Swaddle, 1997). Other studies in non-human animals have consistently found evidence of DA in wing shape of bees (Smith et al., 1997; Klingenberg et al., 2001), mouse mandibles (Leamy et al., 1997), and flies (Klingenberg et al., 1998).

Up to date, the way in which both, directional and fluctuating facial asymmetries, are determined by genetic and/or environmental effects and their putative interaction is far from being completely known. For instance, in their review on the genetics basis of FA, Leamy and Klingenberg (2005; p. 9) stated that “given that the precise relationship between FA and developmental instability remains speculative, our present state of knowledge of the extent of additive genetic variation for developmental instability is even less than that for FA”. A possible explanation for this lack of precision is that the data available to explore the genetic basis of facial asymmetries is scarce. In addition, some heritability estimation of FA are contradictory, reporting low and nonsignificant values for mice mandibular characters (Leamy, 1999); while others authors report significant FA heritability estimation on several species of flies (Scheiner et al., 1991; Santos, 2002). To the best of our knowledge, there are still no case reports providing heritability values FA attributes in human faces. Regarding the genetic basis of DA, Leamy et al. (2000) found three significant QTLs for DA affecting the size of mice mandible characters and accounting for 1% of the total phenotypic variation in DA, which is less than the 3–6% obtained on previous estimations made on mandible characters (Leamy, 1984, 1999; Leamy et al., 1997).

The analysis of asymmetries on admixed populations is an intuitive avenue of research, since potential differences on the pattern and magnitude of DA and FA on subsamples carrying variable levels of admixture could be indicative of the impact of heterozygote genome on the developmental basis of both kinds of asymmetries. Central to this question are the attempts to understand the kinds of genetic effects that might be relevant when widely separated populations admix. As reviewed by Ackermann (2010) a wide range of phenotypic variation is expected when considering expectations for quantitative variation during hybridization. Under a standard polygenic model, where genes with additive effects are responsible for the expression of the continuous traits under study, such traits in hybrids should equal the average of the parental taxa (Falconer and Mackay, 1997). This includes populations of humans that recently diverged and then started to exchange migrants during around five centuries, as is the present case, where it is expected to have fairly small differences in allele frequencies. In such circumstances, F1 hybrids would typically have intermediate phenotypic trait values relative to the parental taxa (Ackermann, 2010). However, admixed individuals can deviate from the average due to many factors that can affect phenotypic variation in a hybrid population, for instance, when in a single gene one allele (e.g., coming from a parental population) masks the effect of other allele in influencing some trait (dominance), or when the action of one gene is modified by one or several other genes (epistasis). Variations produced in such ways often results in substantial variation (Falconer and Mackay, 1997; Ackermann, 2010), including hybrid morphology that is not intermediate (Martínez-Abadías et al., 2006) and/or asymmetries. In

TABLE 1. Sample details concerning age, sex and country for sample of 4,104 volunteers

Country	Age ^a							
	Young adult		Early adult		Middle adult		Advanced adult	
	Sex							
	f	m	f	m	f	m	f	m
Brazil	110	53	336	151	70	49	9	7
Chile	102	184	279	666	61	115	5	1
Colombia	211	129	360	286	1	5	0	0
Mexico	181	87	217	164	45	22	2	2
Peru	65	40	52	34	1	2	0	0
Totals	669	493	1244	1301	178	193	16	10

^a Young adult (18–20), early adult (20–40), middle adult (40–60), and advanced adult (60 and more).

this context, the exploration of the phenotypic expression of asymmetries in an individual and the results of a population level process like admixture would be useful to characterize individual facial asymmetries and population levels of DA and FA.

Among the vast array of human populations that experienced dramatic gene flow on its recent history, Latin Americans are, perhaps, the most interesting case of a tri-hybrid population shaped on a relatively short time period. Indeed, the history of Latin America has been deeply marked by international migration (Pellegrino, 2000). Denevan (1992) estimated an original population of around 50 millions of Native Americans when the Europeans arrived in 1492 to America. The genetic ancestry of admixed Latino populations varies across regions (Wang et al., 2008; Reich et al., 2012; Ruiz-Linares et al., 2014), and theory predicts that this depends on population density of the immigrant and receptor groups, the migration ratio, and a vast array of socioeconomic factors (Relethford, 2012). From the biological point of view, the admixture process in Latin America can be considered as a population process generating complex, nonlinear genetic and phenotypic patterns (Wang et al., 2008). Therefore, some authors referred to this process as “a natural experiment” (Chakraborty and Weiss, 1988). Among the many genetic topics to be addressed, it is particularly interesting to investigate whether the patterns of gene flow, as the main homogenizing evolutionary factor in the Americas, left an observable pattern of DA or FA indicating development instability.

Regarding the influence of admixture on FA, there is no agreement about the topic. For instance some authors found a negative correlation between heterozygosity and FA (Soulé, 1979; Vrijenhoek and Lerman, 1982; Biémont, 1983; Leary et al., 1984; Livshits and Kobylansky, 1985; Mitton, 1993), but this vision is challenged by other studies that report absent or weak correlations (Beacham, 1991; Clarke and Oldroyd, 1996; Vøllestad and Hindar, 1997). A meta-analysis conducted by Vøllestad and Hindar (1997), on 118 individual samples of ectothermic and endothermic animals, concluded that heterozygosity and FA relationship is only weakly supported by available data, and that heterozygosity explains a very small amount of the variation in developmental instability among individuals and populations. In humans, Livshits and Smouse (1993) found no relationship between FA and heterozygosity.

Considering all the above, here we aim to characterize the association among genetic ancestry and IA on a sam-

ple of Latin-American admixed populations. Particularly, we will test the hypothesis that IA is not related to individual’s genetic admixture. In addition, we aim to compare levels of FA at the population level across genome-wide heterozygosity estimates, in order to test the hypothesis that more heterozygous individuals (more admixed or less inbred) with respect to the global populations do not have lower FA values.

MATERIALS AND METHODS

The sample

As part of the CANDELA initiative, we recruited 4,104 volunteers (Table 1) aged between 18 and 85 years (mean = 26.41, s.d. = 9.29), from six Latin-American cities: Mexico City (México), Medellín (Colombia), Lima (Perú), Arica (Chile), Porto Alegre, and Jequié (both in Brazil). The CANDELA consortium aims to evaluate the genetic basis of nonpathological phenotypes differentiated between European, American, and African populations through the analysis of admixed populations (see Ruiz-Linares et al., 2014).

Volunteers with antecedents of craniofacial dysmorphologies, orthodontics treatments or severe facial trauma were not considered in this study. Further sample details are provided in Table 1. Approvals provided by the Ethics Committees of the Universidad Nacional Autónoma de México and Escuela Nacional de Antropología e Historia (México), Universidad de Antioquia (Colombia), Universidad Peruana Cayetano Heredia (Perú), Universidad de Tarapacá (Chile), Universidade Federal do Rio Grande do Sul/Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (Brazil), and University College London (UK) were obtained prior the data collection, and an informed consent were signed by each participant before genetic, socioeconomic, and facial phenotypes data was collected.

Facial shape data collection

The 3D facial shape was captured using photogrammetric methods applied to three series, each consisting of five digital photographs from left side (0°), left angle (45°), frontal (90°), right angle (135°), and right side (180°) views. All photos were taken manually from ~1.5 meters at eye level using a Nikon D90 and a fixed 50mm AF Nikkor lens at aperture f/11, as implemented in previous studies (Galantucci et al., 2008; de Menezes et al., 2009; Cooper et al., 2012). These settings give a depth of field of 40 cm, about twice the dimensions of

TABLE 2. Facial landmark anatomical definitions including 8 sagittal and 13 bilateral landmarks

No.	Name	Definition
Sagittal landmarks		
1	Glabella	The smooth area between the eyebrows just above the nose
18	Nasion (sellion)	The midpoint of the nasofrontal suture
19	Pronasal	The most protruded point of the nasal tip
21	Subnasal	The junction between the lower border of the nasal septum and the cutaneous portion of the upper lip in the midline
23	Labiale superius	The midpoint of the vermilion border of the upper lip
26	Stomion	The midpoint of the labial fissure when the lips are closed naturally
29	Labiale inferius	The midpoint of the vermilion border of the lower lip
30	Gnathion	The lowest point in the midline on the lower border of the chin
Bilateral landmarks		
2, 10	Frontotemporale	The most medial point on the temporal crest of the frontal bone
3, 11	Superaurale	The highest point of the free margin of the ear
4, 12	Tragion	The tip of tragus
5, 13	Subaurale	The lowest point of the ear lobe
6, 16	Exocanthion	The outer corner of the eye fissure where the eyelids meet
7, 15	Palpebrale superiorus	The superior point of the eyelid
8, 14	Endocanthion	The inner corner of the eye fissure where the eyelids meet
9, 17	Palpebrale inferiorus	The inferior point of the eyelid
20, 22	Alare	The most lateral point on the nasal ala
24, 28	Crista philtre (upper lip point)	Highest point of the upper vermilion
25, 27	Cheilion	The outer corner of the mouth where the outer edges of the upper and lower vermilions meet
31, 33	Otobasion superiorus	The superior point on the union of the lobule and the head
32, 34	Otobasion inferiorus	The basal point on the union of the lobule and the head

See Figure 1 for a visual reference.

an average human head, ensuring that the whole face was in focus in all the photographs. We used the flash integrated to the camera. From the three series formed by five photographs each, the one presenting the most neutral expression was selected for the 3D reconstruction.

A set of 34 standard facial landmarks (Table 2; Fig 1) where placed using the software Photomodeler (<http://www.photomodeler.com/>; Eos Systems, Vancouver, Canada). We have followed the standard recommendations for quality and accuracy of the software (i.e., residual

values inferior to 5.0, optimal camera calibration, camera resolution, photo redundancy, etc.). Several types of lens distortion are fixed during the camera calibration procedure automatically implemented in Photomodeler.

Several previous articles have entailed precision and accuracy experiments of 3D human faces reconstructed after photogrammetry (Galantucci et al., 2008, 2010; de Menezes et al., 2009; Alias et al., 2010), and some of them, using similar conditions to the ones implemented by us, report that the advantage of the presented (photogrammetric) method over laser scanning or

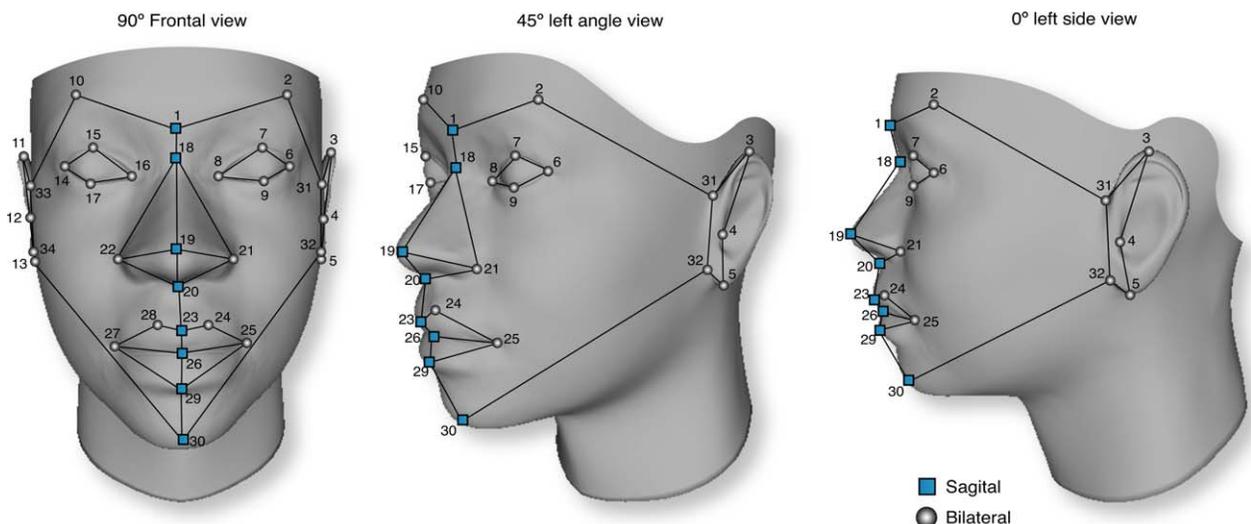


Fig. 1. Anatomical location of the landmarks used in this study. Frontal, frontal-lateral, and left side views. Gray squares and black points indicate sagittal and bilateral landmarks, respectively (see Table 2 for anatomical definitions) [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

electromagnetic digitizer is the acquisition of the source data in short time (D'Apuzzo, 1998, 2002; Galantucci et al., 2008; de Menezes et al., 2009), and show that systematic errors between direct measurements versus photogrammetric reconstructions using Photomodeler were found insignificant (below 2 mm). In terms of measurement precision, the 3D photos were clearly better than direct anthropometry, and they had the highest overall precision, without systematic biases found between repeated measurements on the same photographs or on different photographs (Weinberg et al., 2006; Abdulkareem and Al-Mothaffar, 2012).

A scale factor was assessed using the nasion-gnathion distance that was measured directly on the individuals using a standard caliper. Chelion-chelion distance was also measured directly on the individuals, enabling the comparison of two scale factors obtained from the 3D reconstruction using these two facial distances as reference. A very high concordance (>93% correlation) indicates accuracy of the Photomodeler method, consistent with other studies (Lynnerup et al., 2003).

Raw 3D coordinates obtained from Photomodeler were saved in a text file and were used on subsequent analyses.

Estimation of genetic ancestry

On each individual, blood samples were collected and DNA extraction was performed following standard laboratory procedures. Genomic data involving 730,525 marker SNPs was obtained from these samples (see further details in Ruiz-Linares et al., 2014). The SNPs were pruned to remove Linkage Disequilibrium, and after removing correlated SNPs, 90,000 SNPs were left for analysis. Ancestry estimation was performed with this SNP data. Genome-wide average heterozygosity was estimated from this data using PLINK (Purcell et al., 2007; Yang et al., 2010), which provides a measure of excess heterozygosity compared to the overall sample. It is calculated as $1 - \text{excess homozygosity}$, while excess homozygosity is estimated using the inbreeding coefficient as the average excess of homozygous alleles across all SNPs for an individual as compared to the overall sample.

Intra and interobserver error analysis

Since landmark data was obtained by two different observers (MQS and LC), and considering that measurement error was identified as an important noising factor in asymmetry studies (Palmer and Strobeck, 1986; Graham et al., 1993; Merila and Björklund, 1995; Björklund and Merilä, 1997; Dongen, 1998; Palmer, 2000) we performed specific tests to measure between and within-individual measurement errors. To do so, we collected fifteen observations per observer of one individual (an adult male) selected randomly from the whole sample. The raw landmark coordinates were superimposed using the Generalized Procrustes fit implemented in MorphoJ 1.05 (Klingenberg, 2011). The error assessment was performed following Singleton (2002). First, the Euclidean distance of each landmark to its respective centroid was computed. Second, landmark deviations were calculated relative to the individual landmark mean and mean deviations and percentage errors were calculated for individual landmarks and subsequently averaged to give a mean deviation and percentage error for each observer across all landmarks. Finally, a one-way analysis of var-

iance (ANOVA) was conducted for each landmark by observer, and the root mean squares [root mean square error (RMSE)] were examined. The root of the within-groups mean squares (RMSE) corresponds to the intra-observer error (Sokal and Rohlf, 1995), while the root of between-groups mean squares corresponds to interindividual (among replicates) error (for details Singleton, 2002). Additionally, another indicator of error in the experiment was the implementation of a Procrustes ANOVA; where measurement error is computed from the variation among replicate measurements, see below (Klingenberg et al., 2002).

Multivariate characterization of facial asymmetry

As a first exploratory analysis, the asymmetric component of shape was submitted to a PCA analysis in order to identify the main trends of asymmetrical morphological variation (Klingenberg, 2011). Then, a Procrustes ANOVA and multivariate analysis of variance (MANOVA) were used to characterize the asymmetric component of shape variation in the facial phenotype (Klingenberg and McIntyre, 1998). Following Klingenberg et al. (2002, 2010a), organisms displaying object symmetry need a special procedure to characterize the relative amounts of symmetric and asymmetric shape variation components. The analyses for landmark configurations with object symmetry separates the original landmark configuration into components of symmetric variation and asymmetry by Procrustes superimposition of the original configurations and their mirror images (Klingenberg et al., 2002), in order to get individual facial fluctuating asymmetry (FFA) scores. The Procrustes ANOVA model estimates the significance of an individual effect, a side effect informative of DA, an individual-by-side interaction effect that indicates the amount of FA, and the measurement error effect (Klingenberg and McIntyre, 1998; Mardia et al., 2000). *P* values were calculated using a permutation test based on 100,000 iterations of the original data. To estimate the error term we performed a repeated landmarking of the faces, where we landmarked again a subset of 200 faces chosen across all the five countries. Considering that most biological forms present a nonisotropic distribution of variance across landmarks (Klingenberg et al., 2002), we also took into consideration the results of a MANOVA test that further considers the nonisotropic nature of landmark configurations to estimate DA and FA effects. Sex is included as a covariate contributing another main effect in the ANOVA.

Correlation and regression of FFA score on covariates

FFA scores were estimated from the Procrustes landmarks using procedures described in Klingenberg and McIntyre (1998) under a nonisotropic model, thus avoiding the homogeneity assumption, using the Mahalanobis distance metric. The FFA score was considered to be the trait of interest, and its regression against all the covariates was then evaluated. The list of covariates includes age, sex, BMI, weight, height, education, wealth-index, melanin, heterozygosity, and continental ancestries. In the case of BMI, it is noteworthy to mention that some previous studies have found a relationship between FA and BMI (Milne et al., 2003; Windhager et al., 2013).

As the three ancestry variables add up to 100%, to avoid colinearity problems we considered Native

TABLE 3. Procrustes ANOVA and MANOVA results with sex as covariate

Procrustes ANOVA					
Effect	SS	MS	df	F	P (param.)
Sex	0.4987866	0.0097801	51	163.98	<.0001
Individual	12.6538792	0.0000596	212160	6.64	<.0001
DA	0.0746448	0.0016965	44	188.74	<.0001
FA	1.6456741	0.0000090	183084	1.24	<.0001
Error	0.1132016	0.0000072	15675		

MANOVA					
Symmetric component			Asymmetry component		
Effect	Pillai tr.	P (param.)	Effect	Pillai tr.	P (param.)
Sex	0.66	<.0001	Sex	0.1	<.0001
Individual	51.52		DA	0.75	<.0001
			FA	43.02	<.0001

ancestry as the baseline and included African and European ancestry in the regression (Ruiz-Linares et al., 2014). All shape changes were visualized using warped surfaces (Wiley et al., 2005). Additionally, the shape changes depicted by the regression of shape on genetic ancestry (after removing the effects of covariates) were combined with a triplot graph obtained from the distribution of ancestry estimates for the three parental groups.

RESULTS

Intra- and interobserver error analysis

The mean landmark deviation for the inter-replicate (within-observer) error was 0.0012 in units of Procrustes distances (min. = 0.0004, max. = 0.0059), and 0.0010 (min. = 0.0004, max. = 0.0026), for observer 1 (MQS) and 2 (LC), respectively. Mean landmark deviation for the interobserver error was 0.0435 (min. = 0.0004, max. = 0.1047). The interobserver differences are two orders above the inter-replicate error in all landmarks and both observers. The ANOVA results showed that the mean interobserver (MQS/LC) RMSE is 0.00088 (0.91%), and 0.00067 (1.08%) for the intraobserver comparison. The lowest interobserver repeatability errors were detected on the landmarks superior lateral tragon (left), subaurale (left), and subaurale (right), whereas the greatest errors were detected on endocanthion (left), endocanthion (right), and subnasale. The Procrustes ANOVA showed that mean squares for the error component present far lower values than the mean squares for FA (Table 3) Considering the relatively large size of the faces studied here, and that the interobserver and inter-replicate errors are lower than the interindividual differences, these margins of error were considered acceptable.

Both sex, DA and FA appear highly significant in the Procrustes ANOVA (Table 3) and in the nonisotropic model (MANOVA), which is not limited by the assumption of isotropy in the data (Klingenberg et al, 2002; Table 3)

The asymmetric shape was submitted to a PCA analysis in order to identify the main trends in asymmetrical morphological variation. The shape changes associated to PC1 (22.015% of explained variance) are focused in the ear lobes, nose and mouth, showing a left DA tendency in the positive axis. Ear lobes fluctuate along the

first PC regarding its anterior-posterior position, reaching more anterior positions on the right side of the face. The mouth, nose and to a greater extent the eyes follow the general directional shifts observed in the face. The second PC (11.04% of explained variance) describes superior-inferior DA changes such as a left displacement of the chin and mouth, and a more basal position of the left ear lobes and. Conversely the nose, eyes and right ear lobe change to right superior positions (changes observable toward the positive values of PC2). Finally, PC3 (9.61% of explained variance) express changes related to the DA of the ears, attachment and protrusion (Fig. 2).

The triplot (Fig. 3) representing genetic ancestry and associated asymmetric shape changes indicates that Amerindians exhibit right asymmetrical shifts related to ear attachment, the chin, nose, and lower part of the frontal (nasion). Conversely, asymmetric changes associated to the European vertex describe changes at the left side of the face (Fig. 3). Finally, African vertex describes changes associated to ear attachment and protrusion in the left side, accompanied by changes in the nose and the left side of the frontal area (Fig. 3).

Correlation and regression of FFA score on covariates

As depicted in Table 4 almost all of the correlations were significant at $P < 0.00001$. Sex, height, melanin, education, wealth, African ancestry, and heterozygosity have negative correlations with FFA. In contrast, age, weight, BMI and American ancestry showed positive correlations. Multiple regression results (Table 5) show that FFA scores strongly depend on age, sex, ancestry, and heterozygosity (whole model R^2 : 9184%, $P < 0.00001$). Asymmetry increases with age (Fig. 4a), while FFA is lower in males. FFA shows a negative correlation with heterozygosity (Fig. 4b), and European and African ancestries are negatively associated with FFA while Native ancestry is positively correlated. Height and BMI do not seem to be associated to FFA. Education appears to be positively associated with FA, but the correlation with education can be seen as a by-product of the correlation with age (age and education are obviously correlated). Wealth index is only slightly correlated with FA.

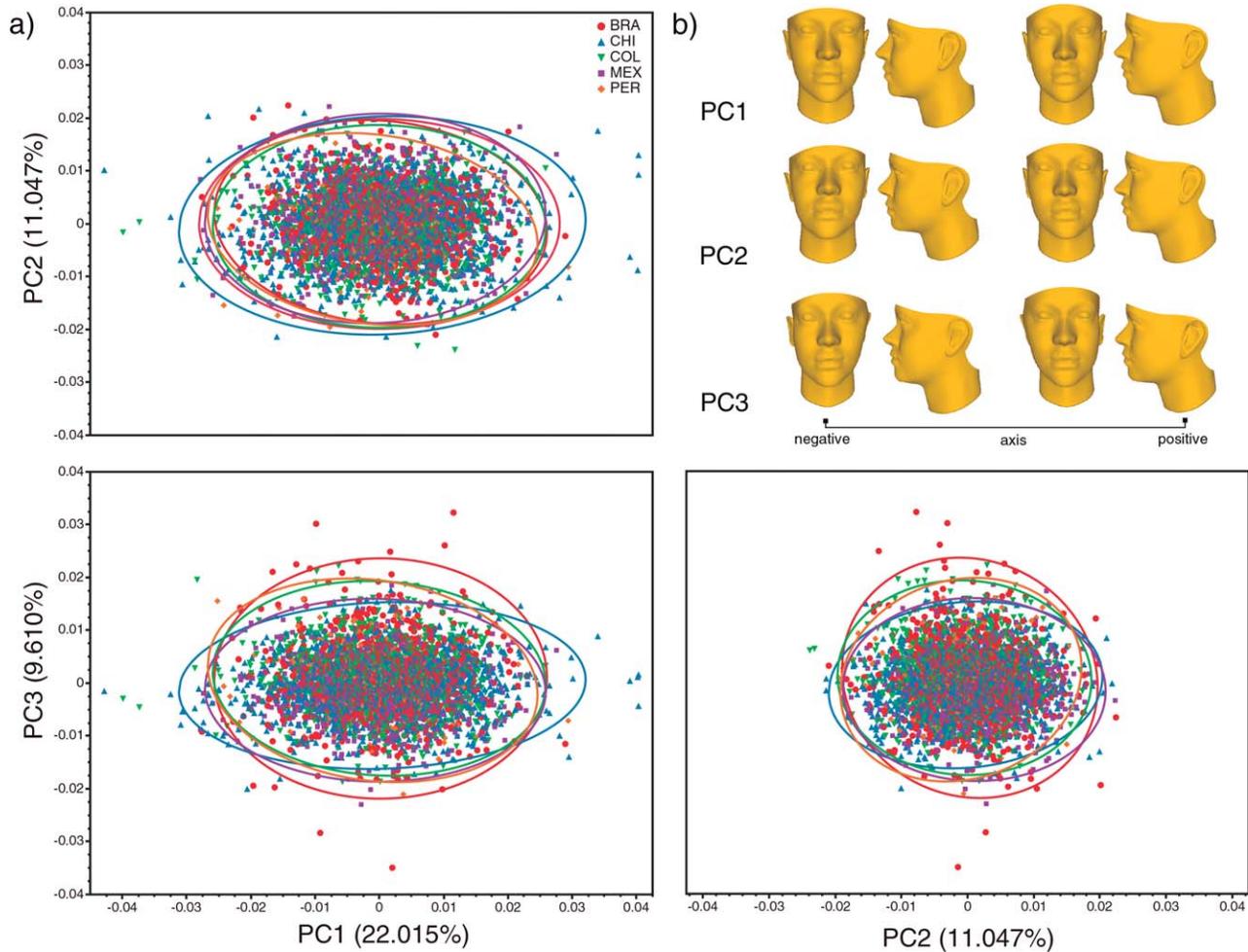


Fig. 2. Principal Components Analysis. Scatterplots and morphings of the asymmetric component of shape variation (a). Ellipses represent the 99% of the variance. Morphings represent the extreme shapes observed on the negative and positive scores of each PC (b). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

DISCUSSION

A central goal of many hybridization studies is to measure the degree to which hybridization results in introgression of genetic material between populations (Strasburg and Rieseberg, 2013), with Mayr's idea in mind (Mayr, 1963) that phenotypic divergence is often correlated with the degree of isolation. Gene flow has the effect of homogenizing the genetic composition of a population and thus can be seen as a constraining evolutionary force (Slarkin, 1985), with an opposite effect to that of diversifying natural selection. Additionally, migration has two main effects: it reduces the between-group differences, and increases variances within demes (Königsberg, 2000; Hamilton, 2009). The analysis of human admixed samples contributes by identifying the morphological effects of hybridization in populations that have diverged during the human

diaspora in the Pleistocene and Early Holocene. In this context, our study sheds light on some aspects regarding dominance/epistasis by exploring if admixed individuals are a balanced mixture of parental traits (asymmetries, in this case), intermediate between parental populations. As discussed previously (Ackermann, 2010; Ackermann et al., 2006), admixed individuals can show a range of morphologies, resembling one parental group or the other, or displaying novel phenotypes, depending on dominance and epistatic interactions between alleles fixed or predominant in either parental group. In this context, asymmetries are expected in highly admixed individuals, due to the putative developmental disturbances introduced by hybridization at the genetic and environmental levels. By large, previous research aimed to empirically test these predictions were focused on detecting craniofacial variations in size and shape in the context of

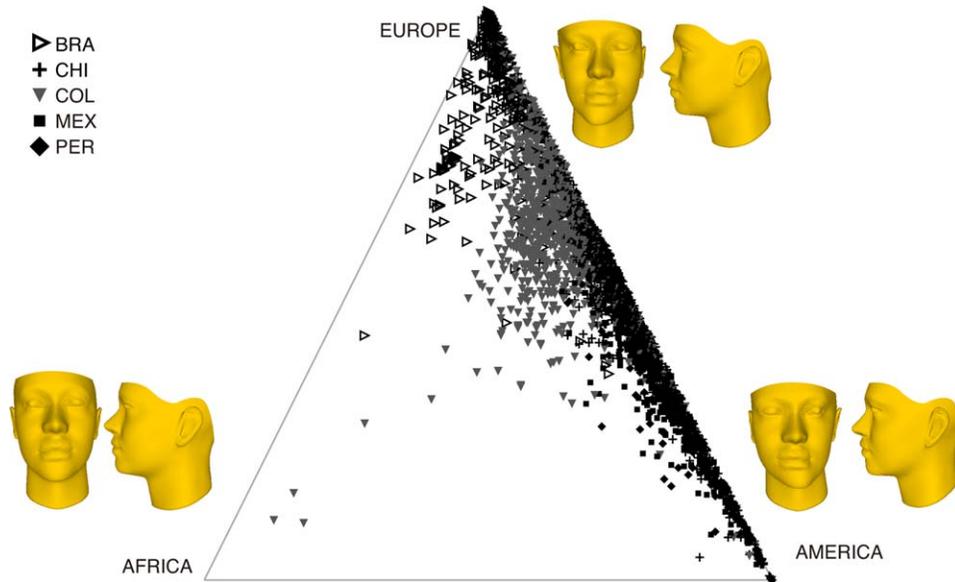


Fig. 3. Triplot of the genome-wide genetic ancestry estimation and their respective asymmetric shape changes, obtained after the regression of the asymmetric component of shape and genetic ancestry. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

variable genetic admixture. For instance, Wijsman and Cavalli-Sforza (1984) reviewed the implications of gene flow in human populations showing that theoretically, in presence of large migratory events, migrants produce a dialectic hybrid populations by intermingling with native populations (Wijsman and Cavalli-Sforza, 1984). On their comparison among Mexican colonial skull samples, Martínez-Abadías et al. (2006) showed that the craniofacial phenotypes resulting from Spanish-Amerindian admixture departs from an intermediate position in the morphospace between parental groups, thus suggesting that heterosis phenomena underlie the behavior of craniofacial phenotypes in admixed populations. On the same line, in their study on baboon hybrids produced in captivity and on natural populations, Ackermann et al. (2006) further verified the significant signals of craniofacial heterosis, suggesting caution against simple assumptions that hybrids will display the average of parental phenotypes (Ackermann, 2010).

Besides these and other similar studies focused on absolute shape differences, the relationship between admixture and craniofacial asymmetries in humans or other primates received less attention. In this context, departures from ideal conditions during ontogeny (i.e., environmental or genetic stress) may reduce the “efficiency” of normal developmental processes and increase the level of FA (Palmer and Strobeck, 1986; Parsons, 1990; Clarke, 1993; Møller and Swaddle, 1997) and/or DA (McIntyre and Mossey, 2002; Hennessy et al., 2004; Schaefer et al., 2006; DeLeon, 2007; Ercan et al., 2008; Klingenberg et al., 2010b; Barrett et al., 2012; Claes et al., 2012). Associations between heterozygosity and FA have been reported in mammals and other species (Soulé, 1979; Biéumont, 1983; Leary et al., 1984; Palmer and Strobeck, 1986; Mitton, 1993; Vøllestad, 1999; Leamy et al., 2001), with some exceptions (Wooten and Smith, 1986; Patterson and Paton, 1990; Beacham,

1991; Britten, 1996; Gilligan et al., 2000; Leamy et al., 2001). Moreover, FA seems to increase with increasing homozygosity, hybridization, inbreeding, mutation (Palmer and Strobeck, 1986, 1992; Clarke, 1992; Møller and Swaddle, 1997). In his meta-analysis of FA in relation to heterozygosity, Vøllestad et al. (1999) found an overall negative correlation between heterozygosity and FA, suggesting that heterozygosity seems to explain only a very small amount of the variation in developmental instability among individuals and populations. In the same line, Windhager et al. (2014) shows lack of correlation between heterozygosity and Procrustes FFA scores, but they recognize a limitation in their results due to the relatively small number of SNPs (102 SNP's) used, which may limit the representative value in terms of an individual's total heterozygosity.

Our results indicate that both DA and FA are present in the analyzed sample, with varying expressions in the three parental groups, and suggested that facial asymmetries tend to decrease in admixed Latin American individuals (Fig. 4b). Overall, these results suggest that, if FA is assumed to be a proxy to developmental instability, then admixed individuals present a slightly more stable development than homozygous ones. This

TABLE 4. Correlations of FFA scores on covariates

Variable	Correlation	<i>P</i> value
Sex	-0.073	3.00E-06
Age	0.231	6.30E-51
Weight	0.038	1.50E-02
Height	-0.07	6.40E-06
BMI	0.096	6.90E-10
Melanin	-0.045	4.10E-03
African ancestry	-0.094	1.40E-07
European ancestry	-0.11	6.10E-10
American ancestry	0.129	3.30E-13
Heterozygosity	-0.146	4.00E-16

TABLE 5. Multivariate regression output of FFA scores on covariates

Variable	Estimate	Std. error	t statistic	P value
Age	0.027281	0.00199	13.712	2.00E-16
Sex	-0.23666	0.052547	-4.504	6.88E-06
Weight	0.001907123	0.001220825	1.56	0.1183
Height	0.001826	0.002905	0.629	0.53
BMI	0.005072	0.004592	1.105	0.269
Melanin	-0.008200114	0.002878823	-2.85	0.0044
African ancestry	-1.66279	0.347125	-4.79	1.75E-06
European ancestry	-0.704101	0.098411	-7.155	1.04E-12
Heterozygosity	-2.76366	0.308706	-8.952	2.00E-16

Whole model adjust R^2 : 9.184%, $P < 0.00001$, 100,000 rounds

reinforces the idea that the novel genetic and environmental landscape of the admixed individuals in Latin America does not represent a case of developmental instability enough to trigger the expression of asymmetric phenotypes. Furthermore, and given the negative relationship between heterozygosity and FFA, these results lend support to the idea that the genetic basis of such asymmetries can be seen as a case of underdominance, rather than an additive, dominance, or epistatic scenario (see Ackermann, 2010; Ackermann et al., 2006).

In terms of type of asymmetry, our data indicates that DA is more important than FA as a source of facial asymmetries, bringing support to previous works suggesting a greater component of DA on the asymmetric normal variation in the human cranium, face and dentition (Schaefer et al., 2006; DeLeon, 2007; Ercan et al., 2008; Barrett et al., 2012; Claes et al., 2012), as well as on dimorphological samples (McIntyre and Mossey, 2002; Hennessy et al., 2004; Klingenberg et al., 2010b). Traditional views states that DA is more genetically determined, and thus could be likely used as a proxy to developmental stability (Palmer, 1994). However, other authors suggest that DA could also be indicative of certain mechanisms involving developmental instability (Graham et al., 1993; Møller and Swaddle, 1997; Smith et al., 1997). More specifically, Graham et al. (1993) using a modified Rashevsky-Turing reaction-diffusion model of morphogenesis, showed that both AS and DA can be induced by simply changing the levels of feedback and inhibition in the model. Unfortunately, our data are not appropriate to test the hypothesis of DA as a proxy to developmental instability, but it is interesting to note how DA and FA levels differ among ancestral groups (e.g., among individuals carrying high percentage of European, Amerindian, or African ancestry). This could be indicative that the basal condition for any given population is not perfect symmetry, but some varying level of both, DA and FA (Farrera et al., 2014).

On the other hand, FA patterns were widely assumed as indicators of development instability (Palmer and Strobeck, 1986; Livshits and Kobylansky, 1991; Møller and Swaddle, 1997; Milne et al., 2003 b; DeLeon, 2007; Little et al., 2008; DeLeon and Richtsmeier, 2009; Özener, 2010a, b, 2011; Özener and Fink, 2010; Weisensee, 2013). Our results indicate that, even though FA explains a smaller fraction of variation than DA, its contribution to the total amount of asymmetrical variation is significant. Interestingly, matrix comparison tests yielded significant degrees of

proportionality among individual and asymmetry covariance structures, thus suggesting that the same developmental processes underlie the expression of shape variation at both levels (Klingenberg and McIntyre, 1998). Another important aspect when dealing with comparisons among DA and FA is that, usually, it is assumed that the “normal” expectance, or optimal phenotype for a population is $FA = 0$ or perfect symmetry, which is not necessarily a strong null hypothesis as Debat and David (2001) argues and Farrera et al. (2014) suggest for a sample of Mexicans.

Finally, it is important to contextualize that a great amount of research on facial asymmetries is aimed test a potential dependence on socioeconomic, educational, or nutritional status indexes of a wide array of populations and cultural contexts (DeLeon, 2007; Gawlikowska et al., 2007; Gray and Marlowe, 2009; Özener, 2010a, 2011; Bigoni et al., 2013; Hope et al., 2013). In general, these analyses depart from the premise that exposure of nutritional or psychosocial stress during gestation and pre-natal development could derive on an alteration of “normal” (perfect symmetry) developmental pathways leading to directional, but mainly FA. In this context, the regression of asymmetric facial shape on genetic ancestry revealed that its magnitude tend to decrease with admixture. In other words, individuals with larger proportions of a parental genetic background are more asymmetric, and its asymmetrical traits differ depending on the parental population. This result seems to be concordant with previous analyses suggesting that there is no single asymmetry pattern in our species (Farkas and Cheung, 1981; Ras et al., 1994; Ferrario et al., 1995; Shaner et al., 2000; Smith, 2000; Ercan et al., 2008; Klingenberg et al., 2010b; Özener, 2010b).

CONCLUSIONS

Differential patterns and magnitudes of DA and FA are observed among the subsamples of admixed individuals exhibiting greater amounts of Amerindian, African, or European genetic ancestry. As a whole, more admixed individuals exhibit lower levels of asymmetry, which lend support to the notion that the expression of facial asymmetry is not directed by dominant or epistatic effect, and that the genetic and environmental conditions of admixed individuals cannot be seen as a case of developmental instability. DA appears to be the greatest manifestation of asymmetry, in comparison to FA. Our results highlight the importance of considering ancestry-admixture when comparing levels of asymmetries on

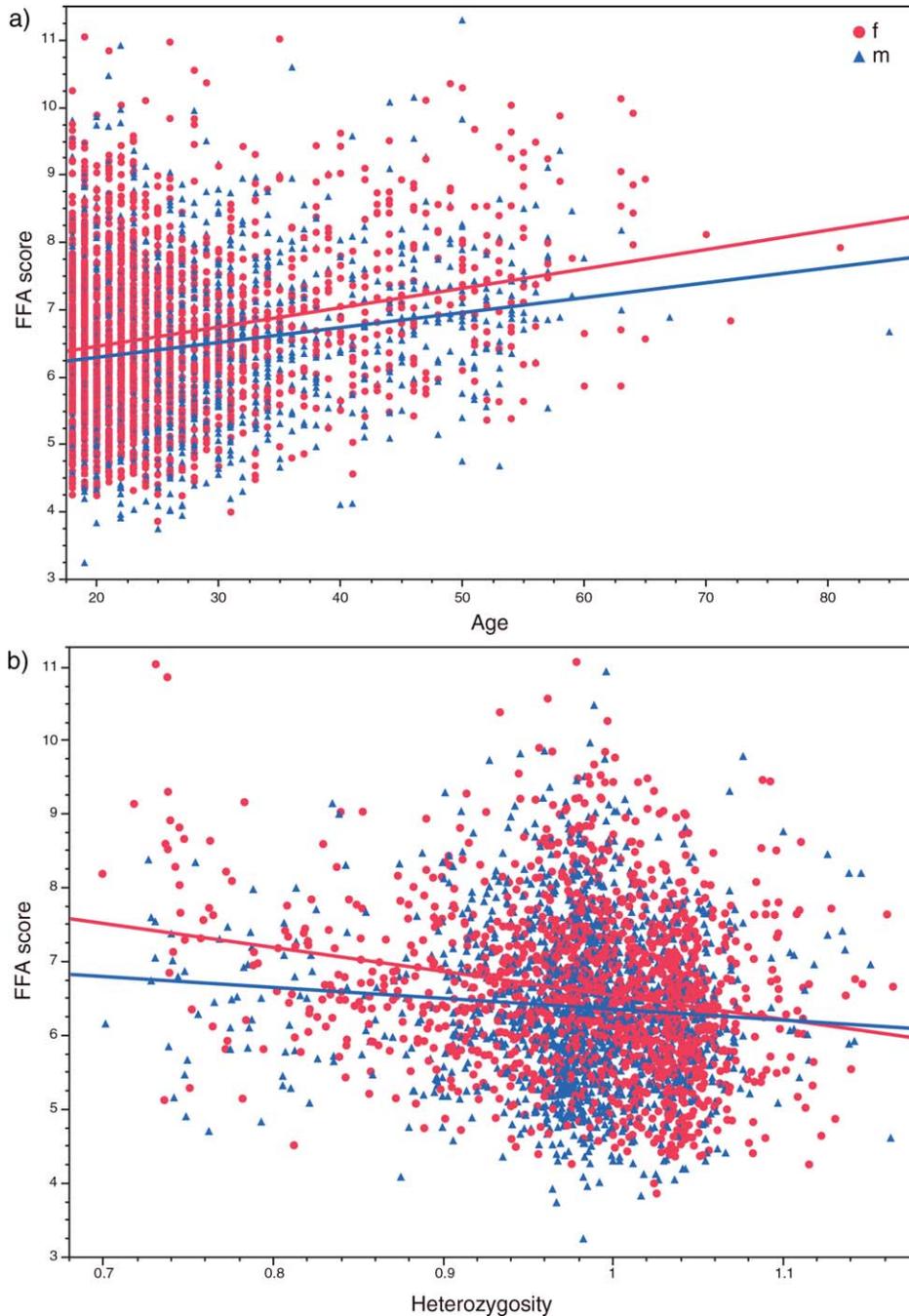


Fig. 4. Plots of the FFA scores on covariates [plotting age (a) and heterozygosity (b)]. Lines represent the axis of regression by sex (triangles and black line = males, circles and gray line = females). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

groups differing on socioeconomic levels. Future research on the CANDELA database will be focused on testing if putative differences on asymmetries among socioeconomic status vanish when controlling the effects of ancestry.

Lavinia Schuler-Faccini and David Balding, who contributed extensively in the CANDELA project. We thank the reviewers for their careful reading of the article and helpful suggestions.

ACKNOWLEDGMENTS

We are extremely grateful to the volunteers for their enthusiastic support of this research. Special thanks to

LITERATURE CITED

Abdulkareem S, Al-Mothaffar N. 2012. Accuracy and precision of a photographic system for the three-dimensional study of facial morphology. *J Baghdad Coll Dent* 24:138–145.

- Ackermann R. 2010. Phenotypic traits of primate hybrids: recognizing admixture in the fossil record. *Evol Anthropol* 19: 258–270.
- Ackermann RR, Rogers J, Cheverud JM. 2006. Identifying the morphological signatures of hybridization in primate and human evolution. *J Hum Evol* 51:632–645.
- Alias NA, Majid Z, Setan H. 2010. Camera configuration for accurate craniofacial mapping using photomodeler scanner. *Geoinf Sci J* 10:61–72.
- Allenbach DM, Sullivan KB, Lydy MJ. 1999. Higher fluctuating asymmetry as a measure of susceptibility to pesticides in fishes. *Environ Toxicol Chem* 18:899–905.
- Barrett CK, Guatelli-Steinberg D, Sciulli PW. 2012. Revisiting dental fluctuating asymmetry in neandertals and modern humans. *Am J Phys Anthropol* 149:193–204.
- Beacham TD. 1991. Developmental stability, heterozygosity, and genetic analysis of morphological variation in pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*). *Can J Zool* 69:274–278.
- Biémont C. 1983. Homeostasis, enzymatic heterozygosity and inbreeding depression in natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetica* 61:179–189.
- Bigoni L, Krajčiček V, Sládek V, Velemínský P, Velemínská J. 2013. Skull shape asymmetry and the socioeconomic structure of an early medieval central European society. *Am J Phys Anthropol* 150:349–364.
- Björklund M, Merilä J. 1997. Why some measures of fluctuating asymmetry are so sensitive to measurement error. *Ann Zool Fennici* 34:133–137.
- Bjorksten T, David P, Pomiankowski A, Fowler K. 2000. Fluctuating asymmetry of sexual and nonsexual traits in stalk-eyed flies: a poor indicator of developmental stress and genetic quality. *J Evol Biol* 13:89–97.
- Britten HB. 1996. Meta-analyses of the association between multilocus heterozygosity and fitness. *Evolution* 50:2158–2164.
- Chakraborty R, Weiss KM. 1988. Admixture as a tool for finding linked genes and detecting that difference from allelic association between loci. *Proc Natl Acad Sci* 85:9119–9123.
- Claes P, Walters M, Shriver MD, Puts D, Gibson G, Clement J, Baynam G, Verbeke G, Vandermeulen D, Suetens P. 2012. Sexual dimorphism in multiple aspects of 3D facial symmetry and asymmetry defined by spatially dense geometric morphometrics. *J Anat* 221:97–114.
- Clarke GM, Oldroyd BP. 1996. The genetic basis of developmental stability in *Apis mellifera* II. Relationships between character size, asymmetry and single-locus heterozygosity. *Genetica* 97:211–224.
- Clarke GM. 1992. Fluctuating asymmetry: a technique for measuring developmental stress of genetic and environmental origin. *Acta Zool Fenn* 191:31–35.
- Clarke GM. 1993. Fluctuating asymmetry of invertebrate populations as a biological indicator of environmental quality. *Environ Pollut* 82:207–211.
- Cooper EA, Piazza EA, Banks MS. 2012. The perceptual basis of common photographic practice. *J Vis* 12:8.
- D'Apuzzo N. 1998. Automated photogrammetric measurement of human face. *Arch Photogramm Remote Sens* 32:402–407.
- D'Apuzzo N. 2002. Surface measurement and surface tracking of human body parts from multiimage video sequences. *ISPRS J Photogramm Remote Sens* 56:360–375.
- de Menezes M, Rosati R, Allievi C, Sforza C. 2009. A photographic system for the three-dimensional study of facial morphology. *Angle Orthod* 79:1070–1077.
- Debat V, David P. 2001. Mapping phenotypes: canalization, plasticity and developmental stability. *Trends Ecol Evol* 16: 555–561.
- DeLeon VB, Richtsmeier JT. 2009. Fluctuating asymmetry and developmental instability in sagittal craniosynostosis. *Cleft Palate Craniofac J* 46:187–196.
- DeLeon VB. 2007. Fluctuating asymmetry and stress in a medieval Nubian population. *Am J Phys Anthropol* 132:520–534.
- Denevan W. 1992. The native population of the Americas in 1492. Madison, WI: The University of Wisconsin Press.
- Djordjevic J, Pirttiniemi P, Harila V, Heikkinen T, Toma AM, Zhurov AI, Richmond S. 2013. Three-dimensional longitudinal assessment of facial symmetry in adolescents. *Eur J Orthod* 35: 143–151.
- Dongen S V. 1998. How repeatable is the estimation of developmental stability by fluctuating asymmetry? *Proc R Soc B Biol Sci* 265:1423–1427.
- Ercan I, Ozdemir ST, Etoz A, Sigirli D, Tubbs RS, Loukas M, Guney I. 2008. Facial asymmetry in young healthy subjects evaluated by statistical shape analysis. *J Anat* 213:663–669.
- Farrera A, Villanueva M, Quinto-Sánchez M, González-José R. 2014. The relationship between facial shape asymmetry and attractiveness on Mexican students. *Am J Hum Biol*. doi: 10.1002/ajhb.22657. [Epub ahead of print]
- Falconer D, Mackay T. 1997. Introduction to quantitative genetics. Edinburgh: Longman.
- Farkas LG, Cheung G. 1981. Facial asymmetry in healthy North American Caucasians. An anthropometrical study. *Angle Orthod* 51:70–77.
- Ferrario VF, Sforza C, Ciusa V, Dellavia C, Tartaglia GM. 2001. The effect of sex and age on facial asymmetry in healthy subjects: a cross-sectional study from adolescence to mid-adulthood. *J Oral Maxillofac Surg* 59:382–388.
- Ferrario VF, Sforza C, Miani A Jr, Serrao G. 1995. A three-dimensional evaluation of human facial asymmetry. *J Anat* 186:103–110.
- Galantucci LM, Percoco G, Dal Maso U. 2008. Coded targets and hybrid grids for photogrammetric 3D digitization of human faces. *Virtual Phys Prototyp* 3:167–176.
- Galantucci LM, Percoco G, Di Gioia E. 2010. Low cost 3D face scanning based on landmarks and photogrammetry. In: Huang X, Sio-Long A, Castillo O, editors. Intelligent automation and computer engineering. Netherlands: Springer. p 93–106.
- Gangestad SW, Bennett KL, Thornhill R. 2001. A latent variable model of developmental instability in relation to men's sexual behaviour. *Proc Biol Sci* 268:1677–1684.
- Gangestad SW, Merriman LA, Emery Thompson M. 2010. Men's oxidative stress, fluctuating asymmetry and physical attractiveness. *Anim Behav* 80:1005–1013.
- Gangestad SW, Thornhill R. 2003. Facial masculinity and fluctuating asymmetry. *Evol Hum Behav* 24:231–241.
- Gawlikowska A, Szczurowski J, Czerwiński F, Miklaszewska D, Adamiec E, Dzieciółowska E. 2007. The fluctuating asymmetry of medieval and modern human skulls. *Homo* 58:159–172.
- Gilligan DM, Woodworth LM, Montgomery ME, Nurthen RK, Briscoe DA, Frankham R. 2000. Can fluctuating asymmetry be used to detect inbreeding and loss of genetic diversity in endangered populations? *Anim Conserv* 3:97–104.
- Graham JH, Freeman DC, Emlen JM. 1993. Antisymmetry, directional asymmetry, and dynamic morphogenesis. *Genetica* 89:121–137.
- Gray PB, Marlowe F. 2009. Fluctuating asymmetry of a foraging population: the Hadza of Tanzania. *Ann Hum Biol* 29:495–501.
- Hamilton M. 2009. Population genetics. Chichester: Wiley-Blackwell.
- Hennessy RJ, Lane A, Kinsella A, Larkin C, Callaghan EO, Waddington JL, O'Callaghan E. 2004. 3D morphometrics of craniofacial dysmorphology reveals sex-specific asymmetries in schizophrenia. *Schizophr Res* 67:261–268.
- Hope D, Bates T, Penke L, Gow AJ, Starr JM, Deary IJ. 2013. Symmetry of the face in old age reflects childhood social status. *Econ Hum Biol* 11:236–244.
- Klingenberg CP, Badyaev A V, Sowry SM, Beckwith NJ. 2001. Inferring developmental modularity from morphological integration: analysis of individual variation and asymmetry in bumblebee wings. *Am Nat* 157.
- Klingenberg CP, Barluenga M, Meyer A. 2002. Shape analysis of symmetric structures: quantifying variation among individuals and asymmetry. *Evolution* 56:1909–1920.
- Klingenberg CP, Debat V, Roff DA. 2010a. Quantitative genetics of shape in cricket wings: developmental integration in a functional structure. *Evolution* 64:2935–2951.
- Klingenberg CP, McIntyre GS, Zaklan SD. 1998. Left-right asymmetry of fly wings and the evolution of body axes. *Proc R Soc London Ser B Biol Sci* 1998:1255–1259.

- Klingenberg CP, McIntyre GS. 1998. Geometric morphometrics of developmental instability: analyzing patterns of fluctuating asymmetry with Procrustes methods. *Evolution* (NY) 52:1363–1375.
- Klingenberg CP, Wetherill L, Rogers J, Moore E, Ward R, Autti-Rämö I, Fagerlund A, Jacobson SW, Robinson LK, Hoyme HE, Mattson SN, Li TK, Riley EP, Foroud T. 2010b. Prenatal alcohol exposure alters the patterns of facial asymmetry. *Alcohol* 44:649–657.
- Klingenberg CP. 2011. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Mol Ecol Resour* 11:353–357.
- Konigsberg L. 2000. Quantitative variation and genetics. In: Stinson S, Bogin B, Huss-Ashmore R, O'Rourke D, editors. *Human biology: an evolutionary and biocultural perspective*. New York: Wiley-Liss. p 135–162.
- Leamy L, Pomp D, Eisen E, Cheverud J. 2000. Quantitative trait loci for directional but not fluctuating asymmetry of mandible characters in mice. *Genet Res* 76:27–40.
- Leamy L, Routman E, Cheverud JM. 1997. A Search for quantitative trait loci affecting asymmetry of mandibular characters in mice. *Evolution* 51:957–969.
- Leamy L. 1984. Morphometric studies in inbred and hybrid house mice. V. Directional and Fluctuating Asymmetry. *Am Nat* 123:579–593.
- Leamy LJ, Klingenberg CP. 2005. The genetics and evolution of fluctuating asymmetry. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 36:1–21.
- Leamy LJ, Meagher S, Taylor S, Carroll L, Potts WK. 2001. Size and fluctuating asymmetry of morphometric characters in mice: their associations with inbreeding and t-haplotype. *Evolution* 55:2333–2341.
- Leamy LJ. 1999. Heritability of directional and fluctuating asymmetry for mandibular characters in random-bred mice. *J Evol Biol* 12:146–155.
- Leary R, Allendorf F, Knudsen K. 1984. Superior developmental stability of heterozygotes at enzyme loci in salmonid fishes. *Am Nat* 124:540–551.
- Leary RF, Allendorf FW. 1989. Fluctuating asymmetry as an indicator of stress: Implications for conservation biology. *Trends Ecol Evol* 4:214–217.
- Lens L, Van Dongen S, Kark S, Matthysen E. 2002. Fluctuating asymmetry as an indicator of fitness: can we bridge the gap between studies? *Biol Rev Camb Philos Soc* 77:27–38.
- Lens L, Van Dongen S. 2008. Fluctuating and directional asymmetry in natural bird populations exposed to different levels of habitat disturbance, as revealed by mixture analysis. *Ecol Lett* 3:516–522.
- Little AC, Jones BC, Waitt C, Tiddeman BP, Feinberg DR, Perrett DI, Apicella CL, Marlowe FW. 2008. Symmetry is related to sexual dimorphism in faces: data across culture and species. *PLoS One* 3:e2106.
- Little AC, Jones BC. 2003. Evidence against perceptual bias views for symmetry preferences in human faces. *Proc Biol Sci* 270:1759–1763.
- Little AC, Paukner A, Woodward RA, Suomi SJ. 2012. Facial asymmetry is negatively related to condition in female macaque monkeys. *Behav Ecol Sociobiol* 66:1311–1318.
- Livshits G, Kobylansky E. 1985. Lerner's concept of developmental homeostasis and the problem of heterozygosity level in natural populations. *Heredity* 55:341–353.
- Livshits G, Kobylansky E. 1991. Fluctuating asymmetry as a possible measure of developmental homeostasis in humans: a review. *Hum Biol* 63:441–466.
- Livshits G, Smouse PE. 1993. Relationship between fluctuating asymmetry, morphological modality and heterozygosity in an elderly Israeli population. *Genetica* 89:155–166.
- Lynnerup N, Andersen M, Lauritsen HP. 2003. Facial image identification using Photomodeler. *Leg Med (Tokyo)* 5:156–160.
- Mardia K V, Bookstein FL, Moreton IJ. 2000. Statistical assessment of bilateral symmetry of shapes. *Biometrika* 87:285–300.
- Martínez-Abadías N, González-José R, González-Martín A, Van der Molen S, Talavera A, Hernández P, Hernández M. 2006. Phenotypic evolution of human craniofacial morphology after admixture: a geometric morphometrics approach. *Am J Phys Anthropol* 129:387–398.
- Mayr E. 1963. *Animal, species and evolution*. Cambridge, MA: Harvard University Press.
- McIntyre GT, Mossey PA. 2002. Asymmetry of the parental craniofacial skeleton in orofacial clefting. *J Orthod* 29:299–305.
- McKenzie JA, Clarke GM. 1988. Diazinon resistance, fluctuating asymmetry and fitness in the Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Genetics* 120:213–220.
- Merila J, Bjorklund M. 1995. Fluctuating asymmetry and measurement error. *Syst Biol* 44:97–101.
- Milne B, Belsky J, Poulton R, Thomson WM, Caspi A, Kieser J. 2003. Fluctuating asymmetry and physical health among young adults. *Evol Hum Behav* 24:53–63.
- Mitton JB. 1993. Enzyme heterozygosity, metabolism, and developmental stability. *Genetica* 89:47–65.
- Mitton JB. 1995. Enzyme heterozygosity and developmental stability. *Acta Theriol Suppl* 40(Suppl.):33–54.
- Møller A, Swaddle J. 1997. *Asymmetry, developmental stability and evolution*. Oxford: Oxford Univ. Press.
- Møller A. 1996. Development of fluctuating asymmetry in tail feathers of the barn swallow *Hirundo rustica*. *J Evol Biol* 9:677–694.
- Neby M, Ivar F. 2013. Ranking fluctuating asymmetry in a dot figure and the significant impact of imagining a face. *Perception* 42:321–329.
- Özener B, Fink B. 2010. Facial symmetry in young girls and boys from a slum and a control area of Ankara, Turkey. *Evol Hum Behav* 31:436–441.
- Özener B. 2010a. Brief communication: Facial fluctuating asymmetry as a marker of sex differences of the response to phenotypic stresses. *Am J Phys Anthropol* 143:321–324.
- Özener B. 2010b. Fluctuating and directional asymmetry in young human males: effect of heavy working condition and socioeconomic status. *Am J Phys Anthropol* 143:112–120.
- Özener B. 2011. Does urban poverty increase body fluctuating asymmetry? *Coll Antropol* 35:1001–1005.
- Palmer A. 1994. Fluctuating asymmetry analyses: a primer. In: Markow T, editor. *Developmental instability: Its origins and evolutionary implications*. Dordrecht: Kluwer. p 335–364.
- Palmer AR, Strobeck C. 1986. Fluctuating asymmetry: measurement, analysis, patterns. *Annu Rev Ecol Syst* 17:391–421.
- Palmer AR, Strobeck C. 1992. Fluctuating asymmetry as a measure of development stability: implications of non-normal distributions and power of statistical tests. *Acta Zool Fenn* 191:57–72.
- Palmer AR. 2000. Quasireplication and the contract of error: lessons from sex ratios, heritabilities and fluctuating asymmetry. *Annu Rev Ecol Syst* 31:441–480.
- Parsons PA. 1990. Fluctuating asymmetry: an epigenetic measure of stress. *Biol Rev Camb Philos Soc* 65:131–145.
- Patterson B, Paton J. 1990. Fluctuating asymmetry and allozymic heterozygosity among natural populations of pocket gophers (*Thomomys bottae*). *Biol J Linnean Soc* 40:21–36.
- Pellegrino A. 2000. Trends in international migration in Latin America and the Caribbean. *Int Soc Sci J* 52:395–408.
- Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MAR, Bender D, Maller J, Sklar P, de Bakker PIW, Daly MJ, Sham PC. 2007. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 81:559–575.
- Ras F, Habets LL, van Ginkel FC, Prah-Andersen B. 1994. Facial left-right dominance in cleft lip and palate: three-dimension evaluation. *Cleft Palate Craniofac J* 31:461–465.
- Reich D, Patterson N, Campbell D, Tandon A, Mazieres S, Ray N, Parra M V, Rojas W, Duque C, Mesa N, García LF, Triana O, Blair S, Maestre A, Dib JC, Bravi CM, Bailliet G, Corach D, Hünemeier T, Bortolini MC, Salzano FM, Petzl-Erler ML, Acuña-Alonso V, Aguilar-Salinas C, Canizales-Quinteros S, Tusié-Luna T, Riba L, Rodríguez-Cruz M, Lopez-Alarcón M, Coral-Vazquez R, Canto-Cetina T, Silva-Zolezzi I, Fernandez-Lopez JC, Contreras A V, Jimenez-Sanchez G, Gómez-

- Vázquez MJ, Molina J, Carracedo A, Salas A, Gallo C, Poletti G, Witonsky DB, Alkorta-Aranburu G, Sukernik RI, Osipova L, Fedorova SA, Vasquez R, Villena M, Moreau C, Barrantes R, Pauls D, Excoffier L, Bedoya G, Rothhammer F, Dugoujon J-M, Larrouy G, Klitz W, Labuda D, Kidd J, Kidd K, Di Rienzo A, Freimer NB, Price AL, Ruiz-Linares A. 2012. Reconstructing Native American population history. *Nature* 488:370–374.
- Relethford J. 2012. *Human population genetics*. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell Publishing, Inc.
- Rhodes G, Louw K, Evangelista E. 2009. Perceptual adaptation to facial asymmetries. *Psychon Bull Rev* 16:503–508.
- Ruiz-Linares A, Adhikari, Kaustubh Acuña-Alonzo V, Quinto-Sánchez, Mirsha Jaramillo C, Arias W, Fuentes M, Pizarro M, Everardo P, de Avila F, Gómez-Valdeés J, León-Mimila P, Hunemeier T, Ramallo V, Silva de Cerqueira CC, Burley M-W, Konka E, Zagonel de Oliveira M, Veronez MR, Rubio-Codina M, Attanasio O, Gibbon S, Gallo C, Poletti G, Rosique J, Schuler-Faccini L, Salzano FM, Bortolini M-C, Canizales-Quinteros S, Rothhammer F, Bedoya G, Balding D, Gonzalez-Jose R. 2014. Admixture in Latin America: geographic structure, phenotypic diversity and self-perception of ancestry based on 7,342 individuals. *PLoS Genet* 10:e1004572.
- Santos M. 2002. Genetics of wing size asymmetry in *Drosophila buzzatii*. *J Evol Biol* 15:720–734.
- Schaefer K, Lauc T, Mitteroecker P, Gunz P, Bookstein FL. 2006. Dental arch asymmetry in an isolated Adriatic community. *Am J Phys Anthropol* 129:132–142.
- Scheib JE, Gangestad SW, Thornhill R. 1999. Facial attractiveness, symmetry and cues of good genes. *Proc Biol Sci* 266: 1913–1917.
- Scheiner SM, Caplan RL, Lyman RF. 1991. The genetics of phenotypic plasticity. III. Genetic correlations and fluctuating asymmetries. *J Evol Biol* 4:51–68.
- Shaner DJ, Peterson AE, Beattie OB, Bamforth JS. 2000. Assessment of soft tissue facial asymmetry in medically normal and syndrome-affected individuals by analysis of landmarks and measurements. *Am J Med Genet* 93:143–154.
- Singleton M. 2002. Patterns of cranial shape variation in the Papionini (Primates: Cercopithecinae). *J Hum Evol* 42:547–578.
- Slarkin M. 1985. Gene flow in natural populations. *Annu Rev Ecol Syst* 16:393–430.
- Smith DR, Crespi BJ, Bookstein FL. 1997. Fluctuating asymmetry in the honey bee, *Apis mellifera*: effects of ploidy and hybridization. *J Evol Biol* 10:551–574.
- Smith WM. 2000. Hemispheric and facial asymmetry: gender differences. *Laterality* 5:251–258.
- Sokal RR, Rohlf FJ. 1995. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. San Francisco: W.H. Freeman.
- Soulé M. 1979. Heterozygosity and developmental stability: another look. *Evolution* 33:396–401.
- Strasburg JL, Rieseberg LH. 2013. Methodological challenges to realizing the potential of hybridization research. *J Evol Biol* 26:259–260.
- Van Valen L. 1962. A study of fluctuating asymmetry. *Evolution* 16:125–142.
- Vøllestad LA, Hindar K. 1997. Developmental stability and environmental stress in *Salmo salar* (Atlantic salmon). *Heredity* 78:215–222.
- Vøllestad LA, Hindar K, Møller A. 1999. A meta-analysis of fluctuating asymmetry in relation to heterozygosity. *Heredity* 83:206.
- Vrijenhoek R, Lerman S. 1982. Heterozygosity and developmental stability under sexual and asexual breeding systems. *Evolution* 36:768–776.
- Wang S, Ray N, Rojas W, Parra M V, Bedoya G, Gallo C, Mazzotti G, Hill K, Hurtado AM, Camrena B, Nicolini H, Francisco M, Petzl-erler ML, Tsuneto LT. 2008. Geographic patterns of genome admixture in Latin American mestizos. *PLoS Genet* 4:1–9.
- Weinberg S, Naidoo S, Govier D, Martin R, Kane A, Marazita M. 2006. Anthropometric precision and accuracy of digital three-dimensional photogrammetry: comparing the genex and 3dMD imaging systems with one another and with direct anthropometry. *J Craniofac Surg* 17:477–483.
- Weisensee KE. 2013. Assessing the relationship between fluctuating asymmetry and cause of death in skeletal remains: a test of the developmental origins of health and disease hypothesis. *Am J Hum Biol* 25:411–417.
- Wijsman EM, Cavalli-Sforza LL. 1984. Migration and genetic population structure with special reference to humans. *Annu Rev Ecol Syst* 15:279–301.
- Wiley DF, Amenta N, Alcantara DA, Ghosh D, Kil YJ, Delson E, Harcourt-Smith W, Rohlf FJ, St. John K, Hamann B. 2005. Evolutionary morphing. In: *VIS IEEE visualization*. IEEE. Davis, CA. p 431–438.
- Wilson JM, Manning JT. 1996. Fluctuating asymmetry and age in children : evolutionary implications for the control of developmental stability. *J Hum Evol* 30:529–537.
- Windhager S, Patocka K, Schaefer K. 2013. Body fat and facial shape are correlated in female adolescents. *J Hum Biol* 25: 847–850.
- Windhager S, Schaschl H, Schaefer K, Mitteroecker P, Huber S, Wallner B, Fieder M. 2014. Variation at genes influencing facial morphology are not associated with developmental imprecision in human faces. *PLoS One* 9:e99009.
- Wooten MC, Smith MH. 1986. Fluctuating asymmetry and genetic variability in a natural population of *Mus musculus*. *J Mammal* 67:725–732.
- Yang J, Lee SH, Goddard ME, Visscher PM. 2011. GCTA: a tool for genome-wide complex trait analysis. *Am J Hum Genet* 88:76–82.
- Zaidel DW, Hessamian M. 2010. Asymmetry and symmetry in the beauty of human faces. *Symmetry* 2:136–149.



Admixture in Latin America: Geographic Structure, Phenotypic Diversity and Self-Perception of Ancestry Based on 7,342 Individuals

Andrés Ruiz-Linares^{1*}, Kaustubh Adhikari¹, Victor Acuña-Alonzo^{1,2}, Mirsha Quinto-Sanchez³, Claudia Jaramillo⁴, William Arias⁴, Macarena Fuentes⁵, María Pizarro⁵, Paola Everardo^{2,6}, Francisco de Avila^{2,6}, Jorge Gómez-Valdés⁶, Paola León-Mimila⁶, Tábita Hunemeier⁷, Virginia Ramallo⁷, Caio C. Silva de Cerqueira⁷, Mari-Wyn Burley¹, Esra Konca¹, Marcelo Zagonel de Oliveira⁷, Mauricio Roberto Veronez⁸, Marta Rubio-Codina⁹, Orazio Attanasio^{9,10}, Sahra Gibbon¹¹, Nicolas Ray¹², Carla Gallo¹³, Giovanni Poletti¹³, Javier Rosique¹⁴, Lavinia Schuler-Faccini⁷, Francisco M. Salzano⁷, Maria-Cátira Bortolini⁷, Samuel Canizales-Quinteros^{6,15}, Francisco Rothhammer⁵, Gabriel Bedoya⁴, David Balding¹, Rolando Gonzalez-José³

1 Department of Genetics, Evolution and Environment, and UCL Genetics Institute, University College London, London, United Kingdom, **2** National Institute of Anthropology and History, México City, México, **3** Centro Nacional Patagónico, CONICET, Puerto Madryn, Argentina, **4** Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia, **5** Instituto de Alta Investigación Universidad de Tarapacá, Programa de Genética Humana ICBM Facultad de Medicina Universidad de Chile and Centro de Investigaciones del Hombre en el Desierto, Arica, Chile, **6** Facultad de Medicina and Facultad de Química, UNAM, México City, México, **7** Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, **8** Remote Sensing and Digital Imaging Laboratory, Graduate Program on Geology, Vale do Rio dos Sinos University, São Leopoldo, Brazil, **9** The Institute for Fiscal Studies, London, United Kingdom, **10** Department of Economics, University College London, United Kingdom, **11** Department of Anthropology, University College London, London, United Kingdom, **12** Institute for Environmental Sciences, University of Geneva, Carouge, Switzerland, **13** Laboratorios de Investigación y Desarrollo, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú, **14** Departamento de Antropología, Facultad de Ciencias Sociales y Humanas, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia, **15** Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, México City, México

Abstract

The current genetic makeup of Latin America has been shaped by a history of extensive admixture between Africans, Europeans and Native Americans, a process taking place within the context of extensive geographic and social stratification. We estimated individual ancestry proportions in a sample of 7,342 subjects ascertained in five countries (Brazil, Chile, Colombia, México and Perú). These individuals were also characterized for a range of physical appearance traits and for self-perception of ancestry. The geographic distribution of admixture proportions in this sample reveals extensive population structure, illustrating the continuing impact of demographic history on the genetic diversity of Latin America. Significant ancestry effects were detected for most phenotypes studied. However, ancestry generally explains only a modest proportion of total phenotypic variation. Genetically estimated and self-perceived ancestry correlate significantly, but certain physical attributes have a strong impact on self-perception and bias self-perception of ancestry relative to genetically estimated ancestry.

Citation: Ruiz-Linares A, Adhikari K, Acuña-Alonzo V, Quinto-Sanchez M, Jaramillo C, et al. (2014) Admixture in Latin America: Geographic Structure, Phenotypic Diversity and Self-Perception of Ancestry Based on 7,342 Individuals. *PLoS Genet* 10(9): e1004572. doi:10.1371/journal.pgen.1004572

Editor: Anna Di Rienzo, University of Chicago, United States of America

Received: July 4, 2013; **Accepted:** July 1, 2014; **Published:** September 25, 2014

Copyright: © 2014 Ruiz-Linares et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was funded by grants from the Leverhulme Trust (F/07 134/DF to ARL) and BBSRC (BB/I021213/1 to ARL). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* Email: a.ruizlin@ucl.ac.uk

Introduction

Understanding the basis of a variation in human physical appearance has been a topic of long-standing research interest. However, little is known about the genetic basis of most of this variation. An exception is pigmentation, which has been the focus of considerable research, particularly in Europeans [1–4]. Refining our knowledge on the genetics of physical appearance in human populations is of considerable evolutionary, biomedical and forensic importance. This research is also of broad social interest due to its bearing on debates around notions of self-identity, ethnicity and race.

Latin America provides an advantageous setting in which to examine the impact of genetic variation on physical appearance. The region has a history of extensive admixture between three continental populations: Africans, Europeans and Native Americans [5,6]. Latin America also provides an informative context in which to explore the perception of variation in physical appearance. The region has a unique history relating to the social and cultural politics of ethnicity, race and nation [7–9]. A considerable number of genetic studies have examined admixture in Latin America [10–14]. However, these analyses have mostly been based on relatively small samples and focused mainly on

Author Summary

Latin America has a history of extensive mixing between Native Americans and people arriving from Europe and Africa. As a result, individuals in the region have a highly heterogeneous genetic background and show great variation in physical appearance. Latin America offers an excellent opportunity to examine the genetic basis of the differentiation in physical appearance between Africans, Europeans and Native Americans. The region is also an advantageous setting in which to examine the interplay of genetic, physical and social factors in relation to ethnic/racial self-perception. Here we present the most extensive analysis of genetic ancestry, physical diversity and self-perception of ancestry yet conducted in Latin America. We find significant geographic variation in ancestry across the region, this variation being consistent with demographic history and census information. We show that genetic ancestry impacts many aspects of physical appearance. We observe that self-perception is highly influenced by physical appearance, and that variation in physical appearance biases self-perception of ancestry relative to genetically estimated ancestry.

describing patterns of variation in admixture proportions between individuals and countries/regions. Few studies have examined the impact of genetic ancestry on physical appearance or the relationship of these to individual notions of ethnicity and ancestry [15,16].

In this paper we present the first phase of a research program focused on the genetics of physical appearance in Latin Americans. We base this program on a sample of over 7,000 individuals ascertained in five countries: Brazil, Chile, Colombia, México and Perú. Information was obtained for a range of socio-demographic variables, physical attributes and self-perception of ancestry. Here we report analyses based on individual mean genome admixture proportions. Coordinate-based spatial analyses illustrate the significant variation in ancestry existing across Latin America, in agreement with demographic history and census information. Significant effects of ancestry were detected for most of the phenotypes examined, and the direction of these effects agrees with the phenotypic differentiation of Africans, Europeans and Native Americans. Finally, we observe that certain phenotypes have a strong impact on self-perception and that these phenotypes bias self-perceived relative to genetically estimated ancestry.

Results

Summary descriptive statistics for the study sample collected are presented in Table 1.

Ancestry estimation

We estimated individual African/European/Native American admixture proportions with data for 30 highly informative SNPs using the ADMIXTURE program [17]. These markers were chosen from the 5,000 proposed by Paschou et al (2010) [18] as highly informative for continental ancestry estimation (see Methods). The selected set of markers produced individual ancestry estimates in 372 Colombians, included in a recent genome-wide association study [19], with correlations of ~70% (for the three continental ancestries) compared to estimates obtained with 50,000 markers (LD-pruned), and identical sample means. Although we estimated individual ancestry with a relatively small number of markers, we verified that the inferences drawn are

robust to the level of uncertainty of the estimates obtained (see below).

Geographic variation of ancestry

Consistent with previous studies, we observe extensive variation in ancestry between countries (Table 1) as well as between individuals within countries (Text S1) and between socioeconomic strata (Text S2) [12,13,20–22]. In order to obtain a spatial representation of variation in ancestry we obtained interpolated maps based on the geographic coordinates for the birthplaces of research volunteers. The geographic distribution of these birthplaces (Figure 1 and Figure S4) overlaps with regional population density from national census data (Figure S5). Consistent with this pattern, the number of volunteers for each birthplace correlates with census size for these localities: Brazil ($r=0.32$, p -value $<10^{-5}$), Chile ($r=0.51$, p -value $<10^{-4}$), Colombia ($r=0.54$, p -value $<10^{-13}$), Mexico ($r=0.44$, p -value $<10^{-8}$), Perú ($r=0.41$, p -value $<10^{-4}$). Few volunteer birthplaces were thus located in sparsely populated regions (e.g. Amazonia) and geographic interpolation of ancestry in those regions should be regarded with special caution.

The Brazilian sample (Figure 1A) shows widespread European ancestry with the highest levels being observed in the south. African ancestry is also widespread (except for the south) and reaches its highest values in the East of the country. Native American ancestry is highest in the north-west (Amazonia). The Chilean sample (Figure 1B) shows the least regional variation, with low levels of African ancestry throughout the country. European and Native American ancestry are relatively uniform, although somewhat higher European ancestry is seen around the main urban areas of the north and centre, Native ancestry predominating elsewhere, particularly in the south. The Colombian sample (Figure 1C) shows highest African ancestry in the coastal regions (particularly on the Pacific) and highest European ancestry in central areas. Native ancestry appears highest in the south-west and in the east of the country (Amazonia) but interpolations in these areas are based on few data points. In the Mexican sample (Figure 1D) Native American ancestry is highest in the centre/south of the country with the north showing the highest proportion of European Ancestry. African ancestry is generally low across Mexico except for a few coastal regions. The Peruvian sample (Figure 1E) shows substantial Native American ancestry throughout the country, particularly in the south, European ancestry appears highest around northern/central areas. African ancestry in Peru is generally low, except for parts of the northern coast.

To evaluate the statistical significance of the observed spatial variation in ancestry we calculated Moran's Index (I) of association between each individual ancestry component and spatial location. These were significant for the three ancestries in all countries (p -values <0.02). Since the three ancestry components are not independent, we also calculated canonical correlation coefficients between ancestry and geographic location. These were also significant for all countries (p -values <0.001). The variation in ancestry seen in the admixture maps of Figure 1 also result in highly significant correlations of the three ancestries with altitude of birthplace (p -values $<2 \times 10^{-16}$ for the three ancestries): African and European ancestry decreases with altitude (r of -0.24 and -0.39 , respectively), while Native American ancestry increases ($r = 0.48$).

The Kriging interpolation scheme used in building the maps of Figure 1 uses the mean ancestry at each birthplace and does not provide information on the extent of individual variation in ancestry at each map location. In the 102 birthplaces with 10 or

Table 1. Sample size, proportion of women, age, estimated admixture proportions and phenotypic features of the study sample.

	Brazil	Chile	Colombia	México	Perú	Total
N	1,594	1,561	1,659	1,622	906	7,342
Women	0.67	0.34	0.56	0.61	0.60	0.55
Age	25	24	23	25	20	23
American Ancestry	0.09	0.48	0.29	0.56	0.64	0.38
African Ancestry	0.09	0.05	0.11	0.05	0.00	0.06
European Ancestry	0.82	0.49	0.60	0.37	0.29	0.52
Head circumference (cm)	55/57	56/57	54/56	55/57	55/57	55/57
Height (cm)	162/175	159/172	160/173	158/172	158/171	160/172
Hip circumference (cm)	98/100	100/102	94/95	95/97	96/99	97/99
Melanin Index	32/32	36/35	34/33	36/35	37/37	34/35
Waist circumference (cm)	75/87	77/90	77/81	81/87	80/88	78/87
Weight (kg)	60/76	61/76	56/70	60/74	56/71	59/74
Male pattern baldness						
(1) No baldness	70	76	88	65	86	72
(2) Some baldness	30	24	12	35	14	28
Graying						
(1) No graying	78/65	80/82	90/87	70/67	92/88	81/78
(2) Some graying	22/35	20/18	10/13	30/33	8/12	19/22
Eye color						
(1) Blue/Grey	8/8	1/3	2/2	1/1	0/0	3/3
(2) Honey	4/2	4/5	10/11	3/2	1/2	5/5
(3) Green	14/15	4/10	8/8	4/6	3/2	7/9
(4) Light brown	19/20	9/9	16/15	21/21	11/8	16/14
(5) Dark brown/Black	55/55	83/74	64/64	72/71	85/87	68/70
Hair color						
(1) Red/reddish	1/1	1/0	1/0	0/0	0/0	1/1
(2) Blond	7/5	3/1	2/2	2/1	1/0	3/2
(3) Dark blond/light brown	35/28	18/11	16/12	21/12	10/5	22/14
(4) Brown/Black	57/65	78/87	81/85	77/86	90/95	75/84
Hair shape						
(1) Straight	41/41	48/62	39/33	46/45	45/41	43/47
(2) Wavy	38/34	38/32	39/38	41/43	42/38	39/37
(3) Curly	18/22	10/4	20/27	12/12	12/20	15/15
(4) Frizzy	3/4	3/1	2/2	1/0	1/1	2/2

Note: Values shown are medians except for categorical traits where the numbers indicate percentages in that category. Data for women is shown in the numerator (except for Male pattern baldness). For the regression analyses (Tables 2 and 3 below) categorical phenotypes 15–17 were considered ordinal variables with 4 or 5 ordered integer levels as specified here (see Methods). Individual ancestry histograms for each country are presented in Text S1.

doi:10.1371/journal.pgen.1004572.t001

more individuals sampled we observe that the standard deviation in the three individual ancestry estimates extends over a wide range: African (0.012–0.022), European (0.046–0.273) and Native American (0.039–0.274). We evaluated the correlation of this variation in individual ancestry with the census size of these localities and found a significant positive correlation for all ancestries ($r > 0.3$, p -values < 0.01).

Phenotypic diversity and genetic ancestry

Regression of phenotypic variation on genetic ancestry (taking Native American as reference) demonstrates a significant effect for most of the traits examined (p -value $< 10^{-3}$ using a conservative Bonferroni multiple testing correction, Table 2). Among the non-facial phenotypes (accounting for sex, country, age, educational

attainment and wealth) higher European ancestry is associated with: increased height, lighter pigmentation (of hair, skin and eyes) (Figure S6), greater hair curliness and male pattern baldness. Hair graying approaches statistical significance (p -value 10^{-2}). Higher African ancestry is associated with: increased height, higher skin pigmentation and greater hair curliness. The proportion of phenotypic variance explained by ancestry is highest for skin pigmentation (19%) followed by hair shape (8%) and color of eyes and hair (4% and 5%, respectively) but at most 1% for the other phenotypes.

We also observed highly significant effects of educational attainment (p -value 3.87×10^{-13}) and age (p -value $< 2 \times 10^{-16}$) on height, with height increasing for individuals born more recently at a rate ~ 1 cm every 10 years (Text S3).

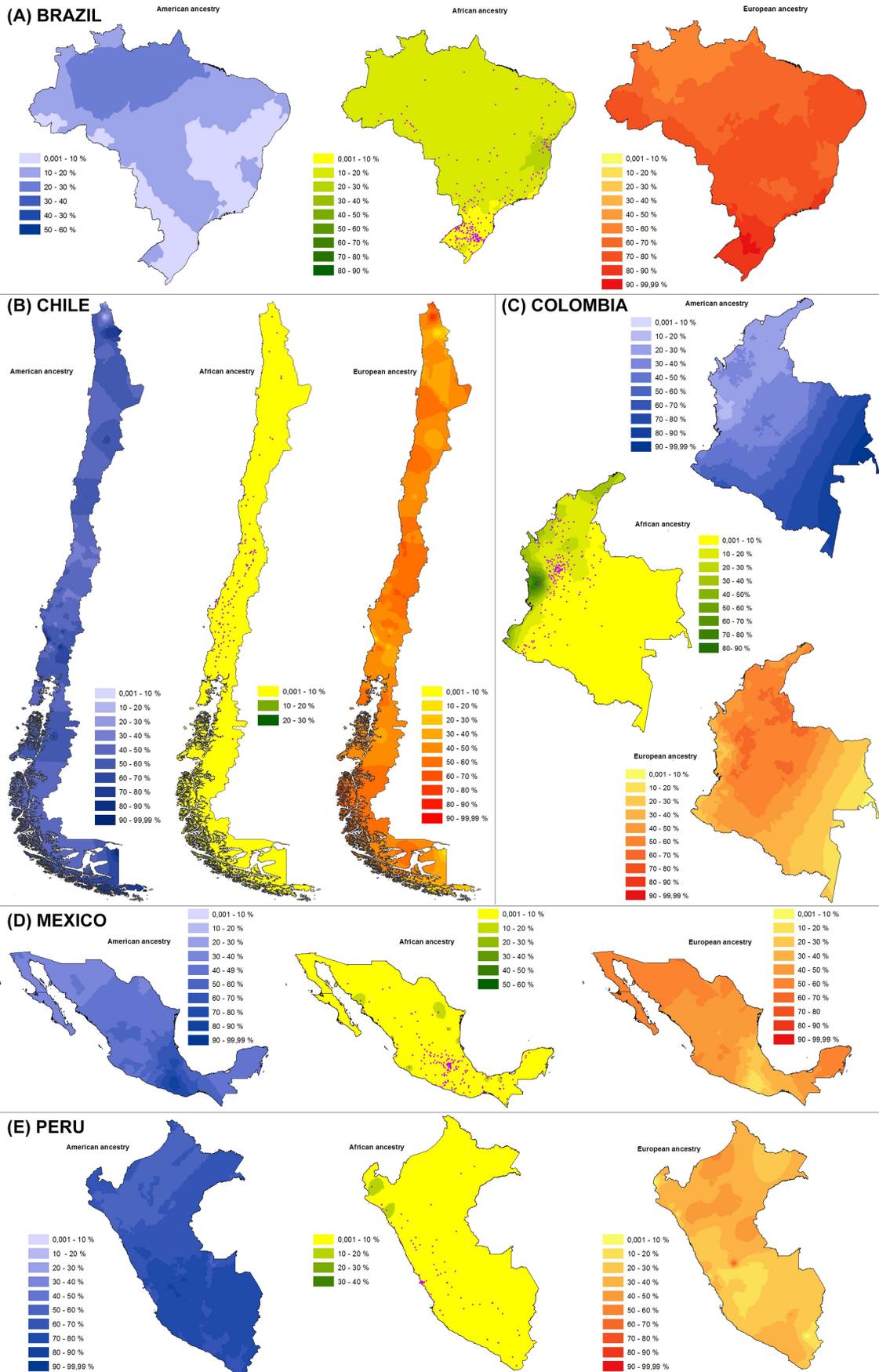


Figure 1. Geographic distribution of Native American (blue), African (green) and European (red) ancestry based on individual estimates for samples from (A) Brazil, (B) Chile, (C) Colombia, (D) México and (E) Perú. To facilitate comparison, color intensity transitions occur at 10% ancestry intervals for all maps. The birthplace of individuals are indicated by purple dots on the African ancestry map. Sampling density is shown in Figure S4. Maps were obtained using Kriging interpolation as detailed in the text.
doi:10.1371/journal.pgen.1004572.g001

Genetic ancestry also has a range of effects on facial features, both in terms of size and shape, after accounting for height and BMI (in addition to the other covariates). Higher European ancestry is associated with reduced eye fold and an overall smaller face (centroid size).

Face size and shape effects were also evaluated through the analysis of all pair-wise inter-landmark distances (Table S3). Amongst these distances, 133 and 2 show significant effects of European and African ancestry, respectively (p-values 10^{-6} assuming a conservative Bonferroni multiple testing correction; Table S3). The most significant effects of European ancestry ($P < 10^{-10}$) involve mainly distances between landmarks placed on the lips and nose. Face shape variation, independent of size, was assessed via Principal Components (PCs) of procrustes 3D coordinates. Significant effects of European ancestry were detected for PCs 1 and 3–5, while African ancestry impacts on PCs 1, 2 and 4 (Table 2, Text S5 and Figure S3). These 5 PCs account for ~55% of the variation in face shape captured by the 36 landmarks placed on the facial photographs, with ancestry explaining up to 5% of the variance in PC scores (for PC4). Examination of the correlation between inter-landmark distances and facial PCs, indicates that the highest correlation of distances between landmarks of the lips and nose is with PC4 (results not shown),

consistent with this PC showing the largest proportion of variance explained by ancestry (Table 2).

Genetic ancestry, phenotypic diversity and self-perception

Four ethno/racial categories (“Black”, “White”, “Native” and “Mixed”) are commonly used across Latin America in national censuses and other population surveys. We contrasted genetic ancestry and skin pigmentation (as measured by the melanin index) across these four self-estimated categories for the countries sampled (Figure 2 and Table S4). Within each country there is a gradient of decreasing European ancestry (and increasing pigmentation) for the “White”, “Mixed” and “Native/Black” categories. Across countries, skin pigmentation is relatively uniform within ethnicity categories, except for “Black”. For “White”, “Native” and “Mixed” the mean melanin index across countries varies within ~2 units, while the range for “Black” is ~25 units. By contrast, genetic ancestry varies greatly between countries for all ethnicity categories. For example, European ancestry varies across countries by about 40% for “White”, “Mixed” and “Native” and about 20% for “Black” (Figure 2; estimates for African and Native American ancestry are shown in Table S4).

Table 2. Multiple linear regression of physical appearance traits on European and African ancestry.

Trait	European ancestry		African ancestry		%R ²	% Δ R ²
	Coef.	P-value	Coef.	P-value		
1. Weight	0.35	0.70	0.95	0.54	32	0
2. Height	7.31	2.00E-16	8.14	2.00E-16	55	2
3. Hip circumference	-0.03	0.96	0.18	0.87	11	0
4. Waist circumference	-4.69	2.50E-09	-6.46	2.36E-06	26	1
5. Head circumference	-0.03	0.88	0.81	0.02	20	3
6. Melanin Index	-10.05	2.00E-16	11.89	2.00E-16	25	19
7. Balding	0.12	8.80E-08	0.15	8.77E-05	23	1
8. Hair shape	0.47	2.00E-16	2.41	2.00E-16	11	8
9. Eye color	-1.26	2.00E-16	0.24	0.08	11	5
10. Graying	0.06	0.01	0.11	0.01	44	0
11. Hair color	-0.62	2.00E-16	-0.01	0.87	12	5
12. Eye fold	-0.37	2.00E-16	-0.37	1.71E-04	27	1
13. Centroid Size	-12.98	7.74E-05	2.94	0.62	48	0
14. PC-1(19%)	0.02	1.42E-11	0.04	1.24E-12	15	2
15. PC-2(12%)	-0.01	1.00E-03	-0.02	7.80E-06	2	0
16. PC-3(10%)	-0.01	8.85E-13	0	0.84	21	3
17. PC-4(7%)	0.01	2.34E-08	-0.02	6.14E-08	18	5
18. PC-5(7%)	0.01	3.16E-05	0	0.6	5	0

Note: All regressions account for age, sex, country, education and wealth. Regressions for facial features (traits 13 to 18) also account for BMI and height. %R² refers to trait variance explained by a regression model incorporating European and African ancestry (being proportions, European, African and American ancestries sum up to 1 and since in this sample African ancestry is very low (median of 7%), we use Native American ancestry as a baseline). %Δ R² refers to the difference in variance explained by this full model and a model without ancestry as a predictor. P-Values $< 10^{-3}$ are shown in bold italic. The facial features (traits 13 to 18) refer to morphogeometric summaries of face variation derived from 3D landmark coordinates (see Methods). PC = Principal Components of the procrustes 3D landmark coordinates (% in parenthesis refer to variance explained by that PC).

doi:10.1371/journal.pgen.1004572.t002

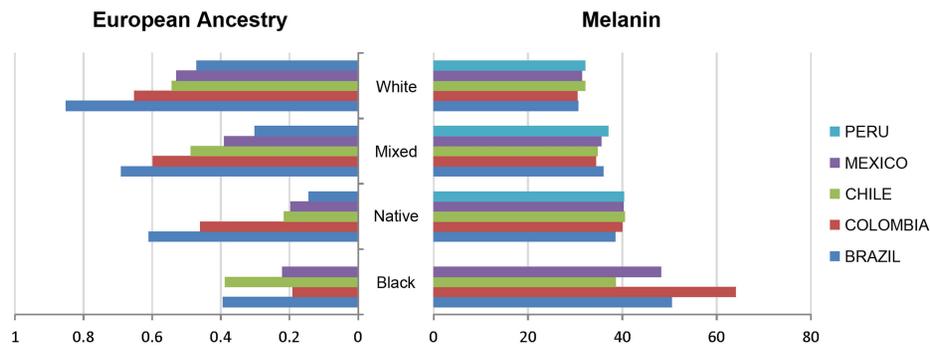


Figure 2. Bar plots contrasting skin pigmentation (Melanin Index) to proportion of European genetic ancestry across four self-identified ethno/racial categories in samples from Brazil, Chile, Colombia, México and Perú. Sample sizes and all estimates of pigmentation and ancestry, are presented in Table S4. In Perú no individual self-identified as “Black”. doi:10.1371/journal.pgen.1004572.g002

Contrasting self-perceived (ranked into five bands at 20% increments) and genetically estimated continental ancestry we observe a moderate, but highly significant, correlation: America: $r = 0.48$, $P < 2.2 \times 10^{-6}$; Europe: $r = 0.48$, $P < 2.2 \times 10^{-6}$; Africa: $r = 0.32$, $P < 2.2 \times 10^{-6}$. However, there is a trend for higher self-perceived Native American and African ancestry to exceed the genetic estimates (Figure 3). Similarly, there is a trend for lower self-perceived Native American and European ancestry to underestimate the genetic ancestry (Figure 3). To explore these trends further we performed a multiple linear regression of the difference between self-perceived and genetically estimated ancestry (i.e. the bias, see Methods), using genetic ancestry and covariates as predictors (Table 3). As expected, we observe that genetic ancestry has a highly significant effect ($< 2 \times 10^{-16}$ for all ancestries) and the negative sign of the regression coefficients reflects the orientation of bias seen in Figure 3. At increasing European genetic ancestry, there is greater underestimation in self-perception (a more negative bias). By contrast, with increasing African genetic ancestry there is less overestimation (less positive bias). For Native American ancestry, there is an overestimation (positive bias) at low levels, and an underestimation at high levels of ancestry (negative bias).

Most of the phenotypic traits that show ancestry effects (Table 2) also have a significant effect on self-perception bias (Table 3). There is a particularly strong effect of pigmentation: individuals with lower skin pigmentation tend to overestimate their European ancestry while individuals with higher pigmentation overestimate their Native American and African ancestries. Similarly, lighter eye and hair color lead to an overestimation of European ancestry and an underestimation of Native American ancestry (but not African ancestry). Hair type is strongly associated with an overestimation of African ancestry. Marginally significant associations are seen with other phenotypes, including facial features such as eye fold (leading to an underestimation of European ancestry) and landmark coordinate PCs (Table 3). An effect of social factors on perception bias is evidenced by the observation that greater wealth is significantly associated with an overestimation of European ancestry and that there is significant variation in bias between countries (Table 3). We examined the impact on these results of the uncertainty associated with the ancestry estimates by repeating the regression analyses using ancestry estimates obtained with a subset of 15 markers (Methods). We found that the same covariates had significant effects and that the regression coefficients were not significantly different in the two sets of regression analyses.

Discussion

Since the late 15th century, the population of what is now called “Latin America” has undergone major demographic changes within the context of a highly diversified physical and social environment [6,23]. These changes include the occurrence of waves of immigration from various parts of Africa and Europe, the resulting decline of the Native populations most exposed to the immigrants and a variable admixture between these groups. There have also been a number of noticeable population movements in the region. For example, in recent generations there has been an extensive migration to the cities, Latin America now being the most urbanized region of the world (about 80% of its population is currently considered urban) [24]. Three of the countries we sampled (Brazil, Mexico and Colombia) are the most populous in the region and the combined population of the five countries examined here account for ~70% of Latin Americans. Although ours is a convenience sample, the individuals studied show considerable variation in birthplace and for a range of biological and social variables, illustrating the extensive heterogeneity of Latin Americans.

The interpolated ancestry maps obtained (Figure 1) are consistent with other genetic studies [20,21,25,26] and with census information on the distribution of the main ethnicity groups within each country (available at www.ine.cl; geoftp.ibge.gov.br; www.igac.gov.co; www.censo2010.org.mx, www.indepa.gob.pe). Altogether, these data underline the extensive genetic structure existing within and between Latin American countries. It is possible to relate this genetic heterogeneity to well documented historical factors [6,23,27]. Broadly, Native American ancestry is highest in areas that were densely populated in pre-Columbian times (particularly Meso-America and the Andean highlands) as well as in regions that received relatively little non-native immigration and which currently have relatively low population densities (e.g. Amazonia). During the colonial period Africans were brought to Latin America as forced labour mainly to coastal tropical areas, particularly in the Caribbean and Brazil [28]. That country was the main recipient of African slaves in the region (representing about 40% of all African slaves brought to the Americas [29]). Early (mostly male) Iberian immigrants settled across the continent, admixing extensively with Native Americans and Africans [5]. These were followed by further currents of European immigration, including individuals from various parts of Europe (often arriving as a result of governmental initiatives) and resulting in the dense settlement of specific geographic regions (such as the south of Brazil). The larger variance in individual ancestry observed for larger urban centres is consistent with the increasing

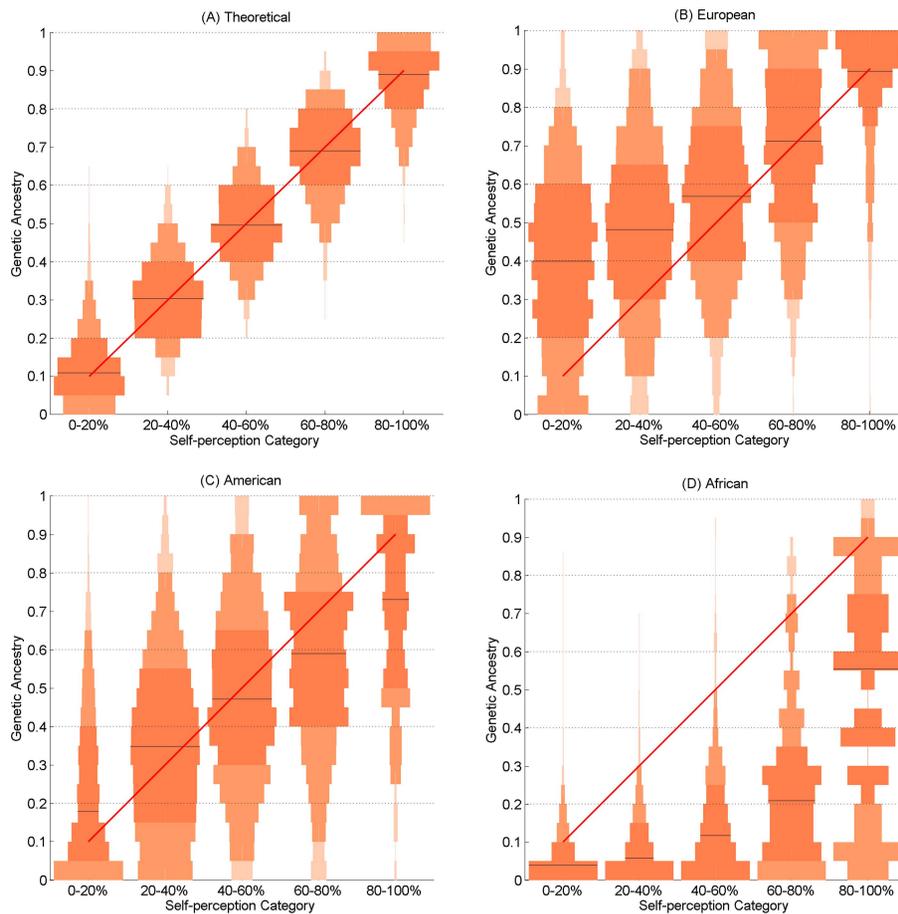


Figure 3. Vertical histograms (pyramid plots) showing the distribution of genetic ancestry for each of the five self-perceived ancestry categories. As reference, (A) shows the theoretical case of agreement between self-perceived and genetically estimated ancestry. For this plot random values were drawn from a beta distribution such that, for each self-perception band, the median ancestry lies at the centre of a 0.2 interval containing 75% of the simulated ancestry values. The number of simulated values was fixed at our sample size. Panels (B), (C) and (D) show respectively, the observed distributions for European, Native American and African ancestries. The red diagonal line indicates the midpoint, on the genetic ancestry scale, of each self-perceived ancestry category. Distributions are coded in three shades of orange: the darkest shade denotes the central quartiles (the median shown as a brown line), the medium-shade indicates the 5%–95% range, and the lightest shade refers to samples outside this range. For European ancestry, self-perception tends to underestimate genetic ancestry (the distributions are mostly above the diagonal). By contrast, self-perception tends to overestimate African ancestry (the distributions are mostly below the diagonal). At increasing levels of Native American genetic ancestry self-perception first underestimates then overestimates genetic ancestry (the distributions are on both sides of the diagonal). Simulations and plots were carried out using MATLAB [61]. doi:10.1371/journal.pgen.1004572.g003

urbanization of Latin America seen recent generations, the cities absorbing immigrants with diverse genetic backgrounds. Other than demographic history, it is possible that assortative mating has also contributed to shaping population structure across Latin America. The Iberian “Conquest” (i.e. the first century of settlement) was characterized by extensive admixture between Natives and immigrants (driven by the highly predominant immigration of males) [5]. However, during the subsequent colonial period society became increasingly stratified, including the instauration during the 18th century of a caste system regulating marriages [6,27]. These restrictions were mostly abolished with the establishment of republican governments in the 19th century [6]. However, a number of studies have documented continuing assortative mating in Latin America, in relation to genetic ancestry, physical appearance and a range of social factors [30–34].

The pattern of variation we observe between physical appearance and genetic ancestry is consistent with information on the

variation in frequency of the traits examined in Native Americans, Europeans and Africans. Constitutive skin pigmentation (i.e. in areas not exposed to light), hair and eye color and hair type are traits with little environmental sensitivity and show large differences between continental populations [35]. As expected, increased European ancestry shows a highly significant association with lighter skin, hair and eye pigmentation. A number of allelic variants impacting on these traits have been identified in Europeans and certain of these show large allele frequency differences between Europeans and non-Europeans [1,2,36]. We also found a highly significant effect of ancestry on hair type, individuals with higher Native American ancestry showing greater frequency of straight hair, a phenotype that is essentially fixed in Native Americans. Recent studies in East Asians implicate a p.Val370Ala substitution in the *EDAR* gene in hair morphology [37–39]. One of the ancestry informative markers typed here (rs260690) is located in the first intron of *EDAR*, is in high linkage disequilibrium with the p.Val370Ala variant in the HapMap

Table 3. Multiple linear regression of the difference (Δ) between self-perceived and genetically estimated ancestry for the three continental components.

	Δ AFRICA		Δ AMERICA		Δ EUROPE	
	Coef.	P-value	Coef.	P-value	Coef.	P-value
European Ancestry*	-0.01	0.48	-0.45*	<2.00E-16*	-0.52	<2.00E-16
African Ancestry	-0.23	<2.00E-16	-0.07	0.02	0.07	0.04
Country-Chile	-0.05	1.48E-12	1.59E-03	0.85	-0.03	1.51E-03
Country-Colombia	-0.03	7.29E-08	0.04	9.80E-08	-0.09	2.00E-16
Country-México	-0.05	7.50E-09	0.02	0.01	2.95E-03	0.79
Country-Perú	-0.35	2.43E-05	-0.03	0.78	-0.80	2.27E-11
Wealth	-1.45E-04	0.81	2.63E-04	0.72	2.91E-03	6.41E-04
Education	-2.17E-03	0.45	3.96E-03	0.25	1.56E-03	0.69
Age	1.75E-04	0.59	8.45E-04	0.03	7.87E-04	0.08
Sex	-0.01	0.03	1.40E-03	0.83	0.02	1.16E-03
Balding	0.01	0.14	0.01	0.29	-0.01	0.39
Hair graying	-0.01	0.32	-0.02	4.23E-03	-0.01	0.27
Height	-3.79E-04	0.19	-7.35E-04	0.04	1.81E-03	6.19E-06
Melanin index	2.55E-03	8.97E-12	2.97E-03	7.91E-11	-0.01	2.00E-16
Hair shape	0.02	2.06E-13	-0.01	4.81E-04	-2.93E-03	0.38
Eye color	4.26E-03	0.02	0.01	2.04E-07	-0.02	1.40E-11
Hair color	0.01	0.01	0.02	7.11E-04	-0.03	3.59E-08
Eyefold	0.00	0.68	0.01	4.01E-03	-0.02	3.98E-04
PC1	0.10	0.36	-0.30	0.03	0.33	0.03
PC2	-0.10	0.44	-0.03	0.87	0.03	0.87
PC3	0.38	0.02	0.31	0.12	-0.98	6.39E-06
PC4	-0.45	0.02	-0.03	0.91	0.91	5.03E-04
PC5	-0.03	0.86	0.35	0.10	0.14	0.57

NOTE: Δ refers to self-perception (bands 1 to 5, see Methods) minus continental ancestry proportions (0–100%) estimated from the genetic data. Sex and country of sampling were incorporated in the analyses as factors while the other variables were treated as quantitative. For ease of interpretation, the regression coefficient and p-value for Δ AMERICA (*) refer to Native American (not European) ancestry.

doi:10.1371/journal.pgen.1004572.t003

dataset and is strongly associated with hair type in our sample, after accounting for ancestry (Text S4), suggesting that variants at *EDAR* could be impacting on hair morphology in Latin Americans. Greater European ancestry also correlates significantly with higher rates of male balding and (marginally) with hair greying (our sample is perhaps underpowered to detect these effects due to its relatively young age; Table 1). Although no thorough comparative data is available, classical population studies indicate that hair greying and androgenetic alopecia are rarer, less severe and of later onset in Native Americans than in other continental populations [40] and our data points to the existence of loci influencing the continental distribution of these traits. Studies in Europeans have recently identified loci associated with androgenetic alopecia [41,42], but no similar analyses have been performed for hair greying.

Recent genome-wide association analyses in Europeans have implicated loci for variation in height and related anthropometric traits [43,44]. However, these traits are also strongly influenced by environmental factors, including nutrition [45]. In the sample studied here we find that Native American ancestry correlates significantly with lower height and we also detect a significant effect of socioeconomic position (Text S3), lower socioeconomic position correlating with decreased height. The significant effect of age on height, with younger individuals tending to be taller than

older ones suggests that the two socioeconomic indicators examined here (education and wealth) capture only part of the environmental variation impacting on height. The rate of increase in height for individuals born more recently (~ 0.1 cm/year) estimated here is similar to that obtained from extensive longitudinal surveys in Latin America (~ 1 cm per decade in the last century), an observation that has been interpreted as resulting from the historical improvement in living standards across the region [45,46]. It is thus possible that the ancestry effect on height that we detect could be influenced by environmental factors that correlate with ancestry that are not captured by the socioeconomic variables examined here.

The ancestry effects that we detect for facial features (eye fold, face shape and size), but not for head circumference, agree with the notion of a greater developmental and evolutionary constraint on neuro-cranium than on facial variation. This is also in line with proposals that human facial features include a range of environmental adaptations [47–49]. Aspects of face shape variation captured by principal components analysis that are influenced by genetic ancestry include mainly, width and height of the face, facial flatness, position of the glabella and fronto-temporal points, extent of eye fold and the relative size and position of lips and nose (a fuller description of face shape variation associated with each PC is presented in Text S5 and Figure S3). Two genome-wide

association scans in Europeans have identified a few loci associated with aspects of face shape [50,51] but these results are pending confirmation by further studies. No genetic variants have yet been implicated in intercontinental differentiation for facial features.

Our joint analysis of genetic, phenotypic and self-perception variation emphasizes the strong impact of physical appearance on self-perception. Comparison of skin pigmentation across self-perceived ethno/racial categories shows remarkable consistency between countries, underlining the weight given to this trait in self-perception [52]. The large variation in genetic ancestry between countries for each ethnicity category illustrates the relatively low predictive power of physical appearance for genetic ancestry. Although we detected highly significant effects of ancestry on many of the phenotypes examined, the observed correlations are relatively low (Table 2). The poor reliability of physical appearance as an indicator of genetic ancestry likely relates to the impact of environmental variation on some of these traits, and to their specific genetic architecture. Particularly, a few genetic variants could have relatively large phenotypic effects (as documented for pigmentation [2,36]). The impact of physical appearance on self-perception of ancestry likely relates to admixture in Latin America largely occurring many generations ago and the frequent unavailability of reliable genealogical information. The contrast between self-perceived and genetically estimated admixture proportions confirms the impact of physical appearance on self-perception and shows how certain traits, particularly but not exclusively related to pigmentation, can bias self-perception of ancestry. This biased perception of physical attributes is likely to be influenced by social and individual factors shaping the interpretation of phenotypic variation. The effect of such factors is illustrated by the observation of differences in bias across countries and the positive correlation between wealth and European ancestry (Table 2). An effect of wealth on self-perception of ancestry has also been the subject of study in the sociological literature on Latin America [52].

In conclusion, our study sample illustrates the extensive geographic variation in genetic ancestry seen across Latin America, reflecting the heterogeneous demographic history of the region. The highly significant impact of genetic ancestry on physical appearance is consistent with some of the phenotypic variation seen in Latin Americans stemming from genetic loci with differentiated allele frequencies between Africans, Europeans and Native Americans [53]. Further analysis of the study sample collected here should enable the identification of such loci. The significant correlation between self-perceived and genetically estimated ancestry is consistent with the observed effects of genetic ancestry on physical appearance. However, self-perception is biased, possibly due to non-biological factors affecting the perception of phenotypic variation and to the genetic architecture of physical appearance traits. Our findings exemplify the informativity of Latin America for studies encompassing genetic, phenotypic and sociodemographic information and the interest of a multidisciplinary approach to human diversity studies.

Materials and Methods

Study subjects

Recruitment took place mainly in five locations: México City (México), Medellín (Colombia), Lima (Perú), Arica (Chile) and Porto Alegre (Brazil). With the exception of Chile, most subjects recruited in these cities were students and staff from the universities participating in this research. In Chile about 2/3 of the subjects recruited were professional soldiers. In Brazil ~10% of samples were collected in smaller towns of the states of Rio

Grande do Sul, Bahia and Rondonia. Adult subjects of both sexes were invited to participate mainly through public lectures and media presentations. Maps showing the number of volunteers in each unique birthplace are presented in Figure S4. Being a convenience sample, the main collection sites are overrepresented on these maps for each country. We obtained ethics approval from: Escuela Nacional de Antropología e Historia (México), Universidad de Antioquia (Colombia), Universidad Peruana Cayetano Heredia (Perú), Universidad de Tarapacá (Chile), Universidad Federal do Rio Grande do Sul (Brazil) and University College London (UK). All participants provided written informed consent. Blood samples were collected by a certified phlebotomist and DNA extracted following standard laboratory procedures.

Phenotypic data

A physical examination of each volunteer was carried out by the local research team using the same protocol and instruments at all recruitment sites. We obtained: height, weight, head, hip and waist circumference, cheilion-cheilion width and sellion-gnathion height. All measurements were obtained in duplicate and the mean of the two measurements retained for further analyses. We recorded eye colour into five categories (1-blue/grey, 2-honey, 3-green, 4-light brown, 5-dark brown/black), and natural hair colour into four categories (1-red/reddish, 2-blond, 3-dark blond/light brown or 4-brown/black). Balding in males was recorded using a modified Hamilton scale as: 0) no hair loss, 1) frontal baldness only, 2) frontal hair loss with mild vertex baldness, 3) frontal hair loss with moderate vertex baldness, and 4) frontal hair loss with severe vertex baldness. Similarly, greying was recorded along a five point scale: 0) for no greying, 1) for predominant non-greying, 2) for ~50% greying, 3) for predominant greying and 4) for totally white hair. Due to the small number of individuals in categories 1–4 for male pattern balding and greying, we pooled these categories so as to contrast only two categories (presence or absence of the trait). Macroscopic hair type was categorized by visual inspection as 1-straight, 2-wavy, 3-curly or 4-frizzy. A quantitative measure of constitutive skin pigmentation (the Melanin Index) was obtained using the DermaSpectrometer DSMEII reflectometer (Cortex Technology, Hadsund, Denmark). Measurements were obtained from both inner arms and the mean of the two readings used in the analyses.

Five digital photographs of the face: left side (-90°), left angle (-45°), frontal (0°), right angle (45°), right side (90°) were taken from ~1.5 meters at eye level using a Nikon D90 camera fitted with a Nikkor 50 mm fixed focal length lens. The frontal facial photographs were used to score (by visual inspection) the presence of an eye fold along the upper eye lids using a three point scale: 0) absence 1) partial (interior, middle or outer fold) and 2) full (along the entire eye lid). All photographs were annotated manually with 36 anatomical landmarks and 3D landmark coordinates extracted using the software Photomodeler (<http://www.photomodeler.com/> Eos Systems Inc, Vancouver, Canada) (Figure S1). Landmark configurations were superimposed by Generalized Procrustes Analysis [54] and Principal Components (PCs) of the 3D landmark coordinates extracted using the software MORPHOJ [54]. To ease visualization of the 3D shape changes associated with each PC we obtained deformation surfaces via a thin plate spline algorithm.

Socioeconomic information and self-perception of ancestry

A structured questionnaire was applied to each volunteer. We obtained information on two indicators of socioeconomic position (Text S2). The first indicator is highest education level attained,

categorized as: (1) none/primary/technical, (2) secondary and (3) university and post-graduate. The second indicator is a wealth index obtained from a list of items used to assess living standards. These items were: home ownership, number of bathrooms at the place of residence, ownership of household items (cars, bicycles, fridge/freezer/dishwasher, TVs, radios, CD/DVD players, vacuum cleaner, washing machine) and availability of domestic service. We used polychoric principal component analysis to examine the variability of each country sample and retained the first principal component as an indicator of wealth. To allow comparisons across countries we converted an individual's wealth score to decile within each country.

The questionnaire included items exploring self-perception of ethnicity in the categories: “Black”, “Native”, “White” and “Mixed”, and self-perception of African, European, and Native American ancestry proportions. This was explained as a personal estimation of the proportion of ancestors that had a particular continental origin. We proposed a five point scale, expressed in 20% per cent brackets (and in words): 1) 0–20% (none or very low), 2) 20–40% (low), 3) 40–60% (moderate), 4) 60–80% (high) and 5) 80–100% (very high or total). The questionnaire also recorded information on the place of birth of the volunteer.

Genetic admixture estimation

In order to select 30 markers highly informative for estimating African/European/Native American ancestry, we started from the list of 5,000 markers, highly informative for world-wide continental ancestry estimation, identified by Paschou et al (2010) [18] using the approach of Rosenberg et al. (2003) [55] based on the worldwide CEPH-HGDP cell panel genotyped with Illumina's Human610-Quad beadchip (including data for about 600,000 SNPs [56]). The full list of these 5,000 markers is at: http://www.cs.rpi.edu/~drinep/HGDPAIMS/WORLD_5000_INFAIMs.txt. Of these, allele genotype data is available in Native Americans for 3,848 markers [57], of which 2,392 have been placed on subsequent Illumina bead-chip products. This subset of markers was retained for selection of those to be typed here so as to facilitate subsequent data comparison and integration. We ranked these 2,392 markers based on allele frequency differences in European-Native American or European-African samples. Amongst markers with the highest inter-continental allele-frequency differences we selected those with lowest heterozygosity in Native Americans (so as to reduce the effect of variable allele frequencies between Native Americans on ancestry estimation). Of the final set of 30 markers retained, 13 are monomorphic in 408 Native Americans (from 47 populations from México Southwards [57]), the rest have minor allele frequencies ranging from 0.01 to 0.15 (median 0.06) in that group of populations. The list of markers typed is provided in Table S1. Genotyping was carried out by LGC genomics (www.lgcgenomics.com/). In a sample of Colombians recently included in a genome-wide association study that used Illumina's 610 chip [19], this set of 30 markers produced individual ancestry estimates with correlations of ~ 0.7 (for all the three ancestries) compared with ancestry estimates obtained using an LD-pruned set of 50,000 markers from the chip data, and identical mean estimates. We compared the accuracy of these estimates with estimates obtained using markers from the list of 446 proposed by Galanter et al. (2012) [58], specifically for studying admixture in Latin Americans. From this list, 152 markers are present on Illumina's 610 chip (i.e. ~ 5 times the number of markers that we used) and produced estimates with correlations of ~ 0.85 with the ancestry estimates from the 50,000 marker set. By contrast, when the set of markers we selected was reduced to 15, the resulting ancestry estimates had a correlation of

~ 0.6 with the 50,000 marker set estimates, again showing that there is a diminishing return in accuracy when one increases the numbers of SNPs used in ancestry estimation.

Individual African, European and Native American ancestry proportions were estimated using the ADMIXTURE program [17] using supervised runs where African, European and Native American reference groups ($K=3$) were provided (see below). Unsupervised runs at $K=3$ produced very similar estimates (Figure S2), confirming our choice of ancestry-informative markers and parental populations. Standard errors of the individual ancestry estimates were obtained by bootstrap using the program's default parameters (200 replication runs). Data from a total of 876 individuals sampled in putative parental populations were used in ancestry estimation and specified in the supervised ADMIXTURE runs. These were selected from HAPMAP, the CEPH-HGDP cell panel [56] and from published Native American data [57] as follows: 169 Africans (from 5 populations from Sub-Saharan West Africa), 299 Europeans (from 7 West and South European populations) and 408 Native Americans (from 47 populations from México Southwards). The full list of the putative parental population samples (and their sizes) is provided in Table S2.

Geographic analyses

The birthplace names of all individuals was consolidated into a list of unique locations organized into three fields: city/municipality, region/state and country. Geographic coordinates (and altitude) for each placename were obtained via the Google Maps Geocoding API (<https://developers.google.com/maps/documentation/geocoding/>). The GeodesiX software (<http://www.calvert.ch/geodesix/>) was used for the geocoding query. We used the Global Rural-Urban Mapping Project version 1 data set (GRUMPv1; <http://sedac.ciesin.columbia.edu/data/set/grump-v1-settlement-points>) to attribute census size to these localities (see Supp. Text S6) [59]. We use census data for 1990, as the median age in our country samples ranges between 20 and 25.

Geographic maps displaying spatial variation in individual admixture were obtained with Kriging interpolation using the software ArcGis 9.3 (<http://www.esri.com/software/arcgis>). The cartographic database was geo-referenced to the SIRGAS geodesic system (Geocentric Reference System for the Americas, www.ibge.gov.br/home/geociencias/geodesia/sirgasing/index.html) using a Universal Transverse Mercator projection. Corel-DRAW X3 (Corel Corporation, Ottawa, Canada) was used to edit the map images. When a geographic location had multiple data entries (i.e. volunteers), the Kriging interpolation scheme uses the mean ancestry at that location. The correlation between the standard deviation of individual ancestry variation (at locations with more than 10 samples) and census size was tested using Spearman's rank correlation (as population sizes are generally non-normal but rather distributed exponentially). Statistical significance was obtained via permutation of individual birthplaces.

We tested the null hypothesis of ancestry being spatially uniformly distributed using two approaches. Firstly, we obtained Moran's 'I' index for each ancestry component (African, European, Native American) separately. This index tests for spatial uniformity of a variable using standard autocorrelation models and we evaluated significance by permuting birthplace locations for every individual maintaining constant the number of individuals sampled per location. To assign a single value to each location we used the average ancestry, recalculating this average after every permutation. Secondly, we used canonical correlation analysis. A disadvantage of Moran's method is that the three ancestry variables are not independent, complicating the interpretation of p-values. Canonical correlation allows one to combine the three ancestries into a single variable: it is the maximal

correlation between two sets of linear combinations of multiple variables. In our case, the three ancestries constitute one set and the geographical coordinates (latitude & longitude) constitute the second set. Adding quadratic and cubic powers of the geographic coordinates improved the fit, consistent with the curved shape of the ancestry gradients and the existence of regions with markedly different ancestry. Adding a fourth power did not improve the fit any further. P-values were obtained by permutation as above.

Statistical analyses

To evaluate the effect of ancestry on phenotype we used multivariate regression models including basic covariates (age, sex, country, education, wealth, and optionally BMI and height). Depending on the trait we used multiple linear (for continuous and ordinal traits) or logistic (for binary traits) regression. The categorical traits in Table 2 were considered ordinal variables (converted into four or five integer levels as specified in Table 1). The justification for doing so is the convention that for an ordinal variable with several categories there is little difference in fitting a linear regression model or an ordered probit model [48]. This is true because for these traits we can assume an underlying continuous variable (for eye or hair colour it could be the amount of pigment, for hair shape it could be the curvature of hair). Since an underlying continuous variable converted into ordered categories is the main assumption for the development of a probit model, this similarity in the two analysis holds. We verified this by examining both models and verifying that the results are similar.

Regression results corresponding to the ancestry variables are presented in Table 2 along with R^2 from this full model. A baseline regression model with only the covariates was also performed, leaving out ancestry, and the difference in R^2 in the two models was taken to be the proportion of variance in the phenotype explained by ancestry. Standard errors of the individual ancestry estimates (provided by the ADMIXTURE software) were incorporated in the multivariate regressions via the errors-in-variables model [49]. This adjusts the estimated regression coefficients and p-values for all covariates. The error in estimating a variable generally leads to an underestimation of the regression coefficients. However, the p-value still approaches zero under the alternative hypothesis, provided samples sizes are sufficiently large. For the ancestry estimates, the error in estimation was relatively low (~1–5%), consequently for our large sample sizes the reduction in effect size for each variable was modest (~5–10%).

To evaluate the relationship between self-perceived and genetically estimated ancestry we performed a bias analysis. This bias was defined as self-perception minus the estimated genetic ancestry. Overestimation therefore means that self-perception exceeds the genetic estimate, while underestimation indicates that self-perception is lower than the genetic estimate. Each genetic ancestry estimate was obtained as a percentage (proportion), while self-perception was recorded into five bands at intervals of 20%. The bias in self-perception was therefore considered zero if the percentage of genetic ancestry fell within the chosen self-perception interval. Otherwise, bias was measured to be the distance of the closest boundary of the self-perception interval to the genetic ancestry percentage. We then performed multivariate linear regression of the bias on the genetic ancestry estimates and other variables (Table 3). The advantage of analysing the bias is that the regression model is easily interpretable. If self-perception was accurate (bias of zero) all the regression coefficients would be non-significant. If the bias is non-zero and some variables show significant effects, the signs of the coefficients are interpretable as leading to overestimation (positive coefficients) or underestimation (negative coefficients) of ancestry, as indicated above.

All statistical analyses were performed using R (www.r-project.org) [60] or MATLAB [61].

Supporting Information

Figure S1 Position of facial landmarks.
(DOCX)

Figure S2 (A) Supervised and (B) Unsupervised ADMIXTURE runs with $K = 3$.
(DOCX)

Figure S3 PCs 1–5 obtained from 3D coordinates of facial landmarks, represented by (A) Scatterplots and (B) Facial morphs.
(DOCX)

Figure S4 Birthplace maps of study volunteers in (A) Brazil, (B) Chile, (C) Colombia, (D) México and (E) Perú.
(DOCX)

Figure S5 Populated locations (points) and Population sizes in (A) Brazil, (B) Chile, (C) Colombia, (D) México and (E) Perú.
(DOCX)

Figure S6 Scatterplots of (A) Skin pigmentation (Melanin Index) and (B) Height (in cm), and European genetic ancestry.
(DOCX)

Table S1 Allele frequencies at 30 SNP markers selected for African, European and Native American ancestry estimation and the absolute difference in reference allele frequency (Δ) between continental populations.
(DOCX)

Table S2 Population samples used for genetic ancestry estimation.
(DOCX)

Table S3 Coefficients and P-values for regression of pair-wise inter-landmark distances and ancestry.
(DOCX)

Table S4 Frequency (and %) of four ethnicity categories in each country, mean individual genetic ancestry and Melanin Index in each category.
(DOCX)

Text S1 Variation in ancestry across countries and individuals.
(DOCX)

Text S2 Correlation of socioeconomic position with ancestry.
(DOCX)

Text S3 Regression of height (in cm) on ancestry and covariates.
(DOCX)

Text S4 Regression of hair shape on marker rs260690 and covariates.
(DOCX)

Text S5 Description of face shape changes associated with PCs 1–5 of 3D landmark coordinates.
(DOCX)

Text S6 Obtaining population size at individual birthplaces.
(DOCX)

Acknowledgments

We are very grateful to the research volunteers for their enthusiastic support of this project. We thank Paulo Drinot, Peter Wade, Ken Weiss and three anonymous reviewers for comments on the manuscript, Dominique del Pietro, Pablo Mateos and James Cheshire for assistance

with the geographic analyses and Lucia Castillo and Ana Carolina Orozco for technical assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: ARL RGJ DB GB JR CG GP FR JGV VAA SG. Performed the experiments: CJ WA VAA MQS MF

MP PE GP FdA JGV PLM TH VR CCSdC MWB EK. Analyzed the data: ARL KA RGJ MQS MZdO MRV MRC OA NR. Contributed reagents/materials/analysis tools: CJ WA GB MF MP PE FdA JGV PLM VAA TH VR CCSdC MWB LSF FMS MCB SCQ. Wrote the paper: ARL KA.

References

- Sturm RA (2009) Molecular genetics of human pigmentation diversity. *Hum Mol Genet* 18: R9–17.
- Liu F, Wollstein A, Hysi PG, Ankra-Badu GA, Spector TD, et al. (2010) Digital quantification of human eye color highlights genetic association of three new loci. *PLoS Genet* 6: e1000934.
- Jacobs LC, Wollstein A, Lao O, Hofman A, Klaver CC, et al. (2013) Comprehensive candidate gene study highlights UGT1A and BNC2 as new genes determining continuous skin color variation in Europeans. *Hum Genet* 132: 147–158.
- Zhang M, Song F, Liang L, Nan H, Zhang J, et al. (2013) Genome-wide association studies identify several new loci associated with pigmentation traits and skin cancer risk in European Americans. *Hum Mol Genet* 22: 2948–2959.
- Mormer M (1967) *Race Mixture in the History of Latin America*. Little Brown & Company. 178 p.
- Sanchez-Albornoz N (1974) The population of Latin America: a history. University of California Press. 314 p.
- Wade P (1997) *Race and ethnicity in Latin America*. Pluto Press. 160 p.
- Appelbaum NP, Macpherson AS, Roseblatt KA (2003) *Race and nation in modern Latin America*. University of North Carolina Press. 352 p.
- Larson B (2004) *Trials of nation making: liberalism, race, and ethnicity in the Andes, 1810–1910*. Cambridge University Press. 318 p.
- Sans M (2000) *Admixture studies in Latin America: from the 20th to the 21st century*. *Hum Biol* 72: 155–177.
- Salzano FM, Bortolini MC (2002) *The Evolution and Genetics of Latin American Populations*. Cambridge University Press. 528 p.
- Wang S, Ray N, Rojas W, Parra MV, Bedoya G, et al. (2008) Geographic patterns of genome admixture in Latin American Mestizos. *PLoS Genet* 4: e1000037.
- Bryc K, Velez C, Karafet T, Moreno-Estrada A, Reynolds A, et al. (2010) Colloquium paper: genome-wide patterns of population structure and admixture among Hispanic/Latino populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 Suppl 2: 8954–8961.
- Salzano FM, Sans M (2014) Interethnic admixture and the evolution of Latin American populations. *Genet Mol Biol* 37: 151–170.
- Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, et al. (2003) Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 177–182.
- Ventura Santos R, Fry PH, Monteiro S, Maio MC, Rodrigues JC, et al. (2009) Color, Race, and Genomic Ancestry in Brazil: Dialogues between Anthropology and Genetics. *Current Anthropology* 50: 787–819.
- Alexander DH, Novembre J, Lange K (2009) Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. *Genome Res* 19: 1655–1664.
- Paschou P, Lewis J, Javed A, Drineas P (2010) Ancestry informative markers for fine-scale individual assignment to worldwide populations. *J Med Genet* 47: 835–847.
- Scharf JM, Yu D, Mathews CA, Neale BM, Stewart SE, et al. (2012) Genome-wide association study of Tourette's syndrome. *Mol Psychiatry*: 721–8.
- Silva-Zolezzi I, Hidalgo-Miranda A, Estrada-Gil J, Fernandez-Lopez JC, Uribe-Figueroa L, et al. (2009) Analysis of genomic diversity in Mexican Mestizo populations to develop genomic medicine in Mexico. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 8611–8616.
- Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, et al. (2011) The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One* 6: e17063.
- Campbell DD, Parra MV, Duque C, Gallego N, Franco L, et al. (2012) Amerind ancestry, socioeconomic status and the genetics of type 2 diabetes in a Colombian population. *PLoS One* 7: e33570.
- Collier S, Skidmore TE, Blakemore H (1992) *Cambridge Encyclopedia of Latin America and the Caribbean*. Cambridge University Press. 480 p.
- United Nations Human Settlements Programme (2012) *State of Latin American and Caribbean Cities 2012*. UN-Habitat.
- Rojas W, Parra MV, Campo O, Caro MA, Lopera JG, et al. (2010) Genetic make up and structure of Colombian populations by means of uniparental and biparental DNA markers. *Am J Phys Anthropol* 143: 13–20.
- Alves-Silva J, da Silva SM, Guimaraes PE, Ferreira AC, Bandelt HJ, et al. (2000) The Ancestry of Brazilian mtDNA Lineages. *Am J Hum Genet* 67: 444–461.
- Burkholder MA, Johnson LL (2003) *Colonial Latin America*. Oxford University Press. 448 p.
- Thomas H (1997) *The Slave Trade*. Simon and Schuster. 912 p.
- Appiah A, Gates HL (1999) *Africana: the encyclopedia of the African and African American experience*. Basic Civitas Books. 2095 p.
- Morton NE (1964) Genetic studies of northeastern Brazil. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 29: 69–79.
- Trachtenberg AS, A.E.; Salzano, F.M.; DaRocha, F.J., (1985) Canonical correlation analysis of assortative mating in two groups of Brazilians. *J Biosoc Sci* 17: 389–403.
- Malina RMS, H.A. ; Buschang, P.H.; Aronson, W.L.; Little, B.B. (1983) Assortative mating for phenotypic characteristics in a Zapotec community in Oaxaca, Mexico. *J Biosoc Sci* 15: 273–280.
- Procidano ME, Rogler LH (1989) Homogamous assortative mating among Puerto Rican families: intergenerational processes and the migration experience. *Behav Genet* 19: 343–354.
- Risch N, Choudhry S, Via M, Basu A, Sebro R, et al. (2009) Ancestry-related assortative mating in Latino populations. *Genome Biol* 10: R132.
- Relethford JH (2009) Race and global patterns of phenotypic variation. *Am J Phys Anthropol* 139: 16–22.
- Beleza S, Johnson NA, Candille SI, Absher DM, Coram MA, et al. (2013) Genetic architecture of skin and eye color in an African-European admixed population. *PLoS Genet* 9: e1003372.
- Fujimoto A, Kimura R, Ohashi J, Omi K, Yuliwulandari R, et al. (2008) A scan for genetic determinants of human hair morphology: EDAR is associated with Asian hair thickness. *Hum Mol Genet* 17: 835–843.
- Mou C, Thomason HA, Willan PM, Clowes C, Harris WE, et al. (2008) Enhanced ectodysplasin-A receptor (EDAR) signaling alters multiple fiber characteristics to produce the East Asian hair form. *Hum Mutat* 29: 1405–1411.
- Tan J, Yang Y, Tang K, Sabeti PC, Jin L, et al. (2013) The adaptive variant EDARV370A is associated with straight hair in East Asians. *Hum Genet* 132: 1187–1191.
- Cavalli-Sforza LL, Menozzi P, Piazza A (1994) *The History and Geography of Human Genes*. Princeton University Press. 1088 p.
- Hillmer AM, Brockschmidt FF, Hanneken S, Eigelschoven S, Steffens M, et al. (2008) Susceptibility variants for male-pattern baldness on chromosome 20p11. *Nat Genet* 40: 1279–1281.
- Li R, Brockschmidt FF, Kiefer AK, Stefansson H, Nyholt DR, et al. (2012) Six novel susceptibility loci for early-onset androgenetic alopecia and their unexpected association with common diseases. *PLoS Genet* 8: e1002746.
- Yang J, Benyamin B, McEvoy BP, Gordon S, Henders AK, et al. (2010) Common SNPs explain a large proportion of the heritability for human height. *Nat Genet* 42: 565–569.
- Lango Allen H, Estrada K, Lettre G, Berndt SI, Weedon MN, et al. (2010) Hundreds of variants clustered in genomic loci and biological pathways affect human height. *Nature* 467: 832–838.
- McEvoy BP, Visscher PM (2009) Genetics of human height. *Econ Hum Biol* 7: 294–306.
- Salvatore RD, Coatsworth JH, Challu AIE (2010) *Living standards in Latin American history: height, welfare, and development, 1750–2000*. Harvard University Press. 350 p.
- Gonzalez-Jose RG, Ramirez-Rozzi F, Sardi M, Martinez-Abadías N, Hernandez M, et al. (2005) Functional-cranial approach to the influence of economic strategy on skull morphology. *American Journal of Physical Anthropology* 128: 757–771.
- Harvati K, Weaver TD (2006) Human cranial anatomy and the differential preservation of population history and climate signatures. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 288: 1225–1233.
- Martinez-Abadías N, Gonzalez-Jose R, Gonzalez-Martín A, Van Der MS, Talavera A, et al. (2006) Phenotypic evolution of human craniofacial morphology after admixture: a geometric morphometrics approach. *Am J Phys Anthropol* 129: 387–398.
- Paternoster L, Zhurov AI, Toma AM, Kemp JP, St Pourcain B, et al. (2012) Genome-wide association study of three-dimensional facial morphology identifies a variant in PAX3 associated with nasion position. *Am J Hum Genet* 90: 478–485.
- Liu F, van der Lijn F, Schurmann C, Zhu G, Chakravarty MM, et al. (2012) A genome-wide association study identifies five loci influencing facial morphology in Europeans. *PLoS Genet* 8: e1002932.
- Telles EF, R (2013) Not just color: whiteness, Nation, and status in Latin America. *Hispanic American Historical Review* 93: 411–449.
- Mountain JL, Risch N (2004) Assessing genetic contributions to phenotypic differences among 'racial' and 'ethnic' groups. *Nat Genet* 36: S48–53.
- Klingenberg CP (2008) *MorphoJ*. Faculty of Life Sciences, University of Manchester, UK. <http://www.flywings.org.uk/MorphoJpage.htm>.
- Rosenberg NA, Li LM, Ward R, Pritchard JK (2003) Informativeness of genetic markers for inference of ancestry. *Am J Hum Genet* 73: 1402–1422.
- Li JZ, Absher DM, Tang H, Southwick AM, Casto AM, et al. (2008) Worldwide human relationships inferred from genome-wide patterns of variation. *Science* 319: 1100–1104.

57. Reich D, Patterson N, Campbell D, Tandon A, Mazieres S, et al. (2012) Reconstructing Native American population history. *Nature* 488: 370–374.
58. Galanter JM, Fernandez-Lopez JC, Gignoux CR, Barnholtz-Sloan J, Fernandez-Rozadilla C, et al. (2012) Development of a panel of genome-wide ancestry informative markers to study admixture throughout the Americas. *PLoS Genet* 8: e1002554.
59. Center for International Earth Science Information Network - CIESIN - Columbia University, The World Bank, and Centro Internacional de Agricultura Tropical - CIAT. Global Rural-Urban Mapping Project, Version 1 (GRUMPv1): Settlement Points (Accessed April 2014). <http://sedac.ciesin.columbia.edu/data/set/grump-v1-settlement-points>: NASA Socioeconomic Data and Applications Center.
60. R Development Core Team (2010) R: A language and environment for statistical computing. Vienna.
61. The MathWorks I (2012) MATLAB 8.0 and Statistics Toolbox 8.1.

ARTICLE

Received 4 Nov 2014 | Accepted 14 May 2015 | Published xx xxx 2015

DOI: 10.1038/ncomms8500

OPEN

A genome-wide association study identifies multiple loci for variation in human ear morphology

Kaustubh Adhikari¹, Guillermo Reales¹, Andrew J.P. Smith², Esra Konka¹, Jutta Palmen², Mirsha Quinto-Sanchez³, Victor Acuña-Alonzo^{1,4}, Claudia Jaramillo⁵, William Arias⁵, Macarena Fuentes⁶, María Pizarro⁶, Rodrigo Barquera Lozano^{4,7}, Gastón Macín Pérez^{4,7}, Jorge Gómez-Valdés⁸, Hugo Villamil-Ramírez⁷, Tábita Hunemeier⁹, Virginia Ramallo^{3,9}, Caio C. Silva de Cerqueira⁹, Malena Hurtado¹⁰, Valeria Villegas¹⁰, Vanessa Granja¹⁰, Carla Gallo¹⁰, Giovanni Poletti¹⁰, Lavinia Schuler-Faccini⁹, Francisco M. Salzano⁹, Maria- Cátira Bortolini⁹, Samuel Canizales-Quinteros⁸, Francisco Rothhammer⁶, Gabriel Bedoya⁵, Rosario Calderón¹¹, Javier Rosique¹², Michael Cheeseman¹³, Mahmood F. Bhutta^{14,15}, Steve E. Humphries^{1,2}, Rolando Gonzalez-José³, Denis Headon¹³, David Balding^{1,16} & Andrés Ruiz-Linares¹

Here we report a genome-wide association study for non-pathological pinna morphology in over 5,000 Latin Americans. We find genome-wide significant association at seven genomic regions affecting: lobe size and attachment, folding of antihelix, helix rolling, ear protrusion and antitragus size (linear regression P values 2×10^{-8} to 3×10^{-14}). Four traits are associated with a functional variant in the Ectodysplasin A receptor (*EDAR*) gene, a key regulator of embryonic skin appendage development. We confirm expression of *Edar* in the developing mouse ear and that *Edar*-deficient mice have an abnormally shaped pinna. Two traits are associated with SNPs in a region overlapping the T-Box Protein 15 (*TBX15*) gene, a major determinant of mouse skeletal development. Strongest association in this region is observed for SNP rs17023457 located in an evolutionarily conserved binding site for the transcription factor Cartilage paired-class homeoprotein 1 (*CART1*), and we confirm that rs17023457 alters *in vitro* binding of *CART1*.

¹ Department of Genetics, Evolution and Environment, UCL Genetics Institute, University College London, London WC1E 6BT, UK. ² Centre for Cardiovascular Genetics, BHF Laboratories, Institute Cardiovascular Sciences, University College London, Rayne Building, London WC1E 6JF, UK. ³ Unidad de Investigación en Diversidad, Sistemática y Evolución, Centro Nacional Patagónico, CONICET, Puerto Madryn U9129ACD, Argentina. ⁴ National Institute of Anthropology and History, Mexico City 4510, Mexico. ⁵ GENMOL (Genética Molecular), Universidad de Antioquia, Medellín 5001000, Colombia. ⁶ Instituto de Alta Investigación, Universidad de Tarapacá, Programa de Genética Humana ICBM Facultad de Medicina Universidad de Chile and Centro de Investigaciones del Hombre en el Desierto, Arica 1000000, Chile. ⁷ Unidad de Genómica de Poblaciones Aplicada a la Salud, Facultad de Química, UNAM-Instituto Nacional de Medicina Genómica, Mexico City 4510, Mexico. ⁸ Facultad de Medicina, UNAM, Mexico City 4510, Mexico. ⁹ Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 91501-970, Brazil. ¹⁰ Laboratorios de Investigación y Desarrollo, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima 31, Peru. ¹¹ Departamento de Zoología y Antropología Física, Universidad Complutense de Madrid, 28040, Spain. ¹² Departamento de Antropología, Facultad de Ciencias Sociales y Humanas, Universidad de Antioquia, Medellín 5001000, Colombia. ¹³ The Roslin Institute and Royal (Dick) School of Veterinary Studies, University of Edinburgh, Midlothian EH25 9RG, UK. ¹⁴ UCL Ear Institute, University College London, London WC1X 8EE, UK. ¹⁵ Royal National Throat Nose and Ear Hospital, London WC1X 8EE, UK. ¹⁶ Schools of BioSciences and Mathematics & Statistics, University of Melbourne, Melbourne, Victoria 3010, Australia. Correspondence and requests for materials should be addressed to A.R.L. (e-mail: a.ruizlin@ucl.ac.uk).

Q1

Q2

Q3

Q4

The human pinna is made up of a piece of cartilage covered with skin and attached to the skull by ligaments, muscles and fibrous tissue. This cartilage does not extend into the ear lobe, which consists mostly of areolar and adipose tissue. A range of disorders affecting human pinna development have been described, occurring in isolation or as part of complex syndromes with multiple affected organs^{1,2}. There is also great non-pathological variation between humans in pinna shape and size, and this variation has been reported to be influenced by age, sex and ethnicity^{3–5}. The study of rare, familial microtia cases (a disorder characterized by a small, abnormally shaped pinna) has established that mutations in the *HOXA2* gene can severely impact pinna development⁶. However, no genetic variants influencing normal pinna morphology have yet been reported. Here we aimed at identifying such variants by performing a genome-wide association study (GWAS) in a large sample of Latin American individuals with no pinna abnormalities. We identified seven loci with genome-wide significant association to variation in various pinna features, including several strong candidate genes with known developmental effects. We provide follow-up experimental evidence supporting the pinna morphology associations for two gene regions (which include the Ectodysplasin A receptor (*EDAR*) and the T-Box Protein 15 (*TBX15*) genes).

Results

Our study sample is part of the CANDELA (Consortium for the Analysis of the Diversity and Evolution of Latin America; <http://www.ucl.ac.uk/silva/candela>) cohort collected in five Latin American countries (Brazil, Colombia, Chile, Mexico and Peru) for the study of the genetics of physical appearance⁷. This sample consists of individuals of both sexes (median age 22 years), with a mixed African, European and Native American genetic background (Supplementary Table 1). Using facial photographs, we performed a qualitative assessment (on a three-point-ordered categorical scale; Fig. 1; Supplementary Figs 1 and 2) of 10 pinna traits in 5,062 individuals: ear protrusion, lobe size, lobe attachment, tragus size, antitragus size, helix rolling, folding of antihelix, crus helix expression, superior crus of antihelix expression and Darwin's tubercle.

Variation in the pinna traits examined. The trait scores show a weak-to-moderate correlation between them, and with age, sex, body mass index (BMI) and genetic ancestry (Supplementary Table 2). Most noticeably, lobe attachment shows a moderate and significant (permutation P value <0.001) negative correlation with lobe size ($r = -0.49$). Significant but weaker positive correlations were observed for folding of antihelix with helix rolling ($r = 0.25$) and with superior crus of antihelix expression ($r = 0.23$), as well as between ear protrusion and helix rolling ($r = 0.16$).

Individuals were genotyped on Illumina's Omni Express BeadChip. After quality control, 671,038 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) and 4,919 individuals were retained for further analyses. Autosomal admixture proportions for the full sample were estimated as: 53% European, 43% Native American and 4% African (Supplementary Fig. 3). On the basis of a kinship matrix derived from the genome-wide SNP data⁸, we estimated narrow-sense heritability using GCTA⁹ and found moderate and significant values for all traits, with the highest heritability observed for ear protrusion (61%) and the lowest for tragus size (25%) (Supplementary Table 3). Similar heritabilities have been calculated for a range of facial traits using family data^{10,11}.

Primary association analyses. For the primary genome-wide association tests, we applied multivariate linear regression, as

implemented in PLINK¹², using an additive genetic model adjusting for: age, sex, height, BMI and the first five principal components (PCs) calculated from SNP data. The resulting statistics showed no evidence of residual population stratification for any of the traits (Supplementary Fig. 4). To account for the possibility of cryptic relatedness between individuals, we also performed genome-wide association tests using random-effects mixed linear regression models (using FastLMM¹³) and obtained similar results as in the PLINK analyses (Supplementary Table 4). Six of the traits examined showed genome-wide significant association (linear regression P values $<5 \times 10^{-8}$) with SNPs in at least one of the seven genomic regions (Fig. 1; Table 1). A global false discovery rate test across all traits and SNPs identified the same significantly associated regions (Supplementary Table 5). Lobe size is associated with SNPs in four regions (2q12.3, 2q31.1, 3q23 and 6q24.2); three traits show association with two regions: lobe attachment (2q12.3 and 2q31.1), helix rolling (2q12.3 and 4q31.3) and antihelix folding (1p12 and 18q21.2). The remaining two traits show association with a single region: ear protrusion (2q12.3) and antitragus size (1p12). Since the traits examined show some correlation between them, the associations detected are likely not fully independent. Most noticeably, the moderate negative correlation observed between lobe attachment and size is consistent with SNPs at the same two loci (2q12.3 and 2q31.1) showing significant association with both traits. Suggestive association with lobe attachment is also observed for 6q24.2, which is significantly associated with lobe size (Table 1).

Secondary analyses. Since correlations between traits could have a shared underlying genetic basis, we performed a multivariate analysis combining all phenotypes in a single regression model (using MULTIPHEN¹⁴). This analysis identified the same set of regions as in the independent regression tests, but no additional associated regions (Supplementary Fig. 5). We also examined the association signals for all index SNPs (Table 1) in each country separately and combined results as a meta-analysis using METAL¹⁵. For each association, the effects were in the same direction in all countries, the variability of effect size across countries reflecting sample size (Fig. 2; Supplementary Table 6; Supplementary Fig. 6a). There was no significant evidence of effect size heterogeneity across countries for any of the associations. A full genome-wide meta-analysis did not reveal additional regions showing significant association with pinna morphology (Supplementary Fig. 6b). A recent candidate gene study in East Asians also found association for the index SNP in 2q12.3 with ear lobe shape (American Society of Human Genetics Meeting 2014, abstract 1986M). The seven index SNPs of Table 1 provide modest phenotypic prediction accuracy (Supplementary Table 7). The fraction of the phenotypic variance explained by these SNPs is small relative to the heritability estimates (Supplementary Tables 3 and 7), suggesting a polygenic architecture for these traits beyond that captured by the genome-wide significance threshold used.

Features of associated regions. The genomic regions showing genome-wide significant association have features with independent evidence suggestive of an involvement in pinna development. This evidence is particularly strong for the regions in 2q12.3 and 1p12, and we followed-up these two regions with additional experiments.

2q12.3. Includes SNPs associated with four traits (lobe size, lobe attachment, helix rolling and ear protrusion; Table 1). These SNPs extend over ~ 500 kb and show substantial linkage

Q5

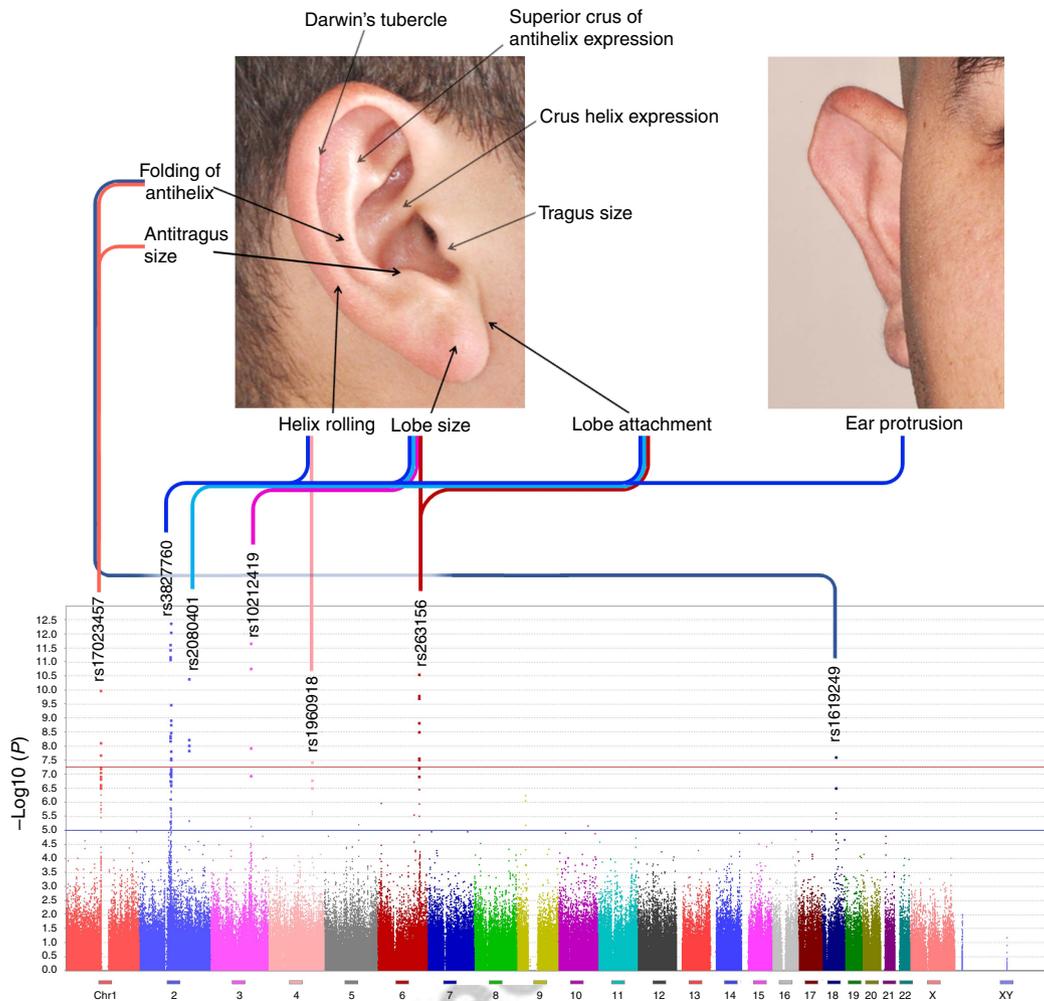


Figure 1 | Genome-wide associations of pinna traits. Variation in 10 pinna traits was evaluated in 5,062 individuals. The photographs at the top indicate the location of the traits examined. At the bottom is shown a composite Manhattan plot for the seven traits showing genome-wide significant association with at least one genome region. The rs numbers for the most significantly associated (index) SNP in each region are provided (Table 1). Each of the seven regions on the Manhattan plot is connected with the associated trait on the photos via a line of different colour (composite panels in this and subsequent figures were made using Photoshop⁴⁹).

disequilibrium (LD; Fig. 3b). Strongest association with all four traits was found for SNP rs3827760 (Table 1), and conditioning on this SNP abolishes the signal of association at other SNPs in the region (Supplementary Fig. 8a). Marker rs3827760 leads to a functional p.Val370Ala substitution in the intracellular death domain of EDAR, the *EDAR*. This residue affects the interaction with the *EDAR*-binding death domain adapter protein *EDAR-ADD*¹⁶; the derived *EDAR* allele encodes a protein with higher activity than the ancestral one^{17,18}. *EDAR* signalling acts during prenatal development to specify the location, size and shape of ectodermal appendages, such as hair follicles, teeth and glands¹⁷. The p.Val370Ala variant has been associated with characteristic tooth morphologies, hair type and sweat gland density in East Asians^{18–23}, where this allele is present at high frequency while being nearly absent in European or African populations (Supplementary Table 8). Consistent with these effects in humans, mice expressing *EDAR370A*, or with increased *EDAR* function, show thickened and straightened hair fibres^{17,20,24,25}.

We examined *Edar* expression in the developing mouse embryo (Fig. 4a). The structure of the pinna is defined prenatally in both mouse and human, in mouse primarily between gestation days 13 and 16 (ref. 2). Using whole-mount *in situ* hybridization, we confirmed *Edar* expression along the distal margin of the

developing pinna (Fig. 4a), in addition to the well-characterized expression in the developing hair follicles¹⁶. *Edar* expression at the distal margin of the embryonic pinna may aid in determining its growth and expansion, thus influencing the ultimate form adopted by the ear. To assess the functional significance of this *Edar* expression during pinna development, we examined postnatal pinna morphology in *Edar* mouse mutants. The *Edar^{dll}* (ref. 24) and *Edar^{Tg951}* (ref. 16) mouse lines have a loss and a gain of *Edar* function, respectively (see Methods). At 2 weeks of age, the pinna of homozygous *Edar^{dll}* mice have a characteristic shape, including a marked dorsal/anterior folding (Fig. 4c). Quantitative assessment of mouse pinna protrusion (assessed by measuring protrusion angle) and shape (assessed by PC analysis of two-dimensional landmark coordinates) revealed significant differences (linear regression *P* value < 0.0007; Supplementary Note 1; Supplementary Figs 9 and 10) between the homozygous *Edar^{dll/dll}* mutant and heterozygous *Edar^{dll/+}* littermates, wild-type mice and *Edar^{Tg951}* mice. Landmark coordinate PC1, capturing 69% of the variation in shape, reflects mainly a change in the extent of helix rolling of the mouse pinna (Fig. 4e; Supplementary Fig. 10d), consistent with one of the effects we observed of *EDAR* variants on human pinna shape. The *Edar* high copy-number transgenic (*Edar^{Tg951}*) does

Table 1 | Chromosomal location and $-\log_{10}(P)$ for index SNPs showing strongest genome-wide association to pinna traits.

Region	SNP	Nearest gene	EP	AS	FoA	HR	LA	LS	TS	CHE	DT	SCoAE
1p12	rs17023457	CART1 binding site	2.37	7.76	10.94	1.12	0.97	0.16	0.27	1.62	0.31	1.26
2q12.3	rs3827760	EDAR	10.00	0.13	1.92	12.00	8.66	11.85	4.33	0.63	0.59	0.13
2q31.1	rs2080401	SP5	0.16	0.40	0.41	0.49	11.03	9.90	1.13	0.50	0.25	0.03
3q23	rs10212419	MRPS22	0.08	0.27	0.06	1.26	1.41	13.49	1.98	0.08	2.59	0.15
4q31.3	rs1960918	LRBA	0.42	3.16	1.13	7.64	0.88	1.81	2.96	0.46	0.70	0.15
6q24.2	rs263156	LOC153910	0.31	0.13	0.99	1.75	5.66	12.61	0.57	0.04	2.18	0.78
18q21.2	rs1619249	LOC100287225	1.22	0.27	7.99	1.22	0.01	0.92	0.92	1.48	0.33	0.09

SNP, single-nucleotide polymorphism. Trait acronyms (Fig. 1): AS, antitragus size; CHE, crus helix expression; DT, Darwin's tubercle; EP, ear protrusion; FoA, folding of antihelix; HR, helix rolling; LA, lobe attachment; LS, lobe size; SCoAE, superior crus of antihelix expression; TS, tragus size. Genome-wide significant values ($-\log_{10}(P) > 7.3$) are highlighted in the darkest shade of red. Below this significance threshold, intensity of colour background is proportional to $-\log_{10}(P)$ value. Effect sizes for associated alleles are shown in Fig. 2 and Supplementary Table 5. Intragenic SNPs are shown in bold. In 1p12, SNP rs17023457 is in an evolutionary conserved binding site for the CART1 transcription factor. GWAS P values were obtained using an additive multivariate regression model as described in Methods.

not display a detectable change in helix rolling likely due to the fact that the wild-type mouse pinna does not have a prominent helix roll, thus hampering the detection of any further pinna flattening that might be caused by increased *Edar* function.

1p12. SNPs in this region show genome-wide association with antihelix folding and antitragus size. This region extends over ~800 kb and overlaps the gene encoding transcription factor *TBX15* (Fig. 3a), a key regulator of cartilaginous and skeletal development in the mouse²⁵. A spontaneous *Tbx15* mouse mutant (called 'droopy ears'), is characterized by altered positioning, projection and shape of the pinnae^{26,27}. In humans, mutations of *TBX15* result in Cousin syndrome, a disorder characterized by craniofacial dysmorphism, including a dysplastic pinna²⁸. Strongest association in this region was observed for intergenic SNP rs17023457 (P value 2×10^{-8} for antitragus size and 1×10^{-11} for antihelix folding Table 1) and conditioning on this SNP abolishes the signal of association at other markers (Supplementary Fig. 8b). Interestingly, rs17023457 is located in a highly conserved binding site for transcription factor *CART1* (cartilage paired-class homeoprotein 1) (Supplementary Fig. 11a), mutations of which have been shown to result in a range of craniofacial and cartilage abnormalities in the mouse²⁶. The location of rs17023457 in a *CART1*-binding site strongly suggests that this SNP could directly influence the expression of neighbouring genes involved in cartilaginous development, such as *TBX15*.

To assess the potential for rs17023457 to alter DNA-protein interactions involving the *CART1*-binding site, electrophoretic mobility shift assays were performed using nuclear extracts from a *CART1*-expressing cell line (Huh7). Double-stranded oligonucleotides containing the rs17023457 T allele demonstrated binding of a nuclear protein, this binding being undetectable for oligonucleotides carrying the derived C allele (Supplementary Fig. 11b). Binding was eliminated upon prior incubation with excess unlabelled *CART1* consensus sequence DNA, confirming the specificity of the assay and supporting the ability of the sequence containing the T allele to bind *CART1* *in vitro*. Reporter constructs containing either the rs17023457 T or C alleles driving the expression of the luciferase gene, showed a decreased expression of 36 and 22% in constructs with the C allele when the genomic sequence was positioned in the forward and reverse orientation, respectively (Supplementary Fig. 11b). These data indicate that *CART1*, or other nuclear DNA-binding proteins with the same sequence specificity, is able to bind to an enhancer

that includes rs17023457, with variation at this SNP determining whether binding and full transactivation occurs or not. The implications of these observations for the *in vivo* regulation of *TBX15* expression remain to be established.

Other regions. For the other regions showing genome-wide association, there is currently less compelling information suggestive of a mechanism explaining their effect on pinna morphology, and we did not attempt their experimental follow-up. SNPs in 3q23 are associated with lobe size, with strongest association being seen for intergenic SNP rs10212419 (P value 3×10^{-14}), in a region with substantial LD over ~500 kb (Fig. 3d). Intriguingly, considering that the ear lobe is made up mainly of loose connective tissue, intergenic SNPs in this region have been strongly associated with keloid formation²⁷, an exaggerated skin wound-healing reaction characterized by excessive deposition of extracellular matrix and collagen fibres. Some highly penetrant mutations across this genomic region have also been found to result in alterations of craniofacial development involving pinna morphology. The nearest SNP to rs10212419 (~59 kb away) encodes mitochondrial ribosomal protein S22 (*MRPS22*), mutations of which can lead to combined oxidative phosphorylation deficiency 5 (*COXPD5*), a disorder whose phenotype can include low-set, posteriorly rotated ears (OMIM #611719). A report of a patient with a similar ear phenotype found a non-synonymous substitution at an evolutionary conserved site within *MRPS22* (ref. 29). Another interesting candidate gene in the vicinity is that encoding the forkhead box L2 transcription factor (*FOXL2*). Coding and regulatory mutations of this gene cause BPES (blepharophimosis, ptosis, epicanthus inversus syndrome)^{30,31}, a disorder characterized by a range of craniofacial abnormalities, including alterations in ear lobe morphology³⁰.

The 2q31.1 region shows considerable LD over ~100 kb and is associated with lobe attachment and size, with strongest association seen for intergenic SNP rs2080401 (P values of 9×10^{-12} and 1×10^{-10} for these two phenotypes, respectively; Fig. 3c). This SNP is located ~31 kb upstream of the gene encoding Specificity Protein 5 (*SP5*), a Sp1-related transcription factor that mediates responses to Wnt/beta-catenin signalling. Of potential interest, there is evidence of an involvement of this pathway in musculo-skeletal development^{32,33}. The region in 6q24.2, associated with lobe size, shows substantial LD over ~500 kb overlapping the hypothetical protein-coding gene *LOC153910*. Strongest association was seen for intronic rs263156 (P value 2×10^{-13} ; Fig. 3f). Potentially of relevance

Q6

Q7

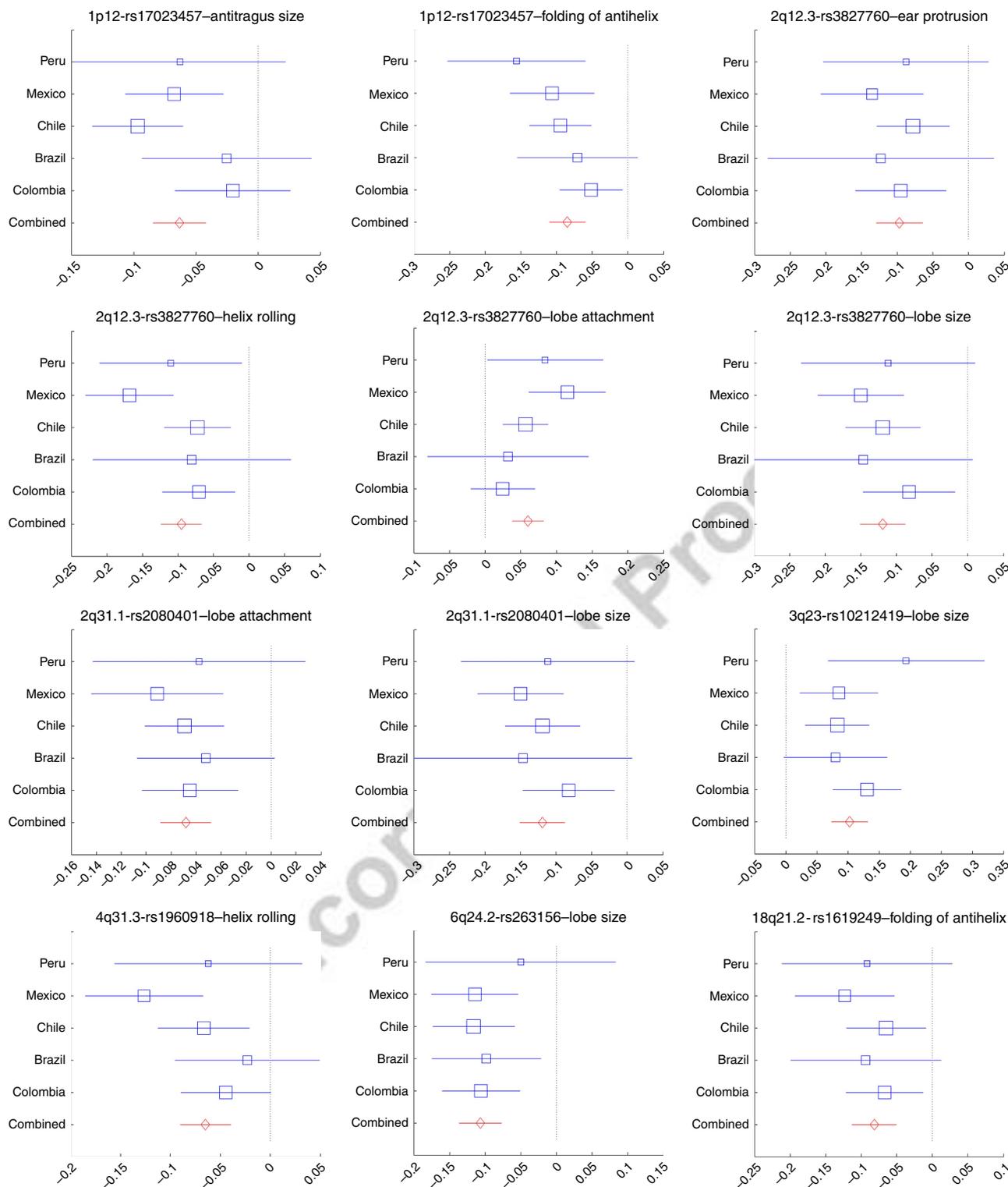


Figure 2 | Meta-analysis of significant genome-wide associations. Effect sizes (in each country sample and in a combined meta-analysis) for the index SNPs and their associated traits (Table 1). Regression coefficients (x axis) estimated in each country are shown as blue boxes (box size indicating sample size). Red diamonds indicate effect sizes estimated in the meta-analysis. Horizontal bars indicate s.e. Results for all the SNPs and traits shown in Table 1 are provided in Supplementary Fig. 6A. The two alleles at each SNP are shown in brackets with effect size referring to the allele in the numerator.

Q13

to ear development, about 100 kb from rs263156 is *GPR126* (G protein-coupled receptor 126), a gene strongly associated with human height^{32–34}. Borderline genome-wide significance was found for rs1960918 in 4q31.3 (P value 2×10^{-8} for helix rolling; Fig. 3e) and rs1619249 in 18q21.2 (P value 1×10^{-8} for antihelix folding; Fig. 3g). Intronic marker rs1960918 is in an LD

region of ~400 kb overlapping the *LRBA* gene, whose product (LPS-responsive vesicle trafficking, beach and anchor containing) is known to be involved in coupling signal transduction, vesicle trafficking and immunodeficiency, with no obvious functional connection to pinna development. Intergenic SNP rs1619249 is in an LD region of about 300 kb, the closest candidate being

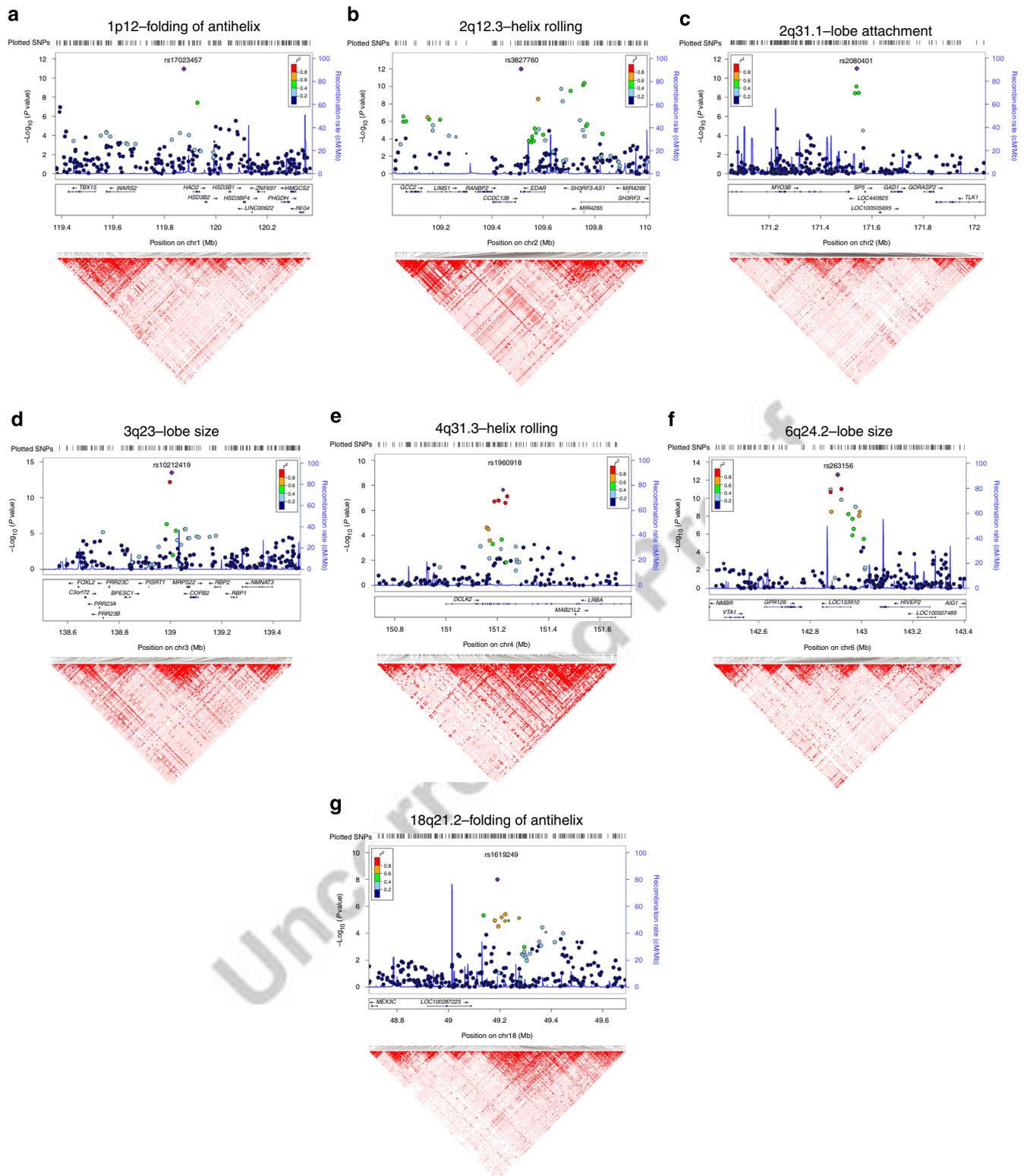


Figure 3 | LocusZoom and linkage disequilibrium plots of significantly associated genetic regions. Plots of the seven genomic regions showing genome-wide significant association to pinna traits (Table 1). For regions showing association with several pinna traits, we present here only results for the trait with strongest association (plots for the other associated traits are presented in Supplementary Fig. 7). Association results from a multivariate linear regression model (on a $-\log_{10} P$ scale; left y axis) are shown for SNPs ~ 500 kb on either side of the index SNP (that is, the SNP with the smallest P value, purple diamond; Table 1) with the marker (dot) colour indicating the strength of LD (r^2) between the index SNP and that SNP in the 1000 Genomes AMR data set. Local recombination rate in the AMR data is shown as a continuous blue line (scale on the right y axis). Genes in each region, their intron-exon structure, direction of transcription and genomic coordinates (in Mb, using the NCBI human genome sequence, Build 37, as reference) are shown at the bottom. Plots were produced with LocusZoom⁵⁰. Below each region we also show an LD heatmap (using D' , ranging from red indicating $D' = 1$ to white indicating $D' = 0$) produced using Haploview⁵¹. Note that the location of SNPs on the LD heatmap can be shifted relative to the regional display on top of it⁵²⁻⁵⁷.

Q14

Q15

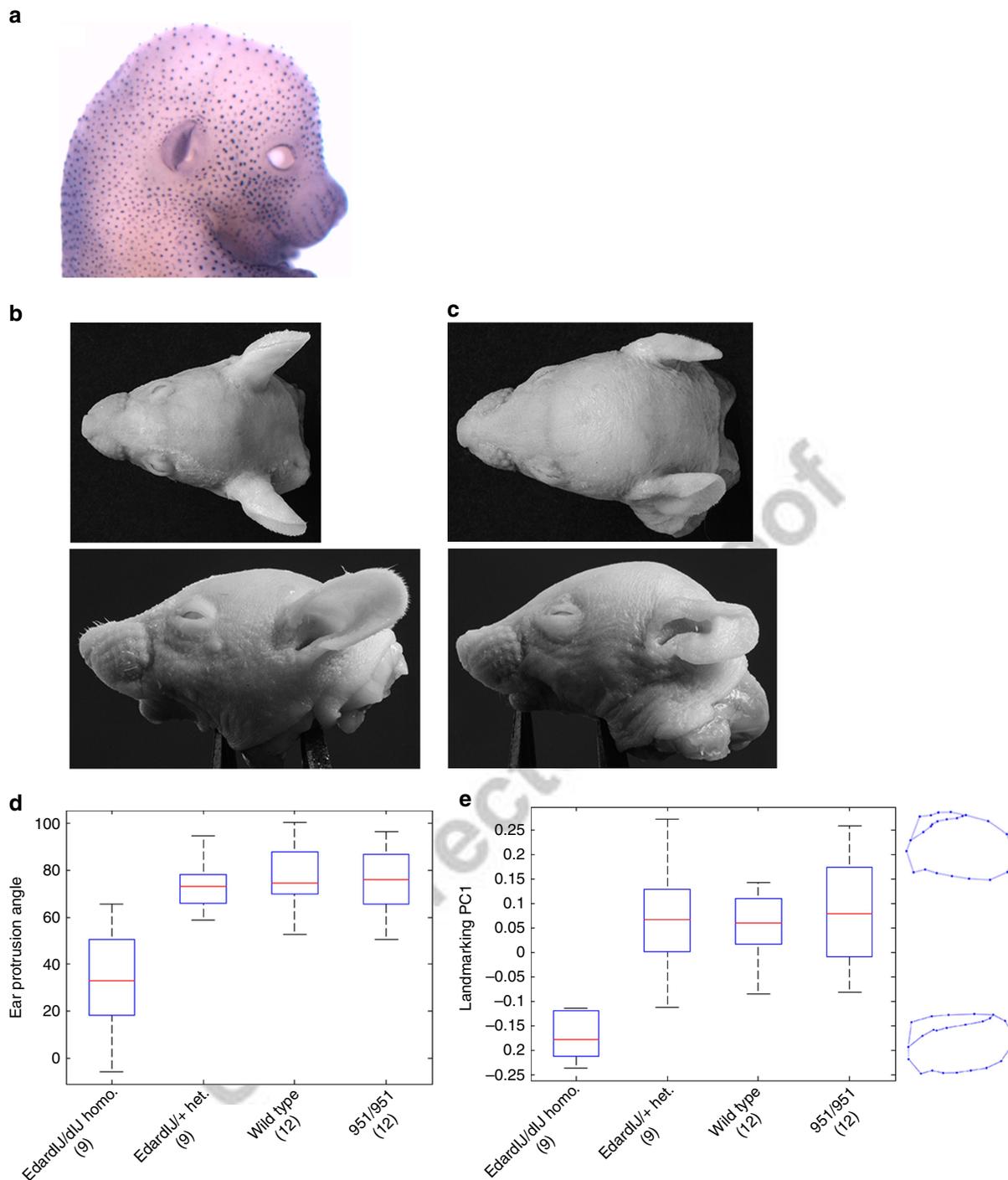


Figure 4 | Effect of *Edar* genetic variation on mouse pinna shape. (a) Whole-mount *in situ* hybridization detecting *Edar* expression in the developing mouse embryo at 15 days' gestation. (b-e) Impact of *Edar* genotype on mutant mouse ear shape. (b,c) Photographs of wild-type (b) and homozygous *Edar^{dlJ}* (c) mutant mice from top and side views (respectively, on the upper and lower panels). (d,e) Boxplots, respectively, of ear protrusion angle and of landmark coordinate PC1 (y axis) for different mouse genotypes (x axis) (Supplementary Note 1; Supplementary Fig. 10 shows additional analyses for ear protrusion). Boxplot whiskers extend to data points within 1.5 times the interquartile range on both sides. In d,e numbers in parenthesis below genotypic categories refer to the number of mice examined for each. On the right of e are shown average PC1 wireframes for *Edar^{dlJ}* homozygous mice (bottom) or for mice with other genotypes (top).

Q16

LOC100287225 (about 100 kb from rs1619249), a hypothetical gene of unknown function.

Discussion

In conclusion, we have identified the first genetic variants influencing normal variation in human pinna morphology. It will

be important to evaluate further the role of these regions in ear development and its disorders. Since pinna morphology in mammals shows extensive evidence of evolutionary adaptation, particularly in relation to thermoregulation, acoustic perception and sound localization³⁵⁻³⁷, it will be interesting to examine whether variation in these genomic regions relates to adaptive

changes in the pinna across species. Finally, there is increasing interest in the use of pinna variation in forensics^{38,39}, and development of such applications may benefit from a refined knowledge of the genetic determinants of pinna morphology.

Methods

Study subjects. In total, 5,062 volunteers from 5 Latin American countries (Brazil, Chile, Colombia, Mexico and Peru), part of the CANDELA consortium sample (<http://www.ucl.ac.uk/silva/candela>)⁷, were included in this study. Ethics approval was obtained from: Universidad Nacional Autónoma de México (Mexico), Universidad de Antioquia (Colombia), Universidad Peruana Cayetano Heredia (Peru), Universidad de Tarapacá (Chile), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Brazil) and University College London (UK). All participants provided written informed consent. Blood samples were collected by a certified phlebotomist and DNA extracted following standard laboratory procedures. Five digital photographs of the face: left side (-90°), left angle (-45°), frontal (0°), right angle (45°) and right side (90°) were taken from ~ 1.5 m at eye level using a Nikon D90 camera fitted with a Nikkor 50 mm fixed focal length lens. Other phenotypes including height, weight, BMI, age and sex were also recorded for each participant⁷.

Pinna phenotyping. Right side, right angle and frontal photographs were used to score 10 pinna traits. These were (Fig. 1): ear protrusion, lobe size, lobe attachment, tragus size, antitragus size, helix rolling, folding of antihelix, crus helix expression, superior crus of antihelix expression and Darwin's tubercle. Each trait was scored as an ordered categorical variable, with 0 being the lowest level of expression of the trait and 2 the highest (Supplementary Fig. 1). Software to assist scoring of photographs was developed in MATLAB⁴⁰. Intraclass correlation coefficients⁴¹ calculated by double-scoring photographs of 100 subjects indicate a moderate-to-high intra- and inter-rater reliability of the trait scores (Supplementary Table 9). Photographs for all the volunteers were scored by the same rater (G.R.).

DNA genotyping and quality control. DNA samples from participants were genotyped on the Illumina HumanOmniExpress chip including 730,525 SNPs. PLINK¹² was used to exclude SNPs and individuals with $> 5\%$ missing data, markers with minor allele frequency $< 1\%$ and related individuals. After applying these filters, 680,634 SNPs were retained for further analysis. Owing to the admixed nature of the study sample (Supplementary Fig. 3), there is an inflation in Hardy-Weinberg P values. We therefore did not exclude markers based on the Hardy-Weinberg deviation.

Statistical analyses. P values for Pearson correlation coefficients were obtained by permutation. All regressions were performed using an additive multivariate linear or logistic model, providing P values that are obtained from the standard t -statistic derived from their regression coefficients. Narrow-sense heritability (defined as the phenotypic variance explained by a genetic relatedness matrix, GRM, computed from the SNP data) for the pinna traits examined was estimated using GCTA⁹ by fitting an additive linear model with a random-effect term whose variance is given by the GRM, with age, sex, height and BMI as covariates. The GRM was obtained using the LDK approach⁸, which accounts for LD between SNPs. An LD-pruned set of 93,328 autosomal SNPs was used to estimate continental ancestry using ADMIXTURE⁴² (Supplementary Fig. 3). PLINK¹² was used to perform the primary genome-wide association tests for each phenotype using multiple linear regression with an additive genetic model incorporating age, sex, height, BMI and 5 (or 10) genetic PCs as covariates. These genetic PCs were obtained (using MATLAB⁴⁰) from an LD-pruned set of 93,328 SNPs. Inspection of the scree plot (Supplementary Fig. 4), and the PC scatterplots (not shown), indicates that only the first 5 PCs show evidence of substructure. Consistent with this, PLINK results with 5 or 10 PCs were nearly identical. The Q - Q plots for all PLINK analyses showed no sign of inflation, the genomic control factor lambda being < 1.03 in all cases. To account for multiple testing, we also applied (using MATLAB⁴⁰) a global FDR⁴³ test across all traits and SNPs (Supplementary Table 5). To account for the possibility that cryptic relatedness among the individuals studied could affect the linear regression results, we also performed a GWAS using mixed-effects regression models, as implemented in FastLMM¹³. In this approach, the GRM again specifies the variance of a random effect (other aspects of the regression being as for the simpler model used by PLINK). Results from these random-effect regressions were similar to those obtained in the primary PLINK analyses (Supplementary Table 4). To consider the correlation between pinna traits, we performed a GWAS combining all traits in a single analysis using a multivariate regression model as implemented in MULTIPHEN¹⁴ on an LD-pruned data set (Supplementary Fig. 5). In this approach, a SNP genotype is taken as the dependent variable and all phenotypes are jointly taken as covariates. Due to this increased complexity the runtime per SNP is considerably longer, so an LD-pruned subset of 189,707 SNPs was used for this analysis (ensuring that all genome-wide or suggestive SNPs from the primary analyses are included). A meta-analysis (Supplementary Table 6; Supplementary Fig. 6) was carried out for each of the traits by performing a GWAS separately in each country sample (using PLINK as above) and combining the results in METAL¹⁵. Forest plots were produced with MATLAB combining all

regression coefficients and s.e. Cochran's Q -statistic was computed for each trait to test for effect size heterogeneity across country samples. Prediction of trait phenotypes from genotypes at the seven index SNPs identified in the primary GWAS analysis (Table 1) was performed in MATLAB⁴⁰ using linear regression and nonlinear neural network models⁴⁴ (Supplementary Table 7).

Whole-mount *in situ* hybridization of mouse embryos. Embryos were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS at 4 °C overnight, dehydrated to methanol, rehydrated, treated with proteinase K, refixed and hybridized to a digoxigenin-labelled cRNA covering the entire *Edar* transcript (AF160502). Hybridization was performed in 50% formamide, 750 mM NaCl, 75 mM Na₃C₆H₅O₇, 1% SDS containing 50 μ g ml⁻¹ yeast RNA and 50 μ g ml⁻¹ heparin at 65 °C overnight. After washing and blocking of embryos in 10% sheep serum, the signal was detected using 1/2,000 sheep anti-digoxigenin conjugated to alkaline phosphatase (sheep anti-digoxigenin alkaline phosphatase antibody: 11093274910, Roche Applied Science, Mannheim, Germany) followed by NBT (nitro-blue tetrazolium chloride) and BCIP (5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate p-toluidine) staining in 100 mM NaCl, 100 mM Tris pH 9.5, 50 mM MgCl₂ and 0.1% Tween 20.

Animals and sample collection. Animal studies were reviewed and approved by The Roslin Institute Animal Welfare and Ethical Review Body. The humane care and use of mice (*Mus musculus*) in this study was carried out under the authority of the appropriate UK Home Office Project License. Forty-two mouse head samples, 18 male and 24 female, were included in the analysis aggregating over four genotype categories. All mice were on the FVB/N strain background. The loss-of-function *Edar*^{dll} line carries the downless^{Jackson} allele, encoding *Edar* p. E379K. The gain-of-function *Edar*^{Tg951} line carries ~ 16 copies of the entire *Edar* locus on a 200-kb yeast artificial chromosome (thus, homozygous transgenic animals carry about 34 copies of the gene in total)⁴⁵. Homozygous transgenic animals were used in this study. Fourteen- and 15-day-old animals were weighed and culled by intraperitoneal administration of pentobarbitone. After measurement of body length, heads were depilated using Vee cream (Reckitt Benckiser, Slough, UK), rinsed with water and stored in 2% formaldehyde in PBS.

The variation in age and sex helped to collect animals of more diverse weights and sizes, so that we could control more readily for effects of size and weight on pinna shape. Photographs of superior and lateral views of the head were taken and were blinded prior to landmarking for analysis. A scale was included in the photographs for calibration. Landmark homology across specimens was achieved by controlling the head orientation in all photos (for example, by placing the sagittal plane of the head orthogonal to the anterior-posterior axis of the camera lens). This fixed orientation avoids rolling, heading and pitching rotations and guarantees the coplanarity of landmarks placed on the pinnae (see below).

Mouse pinna phenotyping. Overall, pinna shape variation was examined using geometric morphometric techniques⁴⁶. Twenty-seven landmarks and semilandmarks (depicted in Supplementary Fig. 8) were digitized, scaled and processed using TPSDig and TPSUtil (<http://life.bio.sunysb.edu/morph/>). Semilandmarks were placed along the contour of the pinna and other contours of interest, and the TPSRelW (<http://life.bio.sunysb.edu/morph/>) routine was used to allow semilandmarks to slide so as to minimize bending energy. Reliability of pinna landmarking was evaluated by scoring the same landmarks by a second rater and examining the variation (Supplementary Table 10). Generalized procrustes analysis was used to remove the effects of translation, rotation and scaling⁴⁶. After superimposition of the generalized procrustes analysis-adjusted landmark coordinates, only the shape component remained in the aligned specimens. The superimposed coordinates were exported to the software MorphoJ⁴⁷ to obtain PCs of shape. Ear protrusion was defined in two ways: angle between the two protruding pinnae, and distance between the two pinnae tips as a proportion of head width (Supplementary Fig. 9). The effect of *Edar* genotype on pinna shape and protrusion was tested using multivariate regression analysis in R⁴⁸, adjusting for age, sex, body length, body weight, head length and head width. Two regression models were tested using two different genotype encodings (Supplementary Note 1): one with four distinct genotype categories and one considering genotypes as a binary variable, based on the notion that the *Edar* loss-of-function homozygous genotype (*Edar*^{dll}/*Edar*^{dll}) is recessive.

Human tissue culture for the CART1-binding assay. The human hepatoma Huh7 (ECACC, UK) cell line was grown in high-glucose DMEM (PAA) supplemented with 2 mM l-glutamine and 10% fetal bovine serum and maintained in 5% CO₂ at 37 °C. Nuclear extracts were obtained from Huh7 cells using the NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents Kit (Pierce, USA) as described in the manual, with the addition of Complete Protease Inhibitor (Roche, UK) to buffers CER I and NER I.

Electrophoretic mobility shift assay. Probe sequences:

rs17023457 T > C
rs17023457 T forward 5'-ACTAACTAATCAACATTCCTTTGCGAATACA-3'
rs17023457 T reverse 5'-TGTATTCGCAAAGGAATGTTGATTAGTTAGT-3'

rs17023457 C forward 5'-ACTAACTAATCAACACTCCTTTGCGAATACA-3'
 rs17023457 C reverse 5'-TGTATTTCGCAAAGGAGTGTGGATTAGTTAGT-3'
 CART1 consensus F 5'-CCACATAATTACATTATCTTG-3'
 CART1 consensus R 5'-CAAGATAATGTAATTATGTGG-3'.

Probes were labelled using the Biotin 3'-End DNA Labelling Kit (Pierce) as described in the manufacturer's manual. Binding reactions consisted of 2 µl 10 × binding buffer (100 mM Tris, 500 mM KCl; pH 7.5), 1 µg p[dI-dC], 200 fmol biotin-labelled DNA, made to a total of 20 µl with H₂O and incubated at 25 °C for 30 min, followed by the addition of 5 × loading buffer. Competition reactions were performed with 30-min incubation on ice, prior to addition of labelled probes, using 100 × CART1 cold-competitor oligonucleotides. Samples were run on 6% polyacrylamide gel, electrophoresed for 150 min at 120 V.

Luciferase reporter assay. Luciferase reporter vectors were based on the pGL3 Promoter vector (Promega), with a 872-bp genomic sequence surrounding rs17023457 (Supplementary Fig. 11c) inserted upstream of the SV40 promoter in both orientations using the following primers designed for the InFusion PCR Cloning kit (Clontech):

Forward

Ear1FF: 5'-TCTATCGATAGGTACCCATCTACGGGTCTGGAGGAG-3'

Ear1FR: 5'-GATCGCAGATCTCGAGAGCTCATCCAAGGTCCCAA-3'

Reverse

Ear2RF: 5'-GATCGCAGATCTCGAGCATCTACGGGTCTGGAGGAG-3'

Ear2RR: 5'-TCTATCGATAGGTACCCAGCTCATCCAAGGTCCCAA-3'.

Site-directed mutagenesis was performed using the QuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies) as detailed in the manual, using the following oligonucleotide sequences (designed for reverse strands):

Primer name; primer sequence (5'-3')

SDMFFC 5'-GTATTCGCAAAGGAGTGTGATTAGTTAGTGGTCCGGTATCAT-3'

SDMFCR 5'-ATGATACCGACCACTAATACTCAACACTCCTTTGCGAATAC-3'

Primer name; primer sequence (5'-3')

SDMRFG 5'-GACCACTAATACTCAACACTCCTTTGCGAATACAGCTTCAG-3'

SDMRRG 5'-CTGAAGCTGTATTTCGCAAAGGAGTGTGATTAGTTAGTGTGC-3'

All constructs were verified by direct sequencing.

Huh7 cells were seeded at a density of 2×10^4 per well, in a 96-well plate and grown to confluence overnight in the appropriate media (described above). Cells were transfected with 250 ng pGL3 reporter construct, with 10 ng pRLTK as a transfection control. Transfection was carried out in Opti-Mem serum-free media (Sigma, UK) using Lipofectamine 3000 (Invitrogen) as described in the manual. Media was replaced 24 h following transfection, with serum-containing media described above, and the cells left for 2 days before harvesting. Cells were lysed using Passive Lysis Buffer (Promega) and luciferase expression was determined using the Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega), and measured in the Tropic TR717 Microplate Luminometer (PE Applied Biosystems, UK). For each construct used, the transfection assay was performed using 12 wells of a 96-well plate and the mean luciferase reading reported. The experiment was repeated in triplicate using fresh vector preparations. Analysis of variance was performed to compare the effect of the T and C alleles on the luciferase readings, taking into account the variability across replicates and wells.

References

- Gleeson, M. J. & Clarke, R. C. *Scott-Brown's Otorhinolaryngology: Head and Neck Surgery* (CRC Press, 2008).
- Cox, T. C., Camci, E. D., Vora, S., Luquetti, D. V. & Turner, E. E. The genetics of auricular development and malformation: new findings in model systems driving future directions for microtia research. *Eur. J. Med. Genet.* **57**, 394–401 (2014).
- Azaria, R., Adler, N., Silfen, R., Regev, D. & Hauben, D. J. Morphometry of the adult human earlobe: a study of 547 subjects and clinical application. *Plast. Reconstr. Surg.* **111**, 2398–2402 discussion 2403–2404 (2003).
- Sforza, C. *et al.* Age- and sex-related changes in the normal human ear. *Forensic Sci. Int.* **187**, 110 e1–110 e7 (2009).
- Alexander, K. S., Stott, D. J., Sivakumar, B. & Kang, N. A morphometric study of the human ear. *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.* **64**, 41–47 (2011).
- Minoux, M. *et al.* Mouse Hoxa2 mutations provide a model for microtia and auricle duplication. *Development* **140**, 4386–4397 (2013).
- Ruiz-Linares, A. *et al.* Admixture in latin america: geographic structure, phenotypic diversity and self-perception of ancestry based on 7,342 individuals. *PLoS Genet.* **10**, e1004572 (2014).
- Speed, D., Hemani, G., Johnson, M. R. & Balding, D. J. Improved heritability estimation from genome-wide SNPs. *Am. J. Hum. Genet.* **91**, 1011–1021 (2012).
- Yang, J., Lee, S. H., Goddard, M. E. & Visscher, P. M. GCTA: a tool for genome-wide complex trait analysis. *Am. J. Hum. Genet.* **88**, 76–82 (2011).
- Carson, E. A. Maximum likelihood estimation of human craniometric heritabilities. *Am. J. Phys. Anthropol.* **131**, 169–180 (2006).
- Martinez-Abadias, N. *et al.* Heritability of human cranial dimensions: comparing the evolvability of different cranial regions. *J. Anat.* **214**, 19–35 (2009).
- Purcell, S. *et al.* PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am. J. Hum. Genet.* **81**, 559–575 (2007).
- Lippert, C. *et al.* FaST linear mixed models for genome-wide association studies. *Nat. Methods* **8**, 833–835 (2011).
- O'Reilly, P. F. *et al.* MultiPhen: joint model of multiple phenotypes can increase discovery in GWAS. *PLoS ONE* **7**, e34861 (2012).
- Willer, C. J., Li, Y. & Abecasis, G. R. METAL: fast and efficient meta-analysis of genomewide association scans. *Bioinformatics* **26**, 2190–2191 (2010).
- Headon, D. J. *et al.* Gene defect in ectodermal dysplasia implicates a death domain adapter in development. *Nature* **414**, 913–916 (2001).
- Mikkola, M. L. Molecular aspects of hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Am. J. Med. Genet. A* **149 A**, 2031–2036 (2009).
- Fujimoto, A. *et al.* A scan for genetic determinants of human hair morphology: EDAR is associated with Asian hair thickness. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 835–843 (2008).
- Fujimoto, A. *et al.* A replication study confirmed the EDAR gene to be a major contributor to population differentiation regarding head hair thickness in Asia. *Hum. Genet.* **124**, 179–185 (2008).
- Kimura, R. *et al.* A common variation in EDAR is a genetic determinant of shovel-shaped incisors. *Am. J. Hum. Genet.* **85**, 528–535 (2009).
- Park, J. H. *et al.* Effects of an Asian-specific nonsynonymous EDAR variant on multiple dental traits. *J. Hum. Genet.* **57**, 508–514 (2012).
- Tan, J. *et al.* The adaptive variant EDARV370A is associated with straight hair in East Asians. *Hum. Genet.* **132**, 1187–1191 (2013).
- Kamberov, Y. G. *et al.* Modeling recent human evolution in mice by expression of a selected EDAR variant. *Cell* **152**, 691–702 (2013).
- Monreal, A. W. *et al.* Mutations in the human homologue of mouse dl cause autosomal recessive and dominant hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Nat. Genet.* **22**, 366–369 (1999).
- Singh, M. K. *et al.* The T-box transcription factor Tbx15 is required for skeletal development. *Mech. Dev.* **122**, 131–144 (2005).
- Qu, S., Tucker, S. C., Zhao, Q., deCrombrugge, B. & Wisdom, R. Physical and genetic interactions between Alx4 and Cart1. *Development* **126**, 359–369 (1999).
- Nakashima, M. *et al.* A genome-wide association study identifies four susceptibility loci for keloid in the Japanese population. *Nat. Genet.* **42**, 768–771 (2010).
- Lausch, E. *et al.* TBX15 mutations cause craniofacial dysmorphism, hypoplasia of scapula and pelvis, and short stature in Cousin syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **83**, 649–655 (2008).
- Smits, P. *et al.* Mutation in mitochondrial ribosomal protein MRPS22 leads to Cornelia de Lange-like phenotype, brain abnormalities and hypertrophic cardiomyopathy. *Eur. J. Hum. Genet.* **19**, 394–399 (2011).
- Rimoin, D. L. & Emery, A. E. H. *Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics* (Churchill Livingstone, 2007).
- Weidinger, G., Thorpe, C. J., Wuennenberg-Stapleton, K., Ngai, J. & Moon, R. T. The Sp1-related transcription factors sp5 and sp5-like act downstream of Wnt/beta-catenin signaling in mesoderm and neuroectoderm patterning. *Curr. Biol.* **15**, 489–500 (2005).
- Lette, G. *et al.* Identification of ten loci associated with height highlights new biological pathways in human growth. *Nat. Genet.* **40**, 584–591 (2008).
- Gudbjartsson, D. F. *et al.* Many sequence variants affecting diversity of adult human height. *Nat. Genet.* **40**, 609–615 (2008).
- Soranzo, N. *et al.* Meta-analysis of genome-wide scans for human adult stature identifies novel loci and associations with measures of skeletal frame size. *PLoS Genet.* **5**, e1000445 (2009).
- Coleman, M. N. & Ross, C. F. Primate auditory diversity and its influence on hearing performance. *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* **281**, 1123–1137 (2004).
- Coleman, M. N. & Colbert, M. W. Correlations between auditory structures and hearing sensitivity in non-human primates. *J. Morphol.* **271**, 511–532 (2010).
- Lieberman, D. *The Evolution Of The Human Head* xi, 756 (Belknap Press of Harvard Univ. Press, 2011).
- Abaza, A., Ross, A., Herbert, C., Harrison, M. A. F. & Nixon, M. S. A survey on ear biometrics. *ACM Comput. Surv.* **45**, 1–35 (2013).
- Junod, S., Pasquier, J. & Champod, C. The development of an automatic recognition system for earmark and earprint comparisons. *Forensic Sci. Int.* **222**, 170–178 (2012).
- The MathWorks, Inc. *MATLAB and Statistics Toolbox Release 2013b* (MathWorks, Inc., 2013).
- Shrout, P. E. & Fleiss, J. L. Intra-class correlations: uses in assessing rater reliability. *Psychol. Bull.* **86**, 420–428 (1979).
- Alexander, D. H., Novembre, J. & Lange, K. Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. *Genome Res.* **19**, 1655–1664 (2009).

43. Dudoit, S. & van der Laan, M. J. *Multiple Testing Procedures with Applications to Genomics* xxxiii, 588 (Springer, 2008).
44. Hastie, T., Tibshirani, R. & Friedman, J. H. *The Elements of Statistical Learning: Data Mining, Inference, and Prediction* xxii, 745 (Springer, 2009).
45. Mou, C. *et al.* Enhanced ectodysplasin-A receptor (EDAR) signaling alters multiple fiber characteristics to produce the East Asian hair form. *Hum. Mutat.* **29**, 1405–1411 (2008).
46. Zelditch, M. L., Swiderski, D. L., Sheets, H. D. & Fink, W. L. *Geometric Morphometric for Biologists* (Elsevier, 2004).
47. Klingenberg, C. P. Morpho: an integrated software package for geometric morphometrics. *Mol. Ecol. Resour.* **11**, 353–357 (2011).
48. R Development Core Team. R: a Language and Environment for Statistical Computing R Foundation for Statistical Computing (2010).
49. Adobe Systems Incorporated. *Adobe Photoshop CS6* (2012).
50. Pruim, R. J. *et al.* LocusZoom: regional visualization of genome-wide association scan results. *Bioinformatics* **26**, 2336–2337 (2010).
51. Barrett, J. C., Fry, B., Maller, J. & Daly, M. J. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* **21**, 263–265 (2005).
52. Bryk, J. *et al.* Positive selection in East Asians for an EDAR allele that enhances NF- κ B activation. *PLoS ONE* **3**, e2209 (2008).
53. Curry, G. A. Genetical and development studies on droopy-eared mice. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **7**, 39–65 (1959).
54. Candille, S. I. *et al.* Dorsoroventral patterning of the mouse coat by Tbx15. *PLoS Biol.* **2**, E3 (2004).
55. Beysen, D. *et al.* Deletions involving long-range conserved nongenic sequences upstream and downstream of FOXL2 as a novel disease-causing mechanism in blepharophimosis syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **77**, 205–218 (2005).
56. D'Haene, B. *et al.* Disease-causing 7.4 kb cis-regulatory deletion disrupting conserved non-coding sequences and their interaction with the FOXL2 promoter: implications for mutation screening. *PLoS Genet.* **5**, e1000522 (2009).
57. Dunty, Jr W. C., Kennedy, M. W., Chalamalasetty, R. B., Campbell, K. & Yamaguchi, T. P. Transcriptional profiling of Wnt3a mutants identifies Sp transcription factors as essential effectors of the Wnt/ β -catenin pathway in neuromesodermal stem cells. *PLoS ONE* **9**, e87018 (2014).

Acknowledgements

We thank the volunteers for their enthusiastic support. We also thank Alvaro Alvarado, Mónica Ballesteros Romero, Mari-Wyn Burley, Ricardo Cebrecos, Debajyoti Choudhury, Miguel Ángel Contreras Sieck, Francisco de Ávila Becerril, Joyce De la Piedra, María Teresa Del Solar, Paola Everardo Martínez, William Flores, Martha Granados Riveros, Wendy Hart, Ilich Jafet Moreno, Jodie Lampert, Mowmita Basak Mow, Paola León-Mimila, Javier Mendoza, Francisco Quispealaya, Diana Rogel Diaz,

Ruth Rojas, Norman Russell, Vanessa Sarabia and Fabienne Tessiot for assistance with volunteer recruitment, sample processing and data entry. We are very grateful to the institutions that kindly provided facilities for the assessment of volunteers, including: Escuela Nacional de Antropología e Historia and Universidad Nacional Autónoma de México (Mexico); Pontificia Universidad Católica del Perú, Universidad de Lima and Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Peru). This work was funded by grants from the Leverhulme Trust (F/07 134/DF to A.R.-L.), BBSRC (BB/I021213/1 to A.R.-L. and Institute Strategic Programme grant to The Roslin Institute), Universidad de Antioquia (GENMOL sostenibilidad 2015–2016 and MASO 2013–2014). S.E.H. holds a British Heart Foundation Chair and acknowledges funding from grant RG008/08 and is also supported by the National Institute for Health Research University College London Hospitals Biomedical Research Centre. A.J.P.S. is funded by a BHF Fellowship.

Author contributions

K.A., A.J.P.S., M.Q.-S., J.R., M.C., M.F.B., R.G.-J., D.H., D.B. and A.R.-L. conceived and designed the study. K.A., V.A.-A., C.J., W.A., M.F., M.P., G.M.P., R.B.L., J.G.-V., H.V.-R., T.H., V.R., C.C.S.d.C., V.G., M.H., V.V. and D.H. contributed reagents/material. G.R., A.J.P.S., E.K., J.P., M.Q.-S., M.C., D.H., K.A., V.A.-A., C.J., W.A., M.F., M.P., G.M.P., R.B.L., J.G.-V., H.V.-R., T.H., V.R., C.C.S.d.C., V.G., M.H. and V.V. performed experiments. K.A., A.J.P.S., M.Q.-S., M.C., D.H. and A.R.-L. analysed data. V.A.-A., J.G.-V., C.G., G.P., L.S.-F., F.M.S., M.-C.B., S.C.-Q., F.R., G.B., R.C., J.R., M.C., K.A., S.E.H., R.G.-J., D.H., D.B. and A.R.-L. supervised research/PI. K.A. and A.R.-L. wrote the manuscript. A.J.P.S., C.G., G.P., S.C.-Q., J.R., M.C., M.F.B., R.G.-J., D.H. and D.B. critically revised the manuscript.

Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at <http://www.nature.com/naturecommunications>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

How to cite this article: Adhikari, K. *et al.* A genome-wide association study identifies multiple loci for variation in human ear morphology. *Nat. Commun.* **6**:7500 doi: 10.1038/ncomms8500 (2015).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Anexo 7: Resultados sobre la dependendencia lineal entre la ingesta de hormonas y la asimetría fluctuante facial. Estas mujeres fueron exluidas del análisis.

Tabla B. Tabulación cruzada del sexo y variables analizadas

Variable/condicion	Sexo		Totales		
	Mujeres	Hombres	No	Si	
Malformación	No	Si	No	Si	Totales
Malformación	2094	26	1983	20	4123
Traumatismos	2025	96	1795	209	4125
Tratamiento hormonal	1842	275	1971	32	4120
Cirurgia ortodoncia	799	1321	821	1183	4124

Tabla C. Resultados del ANOVA de una via (a), test de Welch (b) y prueba de Levene (c) de las variables utilizadas.

a) ANOVA de una vía					
	Mujeres				
	gl	SS	MS	F	p
Malformación	1	0.10	0.10	0.081	0.775
Traumatismos	1	0.72	0.72	0.558	0.455
Tratamiento hormonal	1	65.52	65.52	52.268	<.0001*
Cirurgia ortodoncia	1	3.31	3.31	2.583	0.108
Hombres					
Malformación	1	0.77	0.77	0.643	0.423
Traumatismos	1	1.02	1.02	0.848	0.357
Tratamiento hormonal	1	3.80	3.80	3.168	0.075
Cirurgia ortodoncia	1	2.99	2.99	2.489	0.115
b) Prueba de Welch					
	Mujeres				
	gl	gl den	F	p	
Malformación	1	25.35	0.046	0.832	
Traumatismos	1	107.04	0.701	0.404	
Tratamiento hormonal	1	328.57	42.330	<.0001*	
Cirurgia ortodoncia	1	1636.90	2.552	0.110	
Hombres					
Malformación	1	18.40	0.722	0.406	
Traumatismos	1	250.92	0.854	0.356	
Tratamiento hormonal	1	31.98	3.040	0.091	
Cirurgia ortodoncia	1	1742.07	2.497	0.114	
c) Prueba de Levene					
	Mujeres				
	gl	gl den	F	p	
Malformación	1	2098	3.535	0.060	
Traumatismos	1	2099	1.378	0.241	
Tratamiento hormonal	1	2095	9.136	0.003	
Cirurgia ortodoncia	1	2098	0.685	0.408	
Hombres					
Malformación	1	1976	0.163	0.687	
Traumatismos	1	1977	0.318	0.573	
Tratamiento hormonal	1	1976	0.000	0.988	
Cirurgia ortodoncia	1	1977	0.081	0.776	

*Significación persistente en iteracion con residuales de las covariables en el modelo de regresión multivariada.

Anexo 8: Detalle de los antropobiotomas o *anthropomes*.

Los *anthropomes* (Biotomas antropogénicos o "biotomas humanos") representan los patrones ecológicos globales creados por las interacciones humanas directas y sostenidas con los ecosistemas, incluyendo sitios urbanos, pueblos, tierras de cultivo, pastizales y zonas seminaturales. Así como los biomas clásicos están formados por patrones globales del clima, los *anthropomes* están formados por patrones mundiales en las poblaciones humanas y el uso de la tierra en el largo plazo. El término se originó por Erle Ellis y Navin Ramankutty en 2007 en su artículo en *Frontiers in Ecology and the Environment* como una forma más amplia para integrar a los humanos en la ecología mundial. Para mayor referencias de los *anthropomes* o antropobiotomas cada véase la Figura

Figura A. Referencia de los antropobiotomas y su modificación a través del tiempo (1700-2000). La barra lateral derecha de la imagen representa los subtipos de antropobiotomas referida en el texto.

