

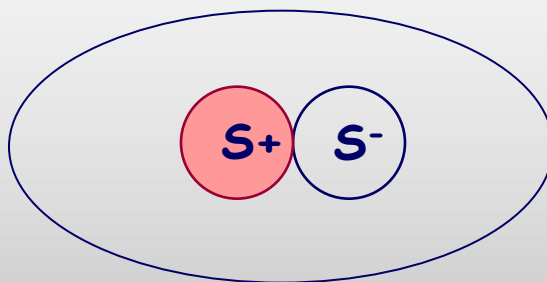
Il Principio di Hardy-Weinberg

Conoscendo le frequenze alleliche di un marcatore è possibile inferire la distribuzione delle frequenze genotipiche, a patto che:

- 1) L'organismo in questione sia diploide.
 - 2) La riproduzione sia sessuale.
 - 3) Le generazioni non si sovrappongano.
 - 4) L'accoppiamento sia casuale.
 - 5) La dimensione della popolazione sia sufficientemente grande.
 - 6) La migrazione sia trascurabile.
 - 7) La mutazione possa essere ignorata.
 - 8) La selezione naturale non abbia influenza sul gene in esame.
-

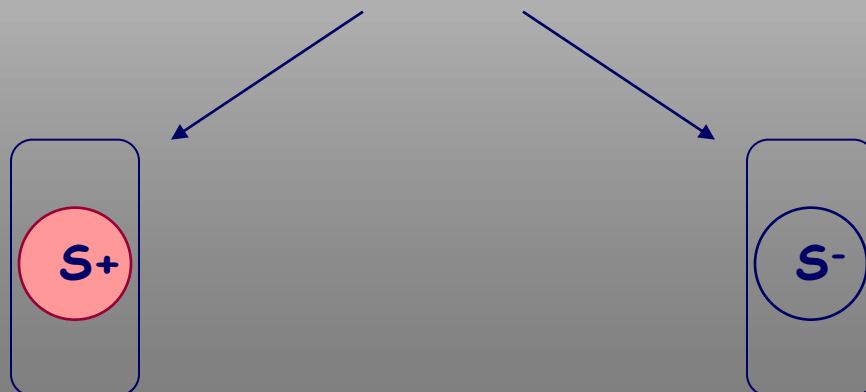
Scheda di richiamo

Coppia di geni in una cellula di un
organismo diploide eterozigote



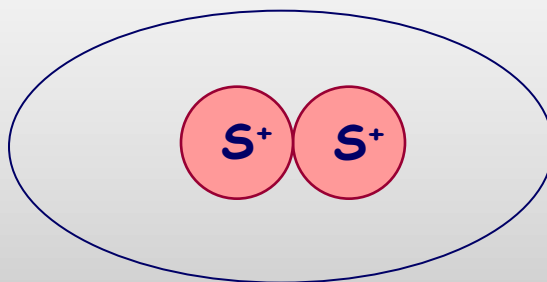
segregazione allelica nei gameti

Gameti



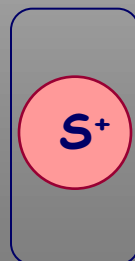
Scheda di richiamo

Se l'organismo diploide è
omozigote



segregazione allelica nei gameti

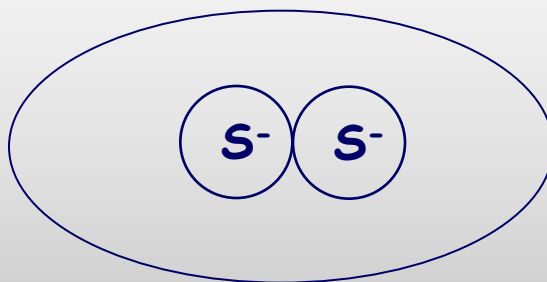
Gameti



Tutti uguali

Scheda di richiamo

Se l'organismo diploide è
omozigote



segregazione allelica nei gameti

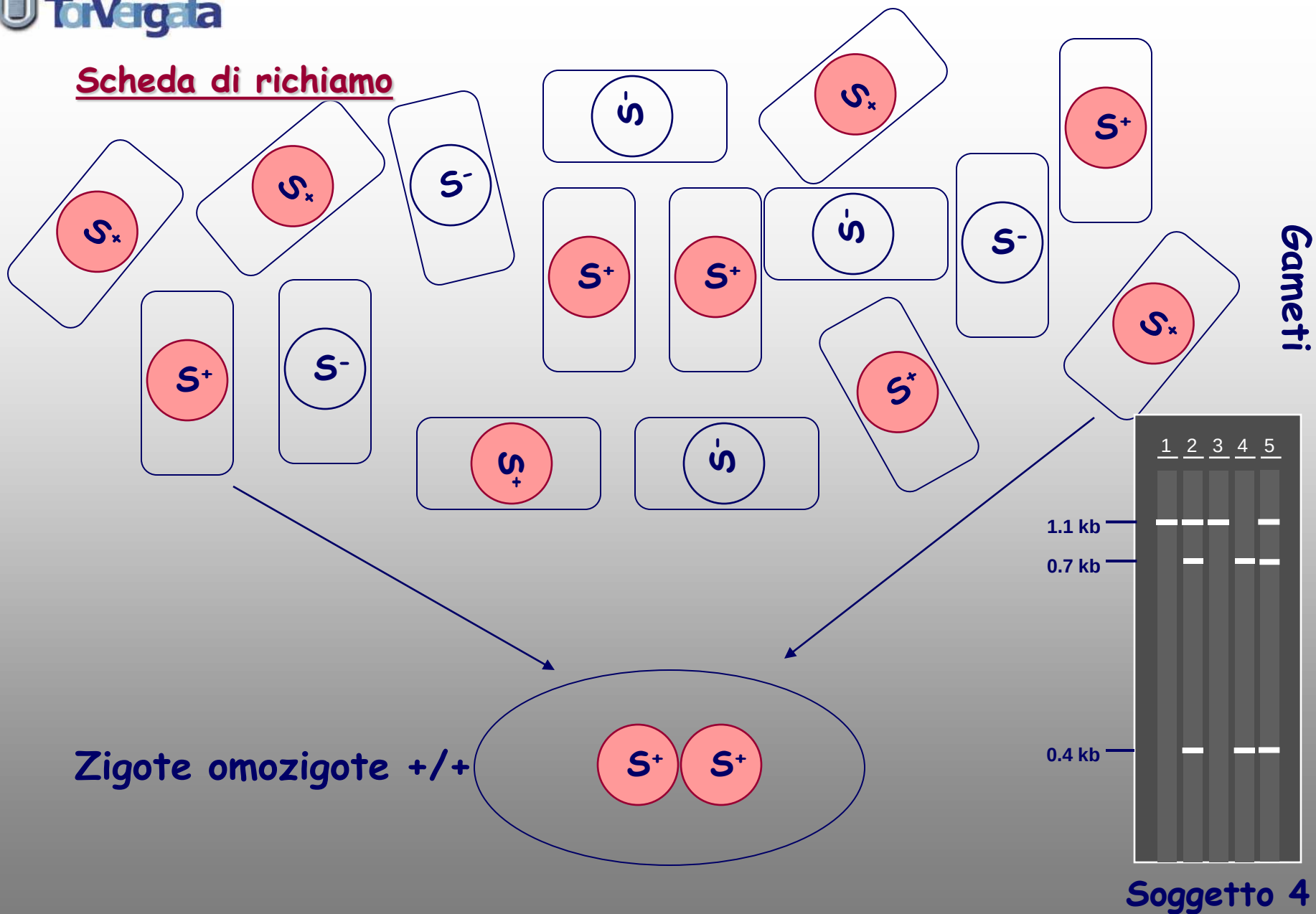
Gameti



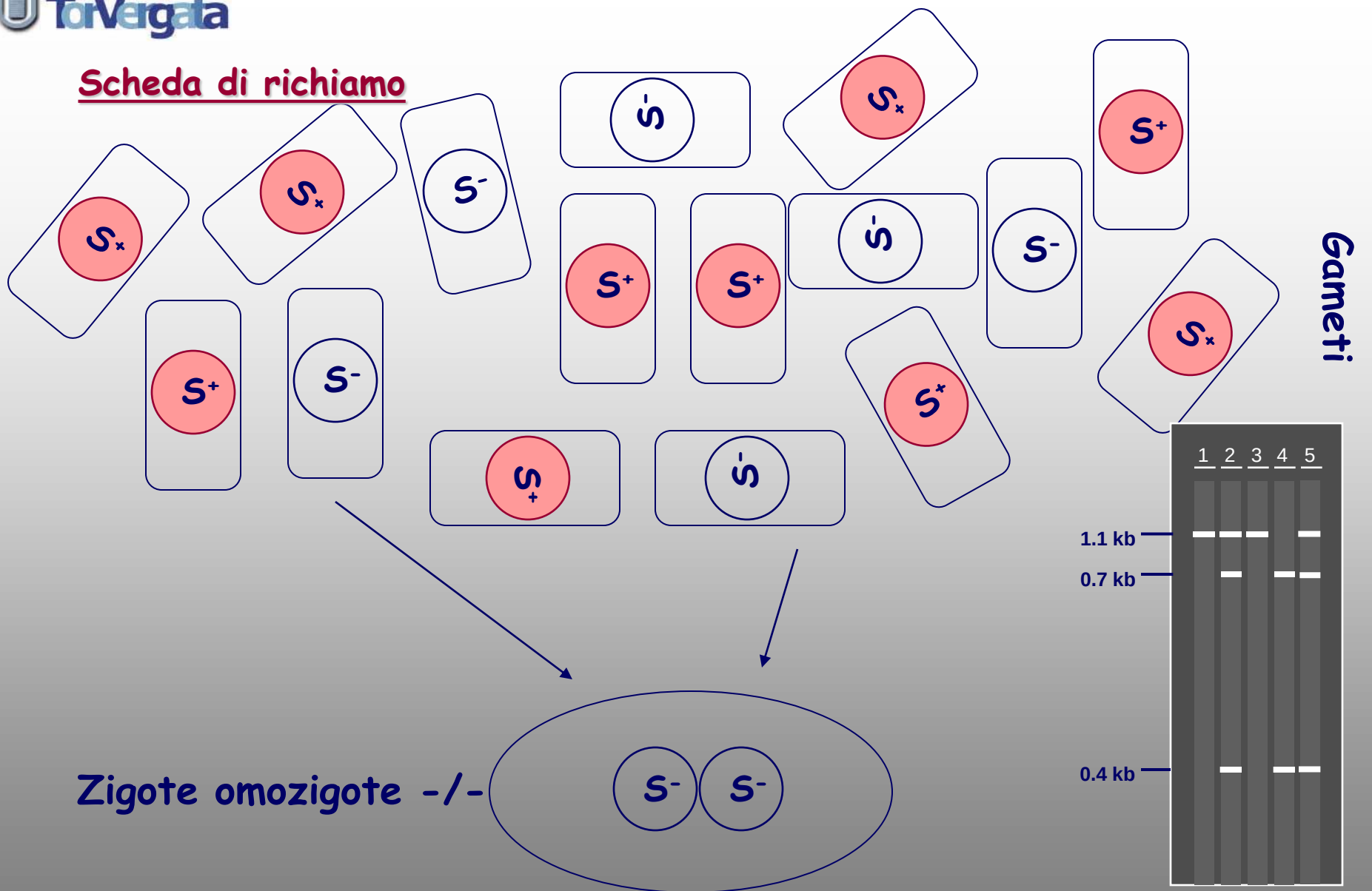
Tutti uguali

Scheda di richiamo

I gameti a loro volta si accoppieranno per dare origine agli individui della generazione successiva.

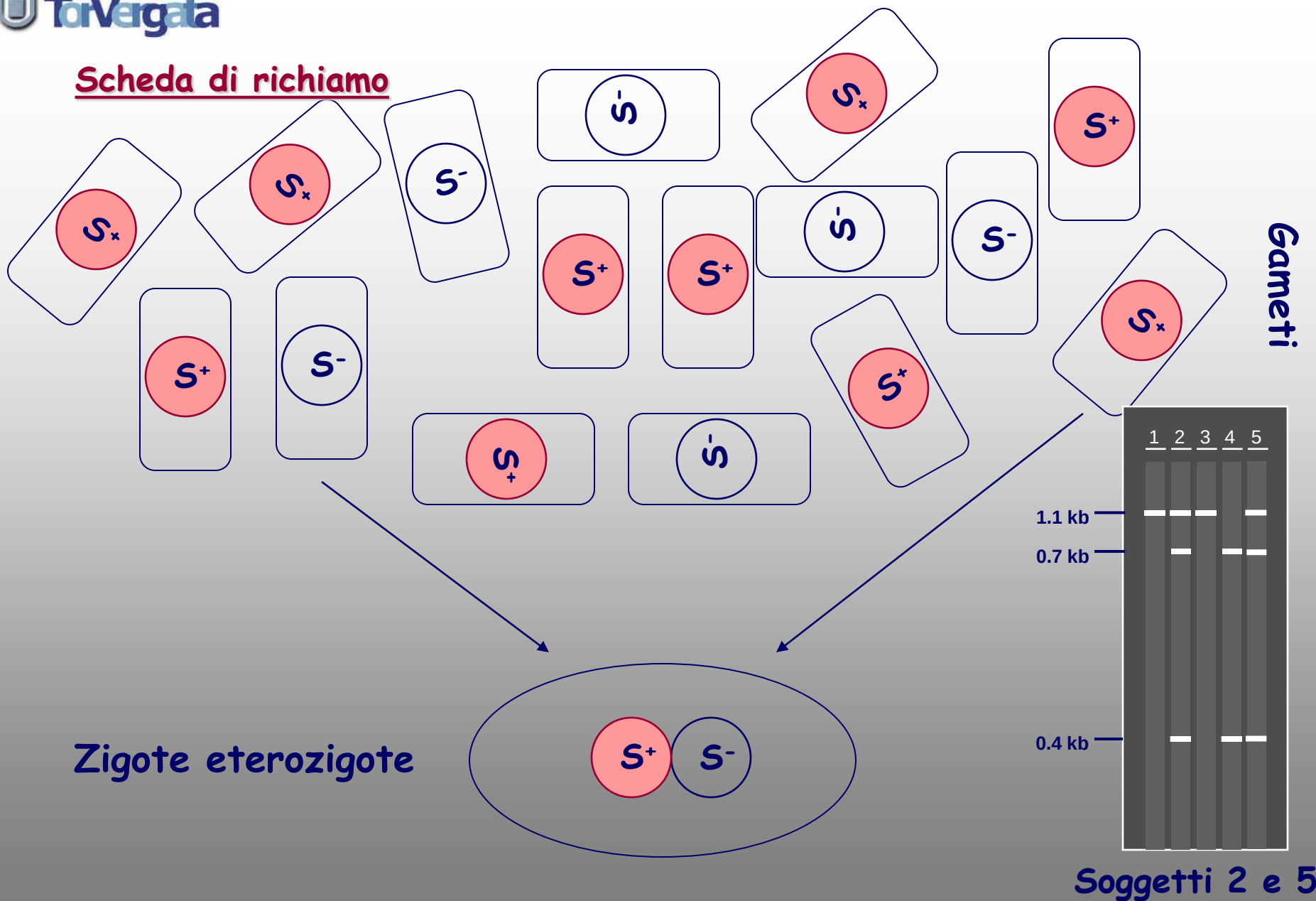
Scheda di richiamo

Scheda di richiamo



Zigote omozigote -/-

Soggetti 1 e 3

Scheda di richiamo

Principio di Hardy-Weinberg per un locus autosomico con due alleli

Poniamo di chiamare p la frequenza di $S+$, o più genericamente dell'allele A_1 del locus biallelico generico A

Poniamo anche di chiamare q la frequenza di $S-$, o più genericamente dell'allele A_2 del locus biallelico generico A

Naturalmente la somma delle frequenze di A_1 e A_2 è 1

$$p + q = 1$$

Quadrato di Punnet

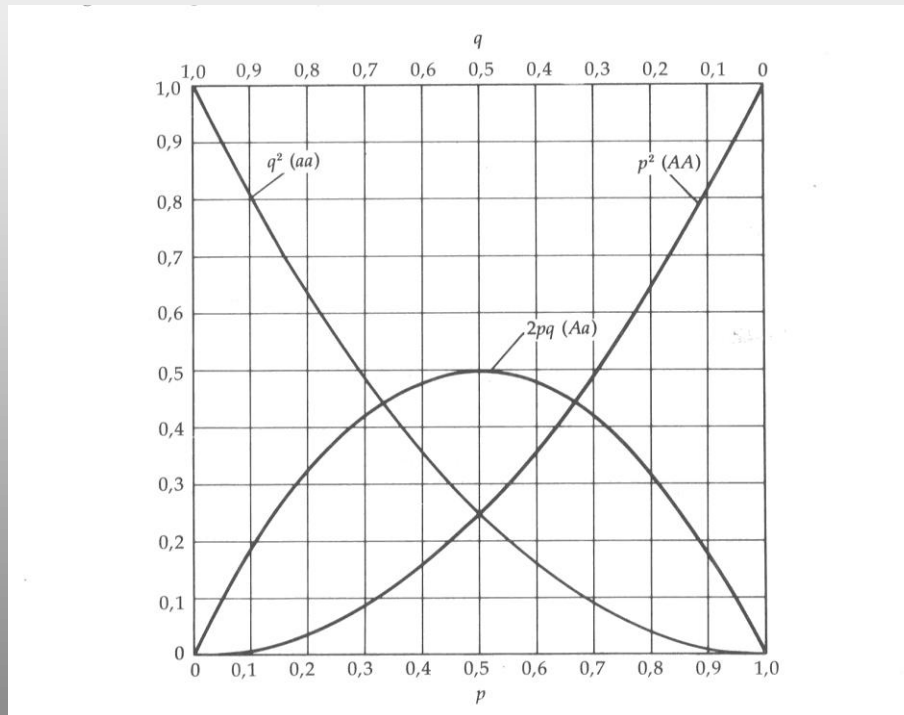
		<u>Spermatozoi</u>	
		A_1 p	A_2 q
<u>Cellule uovo</u>	A_1 p	A_1A_1 p^2	A_1A_2 pq
	A_2 q	A_1A_2 pq	A_2A_2 q^2
		allele frequenza	

Frequenze genotipiche
della prole:

$$\begin{aligned}
 A_1A_1 &= p^2 \\
 A_1A_2 &= 2pq \\
 A_2A_2 &= q^2
 \end{aligned}$$

Principio di Hardy-Weinberg per un locus autosomico con due alleli

$$p^2 + 2pq + q^2 = (p + q)^2 = 1$$



Se le frequenze alleliche sono comprese tra 1/3 e 2/3, gli eterozigoti saranno il genotipo più comune della popolazione

Una popolazione si dice in equilibrio di Hardy-Weinberg per un determinato locus se le sue frequenze genotipiche sono distribuite secondo la legge, o principio, di Hardy-Weinberg

Se le frequenze di una popolazione vengono stimate mediante l'analisi di un campione della popolazione stessa, le frequenze genotipiche osservate possono essere diverse da quelle attese per effetto del caso.

L'accordo tra le frequenze osservate e quelle attese può essere stimato quantitativamente per mezzo del "test del χ^2 ".

Il valore di χ^2 si calcola come segue:

$$\chi^2 = \sum \frac{(\text{frequenza osservata} - \text{frequenza attesa})^2}{(\text{frequenza attesa})}$$

	GENOTIPO			
	+/+	+/-	-/-	totale
Numero di individui	16	28	20	64
Numero di alleli +	32	28	0	60
Numero di alleli -	0	28	40	68
Somma degli alleli + e -	32	56	40	128

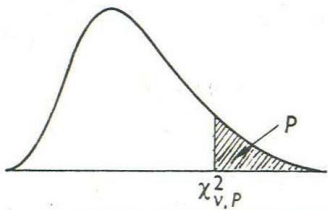
Frequenza allelica di + = $60/128 = 0.469 = p$

Frequenza allelica di - = $68/128 = 0.531 = q$

Frequenza attesa	p^2	$2pq$	q^2	
secondo la legge di H.-W.	0.220	0.498	0.282	1
Frequenza attesa assoluta	14.1	31.9	18.0	64
Valore di $\chi^2 [(A - O)^2/A]$	0.256	0.477	0.222	0.955

Gradi di libertà $\Rightarrow (3 - 1) - (2 - 1) = 1$

$$\chi_1^2 = 0.955$$



La funzione tabulata è $\chi_{\nu, P}^2$, valore superato con probabilità P in una distribuzione χ^2 con ν gradi di libertà.

Gradi di libertà, ν	Probabilità di un valore maggiore, P									
	0,975	0,900	0,750	0,500	0,250	0,100	0,050	0,025	0,010	0,001
1	—	0,02	0,10	0,45	1,32	2,71	3,84	5,02	6,63	10,83
2	0,05	0,21	0,58	1,39	2,77	4,61	5,99	7,38	9,21	13,82
3	0,22	0,58	1,21	2,37	4,11	6,25	7,81	9,35	11,34	16,27
4	0,48	1,06	1,92	3,36	5,39	7,78	9,49	11,14	13,28	18,47
5	0,83	1,61	2,67	4,35	6,63	9,24	11,07	12,83	15,09	20,52
6	1,24	2,20	3,45	5,35	7,84	10,64	12,59	14,45	16,81	22,46
7	1,69	2,83	4,25	6,35	9,04	12,02	14,07	16,01	18,48	24,32
8	2,18	3,49	5,07	7,34	10,22	13,36	15,51	17,53	20,09	26,12
9	2,70	4,17	5,90	8,34	11,39	14,68	16,92	19,02	21,67	27,88
10	3,25	4,87	6,74	9,34	12,55	15,99	18,31	20,48	23,21	29,59
11	3,82	5,58	7,58	10,34	13,70	17,28	19,68	21,92	24,72	31,26
12	4,40	6,30	8,44	11,34	14,85	18,55	21,03	23,34	26,22	32,91
13	5,01	7,04	9,30	12,34	15,98	19,81	22,36	24,74	27,69	34,53
14	5,63	7,79	10,17	13,34	17,12	21,06	23,68	26,12	29,14	36,12
15	6,27	8,55	11,04	14,34	18,25	22,31	25,00	27,49	30,58	37,70

	GENOTIPO			
	+/+	+/-	-/-	totale
Numero di individui	16	28	20	64
Numero di alleli +	32	28	0	60
Numero di alleli -	0	28	40	68
Somma degli alleli + e -	32	56	40	128

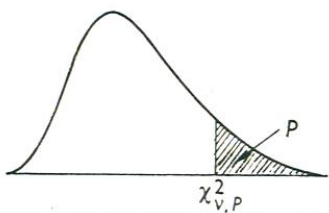
Frequenza allelica di + = $60/128 = 0.469 = p$

Frequenza allelica di - = $68/128 = 0.531 = q$

Frequenza attesa	p^2	$2pq$	q^2	
secondo la legge di H.-W.	0.220	0.498	0.282	1
Frequenza attesa assoluta	14.1	31.9	18.0	64
Valore di $\chi^2 [(A - O)^2/A]$	0.256	0.477	0.222	0.955

Gradi di libertà $\Rightarrow 3 - 1 - 1 = 1$

**La probabilità associata a un χ^2_{1g} di 0.955 è maggiore di 0.25
 (0.25 < P < 0.5)**



La funzione tabulata è $\chi^2_{v,P}$, valore superato con probabilità P in una distribuzione χ^2 con v gradi di libertà.

Gradi di libertà, v	Probabilità di un valore maggiore, P									
	0,975	0,900	0,750	0,500	0,250	0,100	0,050	0,025	0,010	0,001
1	—	0,02	0,10	0,45	1,32	2,71	3,84	5,02	6,63	10,83
2	0,05	0,21	0,58	1,39	2,77	4,61	5,99	7,38	9,21	13,82
3	0,22	0,58	1,21	2,37	4,11	6,25	7,81	9,35	11,34	16,27
4	0,48	1,06	1,92	3,36	5,39	7,78	9,49	11,14	13,28	18,47
5	0,83	1,61	2,67	4,35	6,63	9,24	11,07	12,83	15,09	20,52
6	1,24	2,20	3,45	5,35	7,84	10,64	12,59	14,45	16,81	22,46
7	1,69	2,83	4,25	6,35	9,04	12,02	14,07	16,01	18,48	24,32
8	2,18	3,49	5,07	7,34	10,22	13,36	15,51	17,53	20,09	26,12
9	2,70	4,17	5,90	8,34	11,39	14,68	16,92	19,02	21,67	27,88
10	3,25	4,87	6,74	9,34	12,55	15,99	18,31	20,48	23,21	29,59
11	3,82	5,58	7,58	10,34	13,70	17,28	19,68	21,92	24,72	31,26
12	4,40	6,30	8,44	11,34	14,85	18,55	21,03	23,34	26,22	32,91
13	5,01	7,04	9,30	12,34	15,98	19,81	22,36	24,74	27,69	34,53
14	5,63	7,79	10,17	13,34	17,12	21,06	23,68	26,12	29,14	36,12
15	6,27	8,55	11,04	14,34	18,25	22,31	25,00	27,49	30,58	37,70

$P > 0.05$ ← non significativo

$P < 0.1$ →
significativo

Quadrato di Punnet per un locus autosomico con tre alleli

		Spermatozoi		
allele frequenza		A_1 p_1	A_2 p_2	A_3 p_3
Cellule uovo	A_1 p_1	A_1A_1 p_1^2	A_1A_2 $p_1 p_2$	A_1A_3 $p_1 p_3$
	A_2 p_2	A_1A_2 $p_1 p_2$	A_2A_2 p_2^2	A_2A_3 $p_2 p_3$
	A_3 p_3	A_1A_3 $p_1 p_3$	A_2A_3 $p_2 p_3$	A_3A_3 p_3^2
allele frequenza				

Frequenze genotipiche
della prole:

$$\begin{aligned}
 A_1A_1 &= p_1^2 \\
 A_1A_2 &= 2p_1 p_2 \\
 A_1A_3 &= 2p_1 p_3 \\
 A_2A_2 &= p_2^2 \\
 A_2A_3 &= 2p_2 p_3 \\
 A_3A_3 &= p_3^2
 \end{aligned}$$

Principio di Hardy-Weinberg per un locus autosomico con tre alleli

Dati:

p_1 = frequenza dell'allele A_1 ,

p_2 = frequenza dell'allele A_2 ,

p_3 = frequenza dell'allele A_3

e

$$p_1 + p_2 + p_3 = 1$$

allora le frequenze genotipiche A_1A_1 , A_1A_2 , A_1A_3 , A_2A_2 , A_2A_3 e A_3A_3 saranno rispettivamente p_1^2 , $2p_1p_2$, $2p_1p_3$, p_2^2 , $2p_2p_3$ e p_3^2

e la loro somma

$$p_1^2 + 2p_1p_2 + 2p_1p_3 + p_2^2 + 2p_2p_3 + p_3^2 = (p_1 + p_2 + p_3)^2 = 1$$

In generale.

Secondo il principio di Hardy-Weinberg la distribuzione delle frequenze genotipiche, per un locus autosomico con n alleli $A_1, A_2, A_3, \dots A_n$, con frequenze $p_1, p_2, p_3, \dots p_n$, sarà:

$$(p_1 + p_2 + p_3 + \dots + p_n)^2 = 1$$

GENOTIPO

	A/A	B/A	C/A	B/B	C/B	C/C	totale
Numero di individui	25	36	15	10	10	1	97
Numero di alleli A	50	36	15	0	0	0	101
Numero di alleli B	0	36	0	20	10	0	66
Numero di alleli C	0	0	15	0	10	2	27
Somma degli alleli A, B e C	50	72	30	20	20	2	194

Frequenza allelica di A $\Rightarrow p_A = 101/194 = 0.52$

Frequenza allelica di B $\Rightarrow p_B = 66/194 = 0.34$

Frequenza allelica di C $\Rightarrow p_C = 27/194 = 0.14$

Errore standard delle frequenze

$$e.s. = \sqrt{\frac{p(1-p)}{2N}}$$

$$\text{e.s. della frequenza di } A \rightarrow \sqrt{\frac{0.52(1-0.52)}{2 \times 97}} = \sqrt{\frac{0.25}{194}} = 0.036$$

$$\text{e.s. della frequenza di } B \rightarrow \sqrt{\frac{0.34(1-0.34)}{2 \times 97}} = \sqrt{\frac{0.22}{194}} = 0.034$$

$$\text{e.s. della frequenza di } C \rightarrow \sqrt{\frac{0.14(1-0.12)}{2 \times 97}} = \sqrt{\frac{0.12}{194}} = 0.025$$

	GENOTIPO						totale
	A/A	B/A	C/A	B/B	C/B	C/C	
Numero di individui	25	36	15	10	10	1	97
Numero di alleli A	50	36	15	0	0	0	101
Numero di alleli B	0	36	0	20	10	0	66
Numero di alleli C	0	0	15	0	10	2	27
Somma degli alleli A, B e C	50	72	30	20	20	2	194

Frequenza allelica di A $\Rightarrow p_A = 101/194 = 0.52 \pm 0.036$

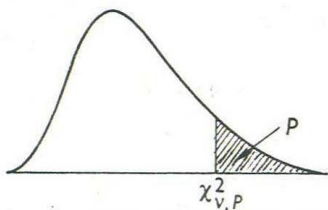
Frequenza allelica di B $\Rightarrow p_B = 66/194 = 0.34 \pm 0.034$

Frequenza allelica di C $\Rightarrow p_C = 27/194 = 0.14 \pm 0.025$

Frequenza attesa	p_A^2	$2p_Ap_B$	$2p_Ap_C$	p_B^2	$2p_Bp_C$	p_C^2	
	.270	.354	.146	.116	.095	.020	1.001
Frequenza attesa assoluta	26.23	34.30	14.12	11.21	9.23	1.90	96.99
Valore di $\chi^2 [(A - O)^2/A]$	0.06	0.08	0.06	0.13	0.06	0.43	0.82

Gradi di libertà $\Rightarrow (6 - 1) - (3 - 1) = 3$

$$\chi^2_{3gl} = 0.82$$



La funzione tabulata è $\chi^2_{v,P}$, valore superato con probabilità P in una distribuzione χ^2 con v gradi di libertà.

Gradi di libertà, v	Probabilità di un valore maggiore, P									
	0,975	0,900	0,750	0,500	0,250	0,100	0,050	0,025	0,010	0,001
1	—	0,02	0,10	0,45	1,32	2,71	3,84	5,02	6,63	10,83
2	0,05	0,21	0,58	1,39	2,77	4,61	5,99	7,38	9,21	13,82
3	0,22	0,58	1,21	2,37	4,11	6,25	7,81	9,35	11,34	16,27
4	0,48	1,06	1,92	3,36	5,39	7,78	9,49	11,14	13,28	18,47
5	0,83	1,61	2,67	4,35	6,63	9,24	11,07	12,83	15,09	20,52
6	1,24	2,20	3,45	5,35	7,84	10,64	12,59	14,45	16,81	22,46
7	1,69	2,83	4,25	6,35	9,04	12,02	14,07	16,01	18,48	24,32
8	2,18	3,49	5,07	7,34	10,22	13,36	15,51	17,53	20,09	26,12
9	2,70	4,17	5,90	8,34	11,39	14,68	16,92	19,02	21,67	27,88
10	3,25	4,87	6,74	9,34	12,55	15,99	18,31	20,48	23,21	29,59
11	3,82	5,58	7,58	10,34	13,70	17,28	19,68	21,92	24,72	31,26
12	4,40	6,30	8,44	11,34	14,85	18,55	21,03	23,34	26,22	32,91
13	5,01	7,04	9,30	12,34	15,98	19,81	22,36	24,74	27,69	34,53
14	5,63	7,79	10,17	13,34	17,12	21,06	23,68	26,12	29,14	36,12
15	6,27	8,55	11,04	14,34	18,25	22,31	25,00	27,49	30,58	37,70

	GENOTIPO						totale
	A/A	B/A	C/A	B/B	C/B	C/C	
Numero di individui	25	36	15	10	10	1	97
Numero di alleli A	50	36	15	0	0	0	101
Numero di alleli B	0	36	0	20	10	0	66
Numero di alleli C	0	0	15	0	10	2	27
Somma degli alleli A, B e C	50	72	30	20	20	2	194

Frequenza allelica di A $\Rightarrow p_A = 101/194 = 0.52 \pm 0.036$

Frequenza allelica di B $\Rightarrow p_B = 66/194 = 0.34 \pm 0.034$

Frequenza allelica di C $\Rightarrow p_C = 27/194 = 0.14 \pm 0.025$

Frequenza attesa	p_A^2	$2p_Ap_B$	$2p_Ap_C$	p_B^2	$2p_Bp_C$	p_C^2	
	.270	.354	.146	.116	.095	.020	1.001
Frequenza attesa assoluta	26.23	34.30	14.12	11.21	9.23	1.90	96.99
Valore di $\chi^2 [(A - O)^2/A]$	0.06	0.08	0.06	0.13	0.06	0.43	0.82

Gradi di libertà $\Rightarrow (6 - 1) - (3 - 1) = 3$

La probabilità associata a un χ^2_{3gl} di 0.82 è maggiore di 0.75 ($0.75 < P < 0.9$)

Esercitazione su: Principio di Hardy-Weinberg

Un campione di una popolazione umana di 245 soggetti è stato analizzato per il locus PGM (Phosphoglucomutasi). In questa specie per questo locus sono presenti tre alleli codominanti, PGM*1, PGM*2 e PGM*3. La distribuzione fenotipica trovata è la seguente:

Fenotipo	No. individui osservati
PGM 1-1	41
PGM 2-1	59
PGM 3-1	58
PGM 2-2	29
PGM 3-2	30
PGM 3-3	28
Totale	245

Questa popolazione è in equilibrio di Hardy Weinberg?

	GENOTIPO						
	1/1	2/1	3/1	2/2	3/2	3/3	totale
Numero di individui	41	59	58	29	30	28	245
Numero di alleli 1	82	59	58	0	0	0	199
Numero di alleli 2	0	59	0	58	30	0	147
Numero di alleli 3	0	0	58	0	30	56	144
Somma degli alleli 1, 2 e 3	82	118	116	58	60	56	490

Frequenza allelica di 1 $\Rightarrow p_1 = 199/490 = 0.406 \pm 0.022$

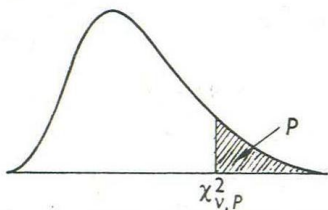
Frequenza allelica di 2 $\Rightarrow p_2 = 147/490 = 0.300 \pm 0.021$

Frequenza allelica di 3 $\Rightarrow p_3 = 144/490 = 0.294 \pm 0.021$

Frequenza attesa	p_1^2	$2p_1p_2$	$2p_1p_3$	p_2^2	$2p_2p_3$	p_3^2	
	.165	.244	.239	.090	.176	.086	
Frequenza attesa assoluta	40.43	59.78	58.56	22.05	43.12	21.07	244.98
Valore di $\chi^2 [(A - O)^2/A]$	.008	.010	.005	2.191	3.992	2.279	8.485

Gradi di libertà $\Rightarrow (6 - 1) - (3 - 1) = 3$

$$\chi^2_{3gl} = 8.485$$



La funzione tabulata è $\chi^2_{v,P}$, valore superato con probabilità P in una distribuzione χ^2 con v gradi di libertà.

Gradi di libertà, v	Probabilità di un valore maggiore, P									
	0,975	0,900	0,750	0,500	0,250	0,100	0,050	0,025	0,010	0,001
1	—	0,02	0,10	0,45	1,32	2,71	3,84	5,02	6,63	10,83
2	0,05	0,21	0,58	1,39	2,77	4,61	5,99	7,38	9,21	13,82
→ 3	0,22	0,58	1,21	2,37	4,11	6,25	7,81	9,35	11,34	16,27
4	0,48	1,06	1,92	3,36	5,39	7,78	9,49	11,14	13,28	18,47
5	0,83	1,61	2,67	4,35	6,63	9,24	11,07	12,83	15,09	20,52
6	1,24	2,20	3,45	5,35	7,84	10,64	12,59	14,45	16,81	22,46
7	1,69	2,83	4,25	6,35	9,04	12,02	14,07	16,01	18,48	24,32
8	2,18	3,49	5,07	7,34	10,22	13,36	15,51	17,53	20,09	26,12
9	2,70	4,17	5,90	8,34	11,39	14,68	16,92	19,02	21,67	27,88
10	3,25	4,87	6,74	9,34	12,55	15,99	18,31	20,48	23,21	29,59
11	3,82	5,58	7,58	10,34	13,70	17,28	19,68	21,92	24,72	31,26
12	4,40	6,30	8,44	11,34	14,85	18,55	21,03	23,34	26,22	32,91
13	5,01	7,04	9,30	12,34	15,98	19,81	22,36	24,74	27,69	34,53
14	5,63	7,79	10,17	13,34	17,12	21,06	23,68	26,12	29,14	36,12
15	6,27	8,55	11,04	14,34	18,25	22,31	25,00	27,49	30,58	37,70

	GENOTIPO						totale
	1/1	2/1	3/1	2/2	3/2	3/3	
Numero di individui	41	59	58	29	30	28	245
Numero di alleli A	82	59	58	0	0	0	199
Numero di alleli B	0	59	0	58	30	0	147
Numero di alleli C	0	0	58	0	30	56	144
Somma degli alleli A, B e C	82	118	116	58	60	56	490

Frequenza allelica di A $\Rightarrow p_A = 199/490 = 0.406$

Frequenza allelica di B $\Rightarrow p_B = 147/490 = 0.300$

Frequenza allelica di C $\Rightarrow p_C = 144/490 = 0.294$

Frequenza attesa	p_1^2	$2p_1p_2$	$2p_1p_3$	p_2^2	$2p_2p_3$	p_3^2	
	.165	.244	.239	.090	.176	.086	
Frequenza attesa assoluta	40.43	59.78	58.56	22.05	43.12	21.07	244.98
Valore di $\chi^2 [(A - O)^2/A]$	.008	.010	.005	2.191	3.992	2.279	8.485

Gradi di libertà $\Rightarrow (6 - 1) - (3 - 1) = 3$

La probabilità associata a un $\chi^2_{3/df} = 8.485$ è maggiore di 0.025 (**$0.025 < P < 0.05$**)

Stima delle frequenze alleliche in presenza di dominanza

Le frequenze fenotipiche di un sistema biallelico in cui l'allele A (frequenza p) è dominante su a (frequenza q) sono

	Genotipo	Frequenza
Fenotipo A	$AA + Aa$	$p^2 + 2pq$
Fenotipo a	aa	q^2

Ammettendo a priori che questo locus sia in equilibrio di Hardy-Weinberg, le frequenze alleliche possono essere inferite dalle frequenze fenotipiche,

$$q = \sqrt{\text{fr. } aa} = \sqrt{q^2}$$

e

$$p = 1 - q$$

ESEMPIO

Nella popolazione caucasica la fibrosi cistica ha una frequenza di circa un caso ogni 2000 nascite.

Quesito: qual è la frequenza dei portatori sani?

$$\text{frequenza omozigoti} \rightarrow \frac{1}{2000} = 0,0005$$

quindi in condizioni di equilibrio di Hardy-Weinberg

$$q^2 = 0.0005$$

da cui

$$q = \sqrt{0.0005} = 0.022$$

e, poiché $p = (1 - q)$, la frequenza dell'allele normale sarà

$$p = 1 - 0.022 = 0.978$$

La frequenza dei portatori di fibrosi cistica ($2pq$) è quindi

$$2 \times 0.022 \times 0.978 = 0.043$$

Poiché in questo caso sono individuabili solo due classi fenotipiche, l'errore standard della stima delle frequenze è

$$e.s. = \sqrt{\frac{1 - q^2}{4N}}$$

A parità di dimensione del campione e di frequenza allelica, l'errore è maggiore in presenza di dominanza che in assenza.

Prendiamo ad esempio un campione di 100 individui e analizziamo i loci **A** (alleli **A₁** e **A₂**, codominanti) e **B** (alleli **B** e **b**, con **B** dominante su **b**)

Frequenza (contata) di **A₁** = 0.62

Frequenza (contata) di **A₂** = 0.38 ± 0.034

$$e.s. = \sqrt{\frac{p(1-p)}{2N}} = \sqrt{\frac{0.62 \times 0.38}{2 \times 100}} = 0.034$$

Frequenza (stimata) di **b** = 0.38 ± 0.046

$$e.s. = \sqrt{\frac{1-q^2}{4N}} = \sqrt{\frac{1-0.38^2}{4 \times 100}} = 0.046$$

Principio di Hardy-Weinberg per geni legati al cromosoma X

		Spermatozoi con X		Spermatozoi con Y
		XA_1 p	XA_2 q	Y
Cellule uovo	XA_1 p	XA_1XA_1 p^2	XA_1XA_2 pq	XA_1Y p
	XA_2 q	XA_1XA_2 pq	XA_2XA_2 q^2	XA_2Y q
allele frequenza				
allele freq.				

Frequenze
genotipiche
della prole(*):

Femmine:

$$\begin{aligned} A_1 A_1 &= p^2 \\ A_1 A_2 &= 2pq \\ A_2 A_1 &= 2pq \\ A_2 A_2 &= q^2 \end{aligned}$$

Maschi:

$$A_1 = p$$

$$A_2 = q$$

(*) Valida solo se le frequenze geniche sono uguali nei maschi e nelle femmine, cioè all'equilibrio