

**TRABAJO DE TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE DOCTOR
EN CIENCIAS NATURALES**

ESTUDIO DE ADN ANTIGUO EN MUESTRAS PRECOLOMBINAS DE ARGENTINA

**MARÍA BÁRBARA POSTILLONE
ALUMNA DE POSGRADO**

**DR. SERGIO A. AVENA
DIRECTOR**

**DRA. VALERIA BERNAL
CO-DIRECTORA**



**Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Naturales y Museo**

Julio 2015

A mi familia...

AGRADECIMIENTOS

Mi mayor agradecimiento a mis directores Sergio y Cristina por abrirme las puertas de su equipo allá por 2009, y permitirme desarrollar profesionalmente bajo su constante guía preocupándose por mi futuro en la investigación. Gracias además por despertar la curiosidad por los estudios de ADN antiguo, los cuales son mi línea de investigación de preferencia.

Un Agradecimiento especial a Valeria Bernal mi co-directora, por sus consejos y su apoyo para que este trabajo fuera posible, otorgándome la posibilidad de analizar piezas dentales de individuos prehispánicos de Los Alerces y rada Tilly. Así como también el agradecimiento por permitirme seguir investigando en el campo del ADN antiguo con su apoyo para investigaciones futuras.

A la Facultad de Ciencias Naturales y Museo de la Universidad Nacional de La Plata, institución pública de excelencia, que me permitió formarme y obtener el mayor grado académico al que puede aspirar un investigador.

Al Dr. Alfredo Vitullo por permitirme realizar mis investigaciones en el laboratorio del CEBBAD de la Universidad Maimónides el cual está bajo su dirección. Además agradecer a la Fundación Científica Felipe Fiorellino por apoyar estas investigaciones económicamente.

También quiero agradecer a la Dra. Anette Aguerre por cederme para esta investigación las muestras del sitio Puesto El Rodeo y del Alero Mazquierán.

A los Drs. Cocilovo y Varela y la Dra. Laura Fuchs por otorgarme las piezas dentales de la colección Doncellas del Museo Etnográfico (FFyL, UBA) y a la Curadora Claudia Aranda por permitirnos extraer más piezas para ampliar el número de individuos analizados.

Un agradecimiento también a los Drs. Gustavo Martínez y Gustavo Flensburg por aportarme las muestras del sitio arqueológico Paso Alsina 1.

A Vero Seldes por toda la ayuda brindada desinteresada para mejorar mis conocimientos sobre la región del NOA.

El más sentido agradecimiento a mis compañeros de equipo: Gaby, Pacha, Fran y Cristian por estar día a día apoyándonos para llevar adelante los trabajos de cada uno de nosotros y por tirar para el mismo lado como equipo. Gracias chicos por los días enteros

de convivencia... ¡Gracias por el aguante diario, los mates, las risas, los consejos y tantas anécdotas! Sólo ustedes saben las dificultades que presenta y los altibajos que uno puede ir transitando a medida que se realizan este tipo de investigaciones.

Quiero agradecerle especialmente a Alejandra por estar siempre para ayudarme y resolver todos los problemas habidos y por haber en cuanto temas institucionales, laborales y personales también

Gracias a mi familia que me aguantaron en todos mis años de formación, apoyándome y alentándome constantemente para superarme día a día. En especial quiero agradecer a mis papas Silvia y José, por confiar siempre en mí, por guiarme, aconsejarme, enseñarme y sobre todo a ser libre en mis elecciones, nunca dejándome sola apoyándome y acompañándome firmemente en cada decisión y paso que doy. A mis hermanos por enseñarme a dar siempre lo mejor siendo mis fieles compañeros en todo este tiempo. A todos los amo 😊.

Un agradecimiento especial a mis amigos que me bancan siempre en todo, confían en mí y me alientan siempre. Gracias por estar presente en las buenas y en las malas, porque se bancan no verme seguido y por compartir con felicidad y alegría todos los logros.

Por último mi agradecimiento más especial a la mejor persona que me eligió y a quién elegí para compartir nuestras vidas juntos, que se bancó y banca todo desde mis inicios en mi carrera como bióloga. Gracias Die por mantenerme siempre en pie no bajando los brazos y afrontando juntos todas las adversidades. Gracias por aguantar mis locuras diarias siendo mi cable a tierra. Gracias por confiar en mí y por alentarme siempre a seguir, por ayudarme y estar siempre a la par, para darme una mano en lo que sea. Gracias por brindarme tu amor y tu protección. Gracias por toda la ayuda que siempre me das y en este caso por toda la ayuda que me brindaste para que esta tesis de doctorado sea más presentable. Te amo 😊.

ÍNDICE

RESUMEN	9
ABSTRACT	13
Capítulo1: La Ocupación Humana del Nuevo Mundo: evidencias arqueológicas y bioantropológicas	17
1.1 Teorías del Poblamiento de América	18
1.1.1 ¿Cuándo llegaron los primeros americanos?	18
1.1.2 ¿Un origen europeo para los nativos americanos?	24
1.1.3 ¿Cuántas migraciones?.....	25
1.2 Poblamiento de América del Sur.....	33
1.2.1 Abordaje desde la evidencia Arqueológica	33
1.2.2 Abordaje del poblamiento de Sudamérica desde la evidencia molecular	44
Capítulo 2: Estudio de las poblaciones Prehispánicas de Argentina desde la Arqueogenética: Marcadores moleculares y ADN.....	48
2.1 Marcadores moleculares utilizados en genética de poblaciones	49
2.1.1 Tipos de marcadores más comúnmente utilizados en genética de poblaciones.....	51
2.1.2 Marcadores biparentales y uniparentales	52
2.1.3 Aplicación de los marcadores moleculares en estudios de genética de poblaciones	53
2.2 El ADN Mitocondrial. Marcador uniparental preferencial en genética de poblaciones antiguas	54
2.2.1 Teorías sobre el origen de las mitocondrias	55
2.2.2 Estructura genómica del ADNmt.....	56
2.2.3 Características del ADNmt.....	58
2.2.4 Técnicas para el estudio del ADNmt	62
2.3 Haplogrupos mitocondriales de América.....	63
2.3.1 Historia de los haplogrupos de América	66

2.3.2	Linajes fundadores	67
2.3.3	Momentos de entrada de los linajes fundadores al nuevo mundo	71
2.3.4	Breve revisión de linajes maternos en poblaciones actuales de Sudamérica.....	72
2.3.5	DNmt en muestras antiguas e históricas de Sudamérica.....	75
2.4	ADN antiguo	77
2.4.1	Ventajas del ADN.....	79
2.4.2	Limitaciones y precauciones en el uso de ADN.....	80
Capítulo 3: Objetivos e Hipótesis		83
3.1	Objetivos	84
	El general es aquel al cual se intenta aportar nuevos datos con esta investigación:	84
	Los objetivos específicos de esta investigación son:.....	84
3.2	Hipótesis.....	85
Capítulo 4: Descripción de las muestras analizadas y consideraciones éticas en el estudio con restos humanos.....		86
4.1	Consideraciones éticas y legales en el trabajo con restos óseos humanos	87
4.2	Procedencia de las muestras analizadas	88
4.2.1	Muestras de Puna Jujeña	90
4.2.2	Muestras de transición Pampa - Patagonía	92
4.2.3	Muestras de Patagonia.....	95
4.3	Permisos y consideraciones sobre las muestras analizadas	103
4.3.1	Muestras de Puna Jujeña	103
4.3.2	Muestras transición Pampa y Patagonia.....	103
4.3.3	Muestras de la Patagonia.....	103
4.4	Selección de las muestras	104
Capitulo 5: Metodología empleada en el estudio de ADN a de las muestras prehispanicas.....		106
5.1	Medidas de prevención de contaminación en el laboratorio de ADN.....	107
5.2	Criterios de control y autenticación de los procedimientos y resultados de ADN.....	108

5.3	Metodología empleada para la obtención y análisis de ADN	109
5.3.1	Preparación de la muestra.	110
5.3.2	Extracción de ADN	112
5.3.3	Tipificación de Haplogrupos del ADNmt mediante RFLP	113
5.3.4	Secuenciación de la HVR I de la región control del ADNmt	117
5.3.5	Preparación de la muestra para secuenciación de HVR I	119
5.3.6	Análisis de las secuencias obtenidas	120
5.3.7	Prueba de inhibición en las muestras no amplificadas	120
5.4	Análisis estadísticos empleados	121
5.4.1	Análisis de la variabilidad intrapoblacional	121
5.4.2	Análisis de la variabilidad interpoblacional	122
5.4.3	Asociación entre la distancia genética y la geográfica de cada muestra analizada para el linaje D1	125
5.4.4	Construcción de redes de asociación entre haplotipos	125
5.5	Estimación del sexo mediante un marcador molecular	126
5.6	Devolución del material arqueológico	127
Capítulo 6: Resultados de los linajes maternos y análisis estadísticos		128
6.1	Comparación del rendimiento de los métodos de extracción empleados	129
6.2	Análisis de RFLP en las muestras analizadas	130
6.3	Resultados del análisis de la HVR I mitocondrial por grupos de muestras	132
6.3.1	Muestras de la Puna Jujeña	132
6.3.2	Muestras de la región de transición Pampa–Patagonia	134
6.3.3	Muestras de la Cordillera Patagónica	136
6.3.4	Muestras de La Costa Atlántica de Patagonia	137
6.3.5	Muestras de la meseta patagónica	138
6.4	Análisis de la variabilidad interpoblacional por región	139
6.4.1	Región de la Puna Jujeña	139

6.4.2	Región de la Patagonia	146
6.5	Análisis de la variabilidad interpoblacional a nivel del actual territorio Argentino	149
6.6	Asociación entre la distancia genética y la geográfica del linaje D1	157
6.7	Redes de asociación de Haplotipos	159
6.8	Análisis de la determinación del sexo por amplificación del gen de la amelogenina	165
Capítulo 7: Discusión		167
7.1	Evaluación de los procedimientos llevados a cabo para la obtención del ADN.....	168
7.1.1	Rendimiento del tipo de material óseo utilizado y condiciones de preservación ..	168
7.1.2	Evaluación de los métodos de extracción de ADN utilizados	169
7.1.3	Planteo de las dificultades observadas durante la amplificación del material genético obtenido	170
7.1.4	Estimaciones sobre los porcentajes de recuperación de ADN obtenidos.....	172
7.2	Interpretación de los linajes maternos obtenidos por secuenciación	175
7.2.1	Análisis de los resultados obtenidos para cada muestra en comparación con otras poblaciones de la región	178
7.3	Análisis de los resultados obtenidos para la comparación entre las Muestras prehispánicas de todo el actual territorio Argentino.....	184
Capítulo 8: Conclusiones		192
Capítulo 9: Bibliografía		195
Anexo: Material suplementario.		225

RESUMEN

Se considera ADN antiguo (ADNa) al recuperado de restos biológicos preservados natural o artificialmente (*Fraille, 2006*). El gran avance de las técnicas de biología molecular, ha permitido estudiar moléculas de ADNa a partir de muestras arqueológicas, fundamentalmente restos óseos y piezas dentales. Un considerable paso hacia adelante en los estudios de ADNa se realizó en 1987, gracias a la invención de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Este es un método de clonación in vitro que emplea a la Taq polimerasa y permite amplificar más de un millón de veces segmentos de ADN. Esta técnica resulta muy apropiada para recuperar y amplificar el muy escaso número de moléculas de ADNa que se encuentren intactas (*Martínez-Labarga et al., 1999*).

Los sistemas más comúnmente utilizados en estudios de variabilidad genética poblacional han sido los de herencia uniparental, el ADN mitocondrial (ADNmt) y la porción no recombinante del cromosoma Y (NRY), transmitidos exclusivamente por vía materna y paterna respectivamente (*Schurr y Sherry, 2004*). Existen miles de copias de ADNmt debido al número de mitocondrias que se encuentra por célula, lo que permite una buena recuperación de fragmentos intactos del mismo para estudios forenses o de genética de poblaciones antiguas. Por el contrario, el estudio de NRY resulta más dificultoso dado que existe una copia por célula y sólo en varones (*Kaestle et al., 2001*).

Las primeras extracciones de ADNa fueron realizadas en animales extinguidos, por *Higuchi et al. (1984)*, quienes identificaron ácidos nucleicos en un quagga y demostraron su afinidad filogenética con la cebra moderna. Un año después *Pääbo (1985)* obtuvo la secuenciación de ADN por clonación de una momia egipcia de 2400 años. Cuando a finales de la década de 1980 se extrajo por primera vez ADN humano procedente de tejido óseo (*Hagelberg et al., 1989*), se inició un nuevo campo de estudio acerca de la variabilidad biológica de las poblaciones humanas antiguas. Hasta ese entonces los trabajos se circunscribían a caracterizaciones morfológicas o al análisis de los rasgos moleculares de poblaciones actuales. El análisis del ADNa comenzó a suministrar de manera

directa información acerca de la diversidad genética humana en el pasado, aportando, además de nuevos métodos para la determinación sexual y la identificación individual, datos acerca del parentesco entre los individuos, la distancia génica entre poblaciones, la procedencia de pueblos migrantes y su contribución al acervo genético local, además de la detección de ADN de agentes patógenos (Casas, 2005). Una revisión acerca de las aplicaciones del ADN en investigaciones arqueológicas y bioantropológicas, considerando sus alcances y limitaciones junto a las implicancias legales y éticas ha sido realizada por Crespo *et al.* (2010).

Los estudios en americanos modernos han mostrado que la gran mayoría de su ADNmt pertenece a los 5 haplogrupos (Hgs) amerindios A, B, C, D y X. Los Hgs son unidades monofiléticas mayores generadas por divergencia molecular, los cuales pueden subdividirse a su vez en Haplotipos. Hasta el momento X sólo se ha detectado en Norteamérica. Más recientemente se propuso que el número de linajes fundadores para el continente americano paso de 5 a ser al menos 13: A2, B2, C1b, C1d, C1c, C4c, D1, D2a, D3, D4h3a, D4e1c, X2a y X2g (Bandelt *et al.* 2003; Tamm *et al.*, 2007; Achilli *et al.*, 2008; Perego *et al.*, 2009, 2010; Malhi *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2011; Bodner *et al.*, 2012). Estudios de ADN para Sudamérica han demostrado que esos mismos linajes se encontraban en poblaciones de diferentes temporalidades apoyando a esos estudios (Fehren-Schmitz *et al.*, 2010; 2014, Carnese *et al.*, 2010; Baca *et al.*, 2014, Mendisco *et al.*, 2014)

Desde una perspectiva arqueológica se han postulado un gran número de teorías de poblamiento del nuevo mundo por el humano moderno, pero aún no se ha llegado a un consenso en el número de pobladores, el momento de entrada y la ruta utilizada. Desde la Antropología Biológica se ha tratado de plantear hipótesis que aporten al entendimiento del intrincado proceso de poblamiento de América, sin embargo no se ha llegado a ningún consenso hasta el momento. Los estudios de ADN son una herramienta relativamente nueva que trata de abordar estas problemáticas, sin embargo el número de muestras esqueléticas analizadas aún es escaso como para lograr plantear los procesos de diversificación, asentamiento

y relaciones interétnicas sucedidas. Por esta razón todos los análisis de ADNa, sobre todo para Sudamérica poseen un gran valor ya que en conjunto con la información arqueológica y bioantropológica presente pueden echar luz a la entramada red de procesos sucedidos en el paso durante el poblamiento del territorio.

En este contexto el Objetivo principal de esta tesis de doctorado es “contribuir a una mejor comprensión de la dinámica de los procesos microevolutivos que tuvieron lugar durante el poblamiento autóctono del actual territorio argentino, tomando en cuenta los ejes espacial y temporal empleando marcadores genéticos de la ancestría materna en muestras arqueológicas”. Para ello se analizaron los linajes mitocondriales maternos de 6 muestras de diferentes regiones del actual territorio argentino, todas pertenecientes al periodo del Holoceno Tardío pero abarcando desde los 2900 a los 200 años AP. Una de las muestras correspondió a la región de la Puna Jujeña y posee piezas dentales de 23 individuos de 3 sitios arqueológicos diferentes: Doncellas, Agua Caliente de Rachaite y Sorcuyo. Otra de las muestras correspondió al sitio arqueológico Paso Alsina 1 de la región de transición Pampa-Patagonia del cual se obtuvo acceso a piezas dentales de 20 individuos. Por otro lado se analizaron 2 individuos de Los Alerces, 2 del Alero Mazquairán y 4 del sitio Puesto El Rodeo ubicados en la Patagonia centro-oeste. Por último se analizaron 6 individuos provenientes de Rada Tilly de la región de la Costa Atlántica de Patagonia.

Del total de las muestras analizadas se obtuvo un porcentaje de resultados positivos para RFLP igual a 42,11%. Para cada muestra el porcentaje de recuperación obtenido fue del 52,17% en Puna (12/23), 15% en Paso Alsina 1 (3/20), del 66,67% en Rada Tilly (4/6), del 100% en Los Alerces (2/2), del 50% en Alero Mazquiarán (1/2) y un 50% para Puesto El Rodeo (2/4). Puede observarse que en la Puna Jujeña se obtuvo un 41,66% de A, 16,67% de B y de C y 25% de D. Para Paso Alsina 1 se obtuvo un 66,67% de C y un 33,33% de D. En el resto de los grupos muestrales patagónicos solo se obtuvieron tipificaciones correspondientes al Hg D.

Para las secuenciaciones de HVR I del ADNmt los análisis se dividieron en dos. Uno de cada región, norte y sur, por separado comparando con muestras prehispánicas publicadas por otros autores cercanas geográficamente, y otro de todas las muestras del actual territorio argentino en conjunto. En general para la secuenciación se obtuvo un mayor número de resultados positivos, relacionado a que se dio mayor importancia a estos análisis debido a su mayor poder resolutivo en los estudios de genética de poblaciones. Este porcentaje de recuperación para este análisis fue de 73,68%. El linaje encontrado en mayor proporción en las muestras analizadas fue el D1g.

Por otro lado, para determinar si alguno de los linajes se encontró representado en muestras actuales de las mismas regiones, se realizaron redes de haplotipos. A partir de las mismas, además pudo inferirse diferentes relaciones entre los linajes presentes en las poblaciones del pasado y las actuales, pudiéndose determinar que existe una gran diversidad de linajes maternos en las poblaciones prehispánicas que no están presentes en las actuales. Esa diversidad podría haberse diluido por diversos procesos microevolutivos como la deriva génica y/o el flujo génico, o pérdida de la misma por remplazo poblacional o extinción.

ABSTRACT

It is considered as ancient DNA (aDNA) at the recovered in biological remains preserved naturally or artificially (Fraile, 2006). The breakthrough of molecular biology techniques allowed investigators to study aDNA molecules from archaeological samples, mainly bones and teeth. A considerable step forward in studies of aDNA had been performed in 1987, thanks to the invention of the polymerase chain reaction (PCR), which is a method of cloning in vitro employing Taq polymerase that amplifies more than one million times DNA segments. This technique is well suited for recovering and amplifying the very small number of molecules of aDNA that were intact (Labarga-Martinez *et al.*, 1999).

The systems of uniparental inheritance, like mitochondrial DNA (mtDNA) and the non-recombinant portion of the Y chromosome (NRY) transmitted only through the mother and father respectively are the most commonly used in studies of population genetic variability (Schurr and Sherry, 2004). There are thousands of mtDNA copy number per cell allowing a good recovery of intact fragments thereof for forensic or genetic studies of ancient populations. In contrast, the study of NRY is more difficult because there is one copy per cell and only in males (Kaestle *et al.*, 2001).

The first aDNA extractions were performed in extinct animals by Higuchi *et al.* (1984), who identified a quagga nucleic acids and their phylogenetic affinity with modern zebra. A year later Pääbo (1985) obtained DNA sequences by cloning an Egyptian mummy of 2400 years old. When in the late 1980s was first extracted DNA from human bone tissue (Hagelberg *et al.*, 1989), a new field of study on the biological variability of ancient human populations began. Until then jobs were limited to morphological characterization or analysis of the molecular features of current populations. aDNA analysis began supplying direct information about human genetic diversity in the past, as well as new methods for sex determination and individual identification data on the relationship between individuals, providing the genetic distance between populations, the origin of migrant peoples and their contribution to local gene pool, in addition to DNA detection of pathogens (Casas,

2005). A review about aDNA applications in archaeological and bioanthropological researchs considering its scope and limitations along with the legal and ethical implications has been done by Crespo *et al.* (2010).

Modern studies have shown that in Americans most of their mtDNA belongs to 5 amerinds haplogroups (Hgs) A, B, C, D and X. Hgs are monophyletic units with a higher molecular divergence, which can be further subdivided on Haplotypes. So far only X has been detected in North America. More recently it was proposed that the number of founding lineages for the Americas step 5 to be at least 13: A2, B2, C1b, C1d, C1c, C4c, D1, D2A, D3, D4h3a, D4e1c, X2a and X2G (Bandelt *et al.*, 2003; Tamm *et al.*, 2007; Achilli *et al.*, 2008; Perego *et al.*, 2009; 2010; Malhi *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2011; Bodner *et al.*, 2012). South America aDNA studies have shown that these same lineages were in populations of different time frames supporting these studies (Fehren-Schmitz *et al.*, 2010; 2014; Carnese *et al.*, 2010; Baca *et al.*, 2014; Mendisco *et al.*, 2014)

From an archaeological perspective it has been postulated many theories of settlement of the New World by modern humans, but has not yet reached a consensus on the number of people, the time of entry and the route used. From the Biological Anthropology it has been tried to contribute to the understanding of the intricate process of settlement of America, but at the present it has not reached any consensus. aDNA studies are a relatively new tool that deal with to address these issues, however the number of skeletal remains samples analyzed were scarce to achieve diversification processes, settlement and ethnic relations. For this reason all aDNA analysis, especially for South America have great value because together with archaeological and bioanthropological information may shed light on the complex network of processes occurred during the settlement of the territory.

In this context the main objective of this dissertation is to "contribute to a better understanding of the dynamics of the processes of microevolution that took place during the autochthonous settlement of the present Argentine territory, taking into account the spatial and temporal axes using genetic markers of maternal ancestry in archaeological samples". Maternal mitochondrial lineages of 6 samples from different regions of present Argentine territory, all belonging to the Late

Holocene period ranging from 2900 to 200 years BP, were analyzed. One sample corresponds to the Puna region and had teeth of 23 individuals from three different archaeological sites: Doncellas, Agua Caliente de Rachaite and Sorcuayo. Another sample corresponds to the archaeological site Paso Alsina 1 of the transition region Pampa-Patagonia which access to 20 individuals teeth was obtained. On the other hand 2 individuals from Los Alerces, 2 from Alero Mazquairán Site and 4 from Puesto El Rodeo located in west-central Patagonia were analyzed. Finally six individuals from Rada Tilly in the region in the Atlantic Coast of Patagonia were analyzed.

Of all samples analyzed it was obtained a percentage of positive results for RFLP equal to 42.11%. For each sample the recovery rate obtained was 52.17% in Puna (12/23), 15% in Paso Alsina 1 (3/20), 66.67% in Rada Tilly (4/6), 100% in Los Alerces (2/2), 50% in Alero Mazquiarán (1/2) and 50% for Puesto El Rodeo (2/4). It can be seen that in the Puna 41.66% correspond al lineages of A2, 16.67% B2 and 25% C1 and D1. For Paso Alsina 1 66.67% of C1 and 33.33% of D1 was obtained. In the Patagonian only characterizations corresponding to lineages of D1 were obtained.

For sequencing of HVR I for mtDNA the analysis were divided into two. One from each region, north and south, compareing with pre-Hispanic published samples by other authors geographically close, and the other one for all samples of the current Argentine territory as a whole. Overall, for sequencing a greater number of positive results was obtained, related greater weight was given to these analyzes because of their greater resolving power in studies of population genetics. This recovery rate was 73.68%. The lineage found in greater proportion in the samples analyzed was the D1g.

Furthermore, to determine if any of the lineages found in this study was represented in current samples for the same regions, haplotype networks were performed. From them, also it could infer the relationships among lineages present in populations of the past and present, and demonstrate that there was a great diversity of maternal lineages in pre-Hispanic populations that are not present in the current ones. This diversity may have been diluted by various

microevolutionary processes as genetic drift and/or gene flow, or loss of it by population replacement or termination.

Capítulo 1: La Ocupación Humana del Nuevo Mundo: evidencias arqueológicas y bioantropológicas

1.1 Teorías del Poblamiento de América

El continente americano fue el último en ser poblado por los humanos modernos. Existe gran consenso entre los investigadores en que habría sido en el lapso comprendido entre 30.000 y 13.000 años antes del presente (AP) a través de Beringia. El momento preciso de arribo a nuestro continente, en cambio, ha sido ampliamente debatido. En los últimos años ha cobrado importancia la postura que sostiene que habría sido luego del Último Máximo Glacial (LGM – 26.500 a 19.500 años AP) (Goebel *et al.*, 2008; Clark *et al.*, 2009).

El número de poblaciones fundadoras, su origen, el o los momentos de arribo al nuevo mundo, las características de la dispersión a través del continente y las causas de los patrones de variación biológica encontrados dentro de los grupos humanos, han sido objeto de intensa discusión desde comienzos del siglo XX. Sin embargo, la mayoría de los investigadores sostienen que los patrones de variación biológica podrían explicarse por la existencia de múltiples oleadas migratorias y/o procesos microevolutivos como la deriva génica que se describirán más adelante (Neves y Pucciarelli, 1991; Anderson y Gillam, 2000; Schurr, 2004; Goebel *et al.*, 2008; González-José *et al.*, 2008; Kitchen *et al.*, 2008; Politis *et al.*, 2010; Perez *et al.*, 2009,2011; Bernal *et al.*, 2010; O'Rourke y Raff, 2010; Perego *et al.*, 2010). Este tema de gran complejidad fue abordado desde diversas disciplinas como la arqueología, la lingüística, la antropología biológica, la genética de poblaciones actuales y antiguas, y la ecología entre otras. En este apartado se hará una breve recopilación de los estudios publicados hasta el momento sobre los datos, modelos e hipótesis más relevantes.

1.1.1 ¿Cuándo llegaron los primeros americanos?

Las variaciones climáticas que acontecieron en el planeta durante los últimos 30.000 años, fueron una de las principales limitaciones que condicionaron la entrada y asentamiento de los primeros humanos anatómicamente modernos en

el nuevo mundo, debido a las variaciones en el nivel del mar y al avance y retroceso de los glaciares continentales (Brigham-Grette, 2004; Mellars, 2006).

Alrededor de 21.000 años AP, la mayor parte del actual territorio de Canadá y el norte de Estados Unidos estaba cubierta por el Glaciar Laurentino, que se extendía desde la costa atlántica hasta los valles de las Montañas Rocosas, y el Glaciar Cordillerano, desde la costa pacífica hasta el oeste del mismo cordón montañoso. Para ese entonces el nivel del mar se encontraba aproximadamente 120 mts. por debajo del nivel actual, dejando al descubierto un puente terrestre que conectaba Asia con América, conocido como Beringia (Dixon, 2001; Marangoni *et al.*, 2013). En esta zona, al igual que en el este de Siberia, sólo se encontraban bloques de hielo permanentes en las regiones montañosas. Las zonas bajas, al estar descubiertas y poseer distintos tipos de recursos, permitieron garantizar la subsistencia de poblaciones humanas y de varias especies de grandes mamíferos (Politis *et al.*, 2010), por lo que habrían funcionado como un refugio, y luego como un centro postglacial de dispersión para los humanos que poblaron América (Bonatto y Salzano, 1997; Brigham-Grette *et al.*, 2004; Hoffecker *et al.*, 2014).

La primer ruta de acceso al continente habría sido a través de la costa pacífica, que quedó libre de hielo alrededor de 15.000 años AP, que posiblemente llegaron con el uso de canoas, mientras que un corredor dentro del continente, denominado Alberta o “corredor libre de hielo” quedó abierto al paso cuando las masas de hielo comenzaron a retirarse aproximadamente 13.500 años atrás (Fig. 1), aunque las condiciones en su interior eran seguramente hostiles para la supervivencia humana (Goebel *et al.*, 2008). Hasta el momento no existen evidencias confiables sobre cuál fue el momento exacto de uso del corredor Alberta, en caso de haber ocurrido.

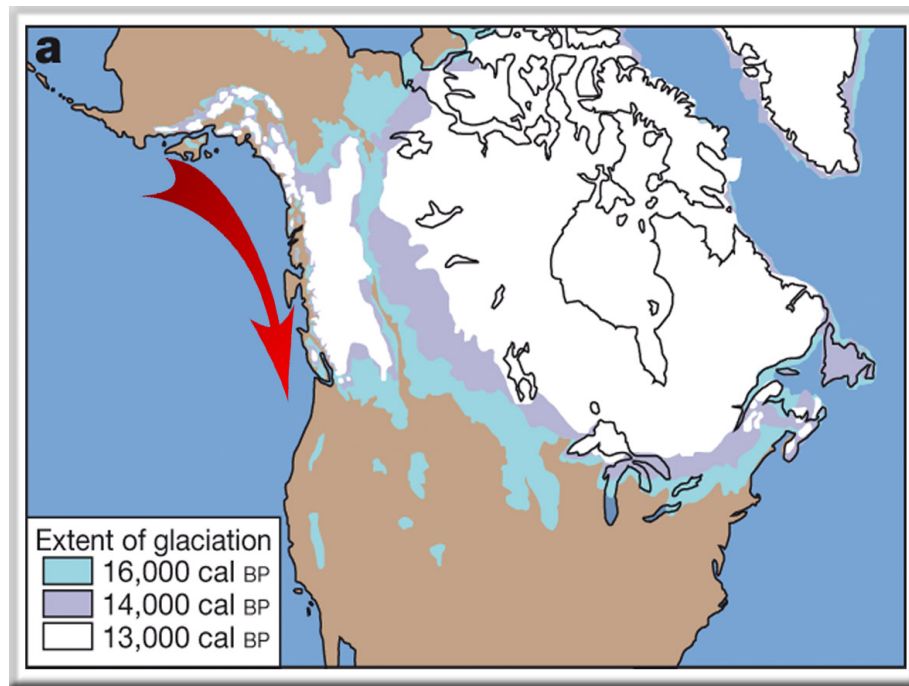


Figura 1. Extensiones de las masas glaciales de Norteamérica en diferentes momentos del periodo final del Pleistoceno – Inicios del Holoceno Temprano. La flecha indica la zona libre de hielo de la Costa Pacífica. Imagen tomada y modificada de Rasmussen *et al.*, (2014).

Surge así una de las primeras teorías del poblamiento de América, la cual sostuvo que el arribo a nuestro continente se produjo con posterioridad a los 10.000 años AP y que los cazadores-recolectores coexistieron con la megafauna. En las cercanías de la ciudad de Folsom, estado de Nuevo México (EEUU), se encontró evidencia de poco más de 10.000 años AP, de una punta de proyectil incrustada en la costilla de un bisonte pleistocénico. Ese tipo de punta con una acanaladura longitudinal en ambas caras también fue encontrada en sitios más antiguos que compartían características con el complejo Folsom, los cuales se consideraron como pertenecientes a Clovis, y se convertirían en poco tiempo, en el centro de debate del poblamiento. En 1937 Ales Hrdlička denominó a esta teoría como “*Clovis-first* o de origen único”. Luego Waters y Stafford (2007) reanalizaron el análisis de las cronologías de los sitios Clovis, proponiendo que su origen puede remontarse entre 11.080 ± 40 y 10.765 ± 25 años AP.

Los sitios pertenecientes a Clovis (Fig. 2) fueron localizados en diferentes puntos al sur de las masas de hielo que estaban presentes en el Pleistoceno final/principios del Holoceno, en el actual territorio de los Estados Unidos y sudeste de Canadá (Debert, Nova Scotia), (Haynes, 2002; Hamilton y Buchanan, 2007). Además de sus típicas puntas de proyectil, se caracterizaban por instrumentos líticos en forma de grandes hojas, y utilización de marfil y ocre rojo (Waguespack, 2007). La aparición y dispersión de los sitios Clovis por todo Norteamérica y la diversidad de fechados radiocarbónicos obtenidos, no han permitido establecer hasta el momento, un punto de origen o ruta de colonización para los humanos que confeccionaban estos tipos de punta de proyectil (Goebel *et al.*, 2008).

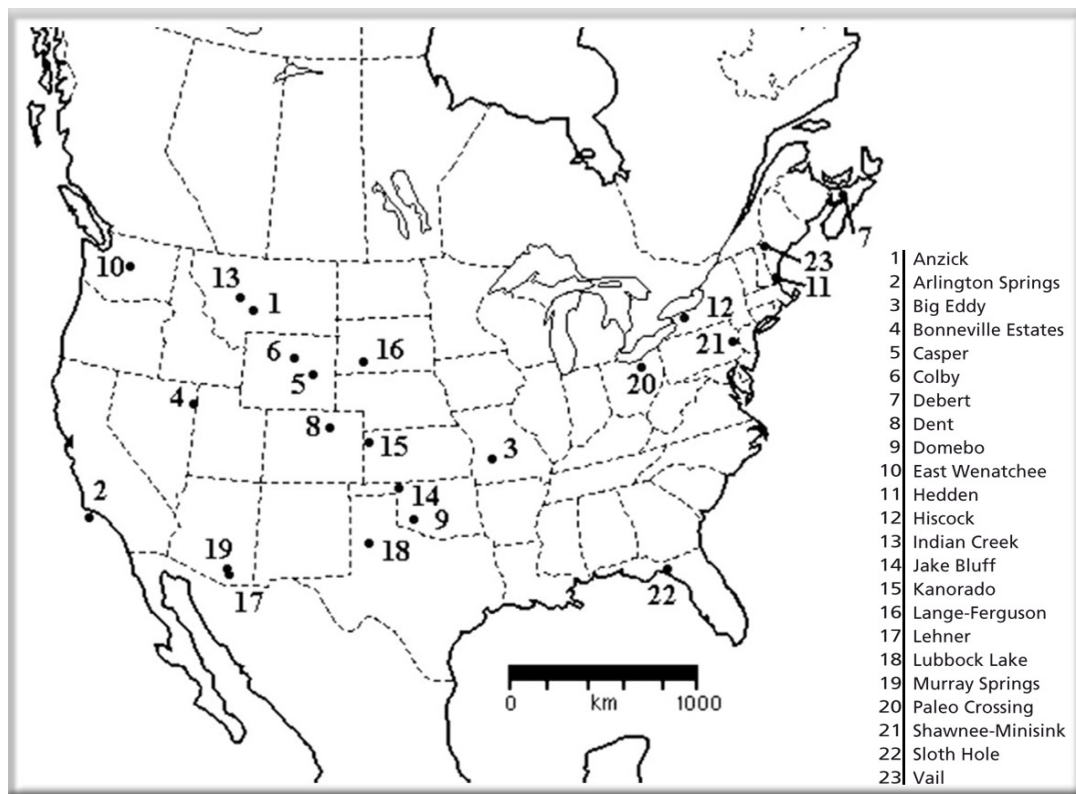


Figura 2. Ubicación de los sitios pertenecientes al complejo Clovis. Imagen tomada y modificada de Hamilton y Buchanan (2007).

Existen varios sitios en Sudamérica que presentan dataciones anteriores o contemporáneas a Clovis. De ellos el más aceptado es Monte Verde, en el sur de Chile, datado en 12.800 a 12.300 años AP (Dillehay, 1997; Adovasio y Pedler, 1997; Dillehay *et al.*, 2008). Éste sumado a otros sitios de Sudamérica como Cueva Fell, Cueva Casa del Minero, Arroyo Seco 2, Cerro Tres Tetras, Cueva del Lago Sofia 1, Paso otrero 5, Tres Arroyos 1, Cerro La China, Cerro el Sombrero, Urupez 2, Cueva del Medio, Quebrada Santa Julia, Cueva de Pedra Pintada y Piedra Museo (Fig. 3), debilitaron la teoría *Clovis First* (Steele y Politis, 2009). En estos sitios se encontró evidencia arqueológica de un rango variado de herramientas de hoja, puntas bifaciales, y en algunos casos las distintivas puntas “cola de pescado” (Goebel *et al.*, 2008).



Figura 3. Ubicación geográfica de sitios arqueológicos de Sudamérica con dataciones más antiguas que 10.000 años AP.

1.1.2 ¿Un origen europeo para los nativos americanos?

Bradley y Stanford (2004) afirman que ciertas similitudes entre el complejo Clovis y la Cultura Solutrense del Paleolítico Superior europeo se deberían a que esta última habría dado origen a la primera, proponiendo la hipótesis de una migración por la costa del Océano Atlántico Norte. Sin embargo, ésta ha recibido numerosas críticas, entre ellas que ambas culturas se encontraban a una gran distancia y separadas por más de 6.000 años (Marangoni *et al.*, 2013).

En 1996 en la ciudad de Kennewick, al este del Estado de Washington, se encontraron restos bien preservados de un esqueleto humano casi completo, datado en 8.410 ± 60 años AP. Su morfología corporal y craneal conducía a la idea de un origen europeo, ya que presentaba similitudes con poblaciones modernas del oeste del viejo continente y no se correspondía con los amerindios, sobre todo del noroeste de Norteamérica. Sin embargo, luego de que Chatters (2000) realizara comparaciones morfométricas con paleoamericanos del mismo periodo y hasta más antiguos, no encontró diferencias significativas, postulando que sus características dentales y craneofaciales poseían afinidad con los Ainu y poblaciones Isleñas del Pacífico. Para el “*Hombre de Kennewick*” aún, casi dos décadas después de su descubrimiento, no hay resultados genéticos que puedan dar cuenta de su origen.

Por su parte, la aparición en algunos antiguos pobladores de Norteamérica del linaje mitocondrial X, el cual también aparece en poblaciones europeas, apoyaba la hipótesis de un origen europeo. Sin embargo, estudios genéticos más detallados, mostraron que se trata de dos variantes diferentes del mismo linaje, y la encontrada en América fue descrita para poblaciones asiáticas. Estas últimas podrían presentar un ancestro común con algunas poblaciones europeas (Schurr *et al.*, 1990; Torroni *et al.*, 1993; Merriwether, 2006) desestimando esta teoría.

1.1.3 ¿Cuántas migraciones?

1.1.3.1 La Teoría de las tres oleadas migratorias

En 1986 el lingüista Joseph Greenberg, el especialista en antropología dental Christy Turner II y el genetista Stephen Zegura, publicaron un trabajo donde teniendo en cuenta las bases establecidas en un trabajo previo por Turner (1983) propusieron el modelo que se conoce como “tripartito o de tres oleadas migratorias”. A través del análisis de esas tres líneas de evidencia llegan a una división de las poblaciones nativas del Nuevo Mundo en tres grupos: Amerindios, Na-Dene y Eskimo-aleuts, cada uno representante de una migración diferente desde Asia (Greenberg *et al.*, 1986).

Desde la perspectiva genética con los marcadores disponibles en ese momento, el único sistema que apoyaba al modelo tripartito eran las inmunoglobulinas Gm, ya que no era suficiente la resolución de los otros marcadores (grupos sanguíneos, proteínas séricas y polimorfismos enzimáticos) para distinguir entre los tres grupos. Posteriormente, la información de ADN mitocondrial descrita por Wallace y Torroni (1992), además de apoyar el origen asiático de los nativos americanos, coincidió con la evidencia lingüística en la existencia de las tres oleadas migratorias, proponiendo que los amerindios provienen de dos migraciones distintas y a su vez se separan de los Na-Dene que entraron más tardíamente en una tercer migración, sin proponer información para los Eskimo-Aleut.

1.1.3.2 Teoría de dos oleadas migratorias

El primer intento de utilizar información genética para desarrollar un posible modelo para el poblamiento de América fue realizado por Foster *et al.* (1996) utilizando información de 571 secuencias de la Región Hiper Variable I (HVR I) del ADN mitocondrial. En ese trabajo propusieron la existencia de dos oleadas migratorias en lugar de tres. La primera habría provenido directamente del noreste

desde Siberia hacia América hace aproximadamente 25 – 20.000 años atrás, dando origen a los amerindios. Luego de la última glaciación (Dryas temprano ~11.500 años atrás) se habría dado una segunda oleada a América por una rápida expansión desde Beringia que dió origen a los ancestros de los Eskimo-Aleuts y los Na-Dene.

Otros investigadores también apoyan esta teoría, aunque toman a los Na-Dene sin considerar a los Eskimo-Aleuts y propusieron que el primer ingreso se habría dado por la costa pacífica 14.700 años atrás, y estaría acompañada por poblaciones con elevadas frecuencias de los linajes maternos A, B, C y D. La otra ruta sería a través del corredor libre de hielo por poblaciones representantes del linaje materno X, aproximadamente hace 12.500 años (Torroni *et al.*, 1992; Schurr y Sherry, 2004). Perego *et al.* (2010) apoyan esta teoría, ya que a partir del estudio de dos linajes poco frecuentes (D4h3a y X2a) llegaron a la misma conclusión, con una pequeña variación en los momentos de entrada al continente.

1.1.3.3 Teoría de dos componentes biológicos

A partir de estudios craneométricos, Neves y Pucciarelli (1991) postularon otra hipótesis, conocida como “de dos componentes biológicos principales”, que hace referencia a una migración anterior a los amerindios (antes de los 12.000 años AP), con mayor afinidad con las primeras poblaciones de Australia. A través de comparaciones de poblaciones antiguas y modernas de nativos americanos, primero utilizando métodos tradicionales y luego incorporando herramientas de morfometría geométrica (Neves *et al.*, 2003), observaron que las muestras podían dividirse en dos grupos que responderían a migraciones diferentes. Los cráneos anteriores a 10.000 años con una morfología generalizada fueron asignados a los paleoamericanos, similares a australianos, melanesios y africanos sub-saharianos, exhibiendo una forma dolicocefala¹. Este grupo más antiguo tendría algunos

¹Cráneo angosto y alargado, con la bóveda elevada, la frente y la cara ancha, las orbitales altas y el paladar corto.

representantes actuales como Yámanas de Tierra del Fuego (Argentina y Chile), Botocudos del centro-sur de Brasil, Pericúes de Baja California (México), así como a los habitantes más antiguos de Lagoa Santa. Se cree que su ingreso habría sido a través de la costa pacífica, con una dispersión rápida hacia el sur. Por el contrario, los amerindios habrían provenído posteriormente de la migración de una población del este de Asia. Esta suposición se basa en que presentan una morfología craneal braquicéfala² similar a “mongoloides” antiguos y modernos del este de Asia (Neves y Hubbe, 2005; Hubbe, 2010). Por su parte este último grupo podría haber ingresado al continente a través del corredor Alberta.

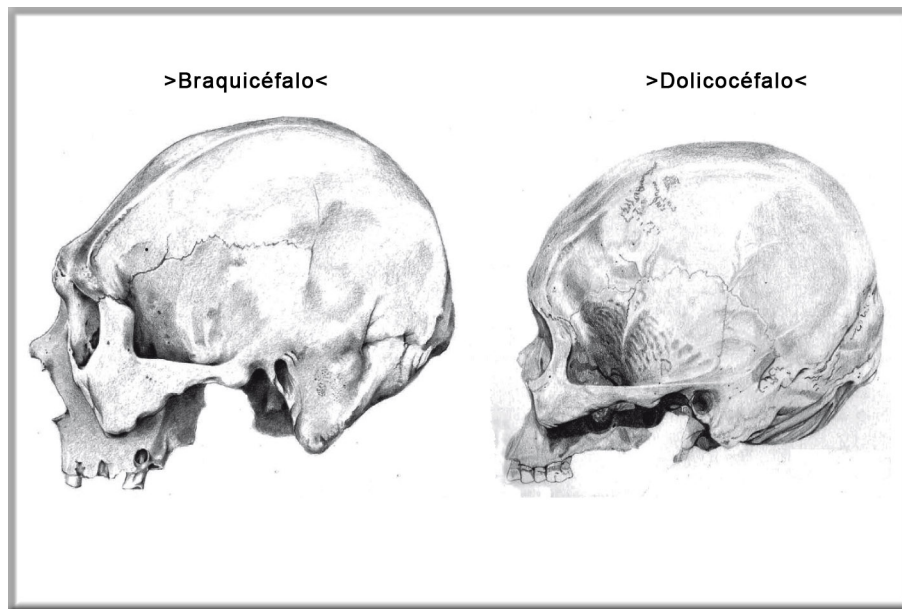


Figura 4. Esquemmatización de los tipos de cráneo que demuestra las diferencias en tamaño y forma. Imagen tomada y modificada de Perez (2011).

Sin embargo, Powell y Neves (1999) plantearon la acción de procesos microevolutivos como alternativa plausible para describir el modelo de dos componentes biológicos, sobre todo si se considera un poblamiento relativamente rápido y con poblaciones pequeñas, como se ha sugerido con evidencia

² Neurocráneo corto y ancho, caras anchas y desplazadas hacia atrás y órbitas y nariz altas.

arqueológica y genética. Esta última proposición podría ser explicada por la acción local de mecanismos microevolutivos en América para dar cuenta de la variación observada por Rothhammer y Silva (1990).

En discrepancia con esta postura, Gonzalez-José *et al.* (2008) utilizando datos craneométricos y datos moleculares, señalan que sería más apropiado tomar a los grupos más representativos de los “paleoamericanos, amerindios y mongoloides” como extremos de la variación de un mismo componente poblacional. Por su parte Perez *et al.* (2009) analizando muestras esqueléticas del sitio Arroyo Seco 2 (sudoeste de la Provincia de Buenos Aires) encontraron diferencias a nivel craneométrico entre muestras del Holoceno Medio y Tardío Inicial, con las del Tardío Final, sin embargo ambas muestras presentaban los mismos haplogrupos mitocondriales. Estos resultados sugirieron que posiblemente la variación morfológica encontrada entre los nativos americanos antiguos y recientes, sea el resultado del efecto de factores microevolutivos azarosos (deriva génica) y no azarosos (selección natural o plasticidad fenotípica), antes que de distintas oleadas migratorias (Politis *et al.*, 2010; Marangoni *et al.*, 2013).

A partir del estudio de datos genéticos se ha sostenido que el modelo de dos componentes biológicos diferentes no sería plausible, ya que los haplogrupos del ADNmt y del cromosoma Y tienen su origen en una misma región de Asia Central, y todos presentan tiempos de coalescencia similares, indicando que podría existir un pool génico ancestral para todos los nativos americanos, incluidos los paleoamericanos (Merriwether, 1995 y 1996; Kemp *et al.*, 2007; Goebel *et al.*, 2008).

1.1.3.4 Teoría de incubación en Beringia

Bonatto y Salzano (1997) analizaron la región control del ADNmt de 544 amerindios actuales y propusieron el “modelo de incubación en Beringia”, donde las poblaciones ancestrales de los amerindios se habrían diferenciado genéticamente antes de colonizar el continente (Tamm *et al.*, 2007; Bodner *et al.*,

2012). Los autores proponen que un tiempo después de haber ocupado gran parte de Beringia, cruzaron el corredor Alberta. El modelo sostiene que un grupo se habría abierto camino hacia el continente americano, pero la extensión de los hielos continentales entre los 14.000 a 20.000 años atrás, aisló a esta población al sur de las masas de hielo de la que aún habitaba Beringia. De la primera población habrían surgido los amerindios y de la segunda, los Na-Dene y los Eskimo-Aleut.

Otro modelo con una propuesta similar utilizó análisis estadísticos bayesianos para estimar los periodos de coalescencia y de tamaño poblacional aproximado que podrían haber tenido los grupos (Fig.5) (Kitchen *et al.*, 2008; Mulligan *et al.*, 2008; Fagundes *et al.*, 2008). En la primera fase se habría dado la expansión de los ancestros de los amerindios hacia el noreste asiático y su diferenciación del pool génico de las poblaciones del centro-este de Asia hace 43.000-36.000 años AP, sumado a un aumento poblacional (los autores suponen 640 mujeres iniciales a 4.400 mujeres al fin del periodo, aproximadamente). Este proceso habría sido precedido por un periodo de estabilidad demográfica y aislamiento de los proto-amerindios en Beringia entre los 36.000-16.000 años AP, donde pudo haber actuado la deriva génica generando nuevas variantes genéticas. La fase final se habría dado con la colonización de todo el continente americano, hace 16.000 años AP aproximadamente, lo cual coincide con el final de la última era glacial. En esta última etapa los grupos humanos habrían estado conformados entre 1.000 a 5.400 mujeres, proponiendo además que habría sido más probable su migración por el corredor Alberta. En este estudio proponen que los Eskimo-Aleuts y Na-Dene provienen de la misma población fundadora de proto-amerindios de Beringia.

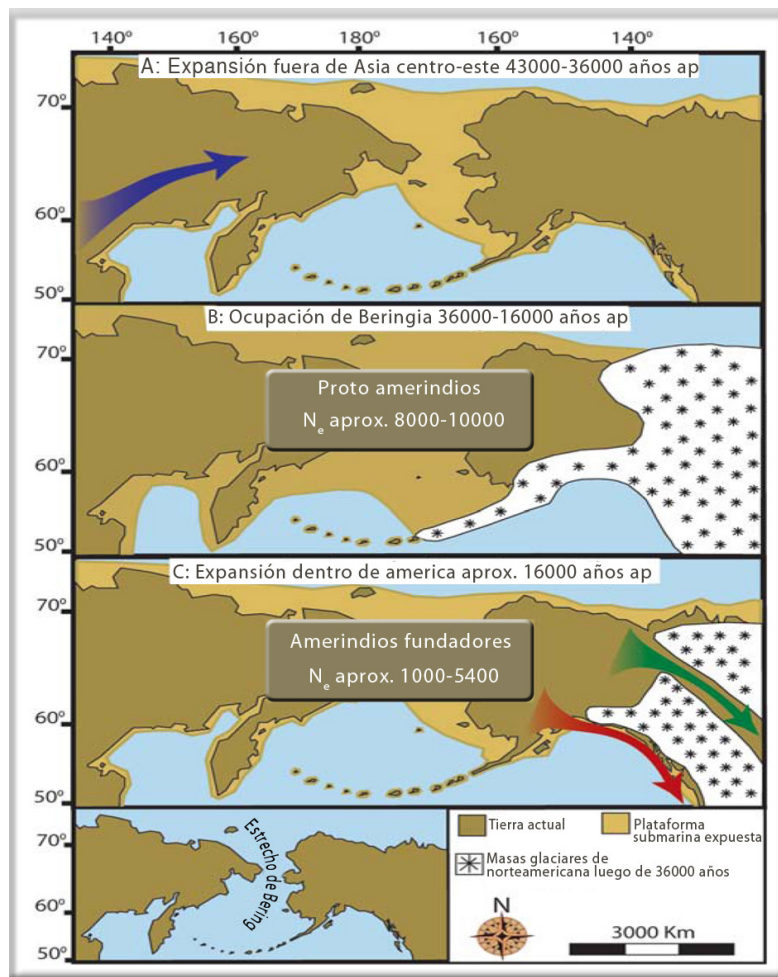


Figura 5. Mapa que describe los tres periodos del poblamiento de América y el número de mujeres involucradas. Imagen tomada i modificada de Kitchen et al. (2008)

1.1.3.5 Teoría de Poblamiento desde la costa norte de Alaska

O'Rourke y Raff (2010) propusieron un nuevo escenario de poblamiento desde el norte de Asia a América. La costa norte de Beringia habría sido poblada hace aproximadamente 30.000 años y siguiendo la explotación de recursos costeros, podrían haber colonizado la costa norte de Alaska antes de la LGM, ingresando luego hacia el interior del continente siguiendo el curso del Río Mackenzie. Además, al existir áreas costeras libres de hielo la migración podría haber continuado por la Bahía Baffin y luego hacia el sur a lo largo de la costa este de Norteamérica (Figura 6).

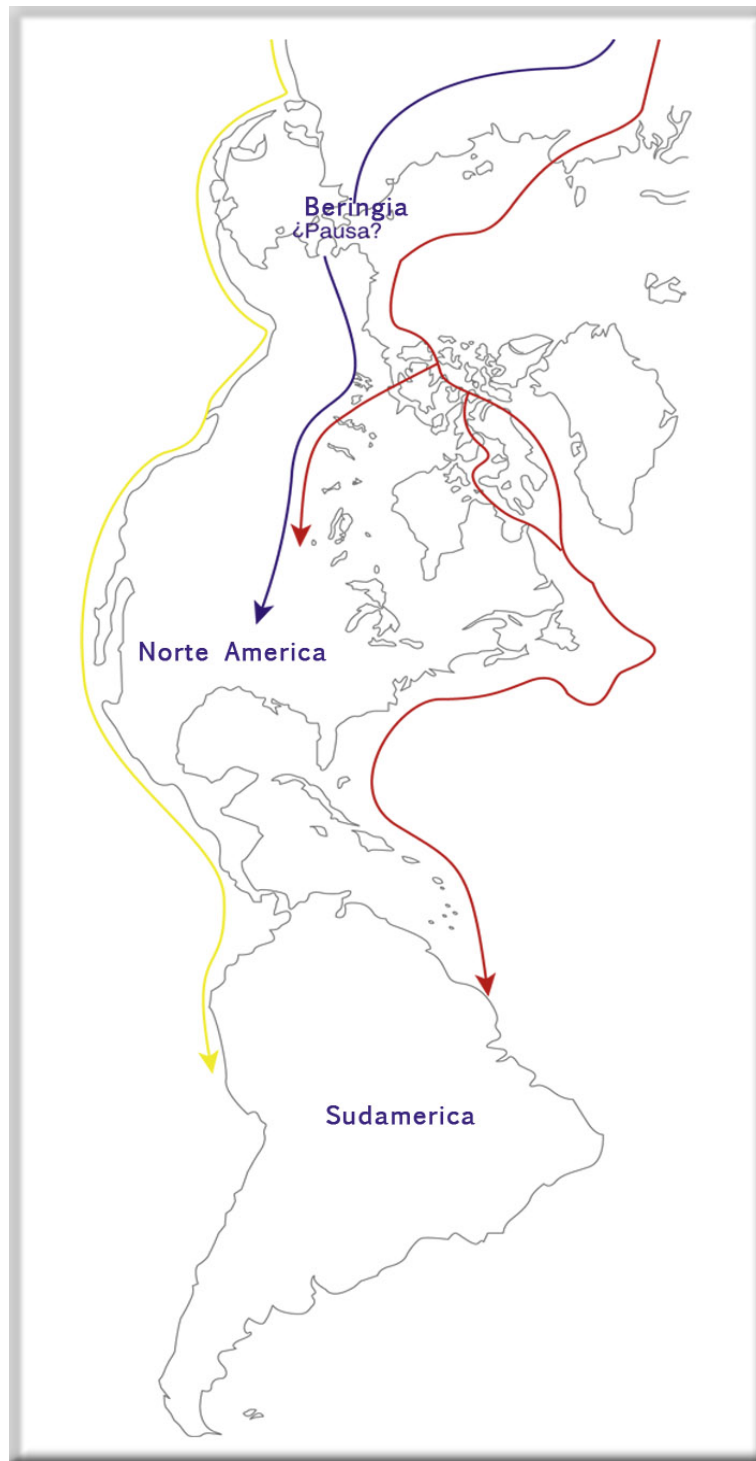


Figura 6. Rutas hipotéticas para el poblamiento de America tomada y modificada de O'Rourke y Raff (2010). En amarillo la ruta Pacífica, en azul la entrada desde Beringia por el corredor libre de hielo, en bordó la entrada al continente por la costa norte.

1.1.3.6 Teoría de flujo génico recurrente

Desestimando estas últimas teorías basadas en análisis genéticos y utilizando diferentes métodos estadísticos (Cálculo Bayesiano Aproximado), otros grupos de investigadores propusieron que ninguna de las posibilidades mencionadas era capaz de explicar el nivel de variación observado en las poblaciones amerindias. La información disponible puede ser mejor interpretada si se considera la existencia de flujo génico entre las poblaciones de Asia y América, llamando a esta nueva hipótesis “modelo de flujo génico recurrente” (Ray *et al.*, 2010). La variación craneofacial encontrada por De Azevedo *et al.* (2011) en muestras amerindias de diferentes temporalidades también puede ser explicada por esta teoría.

Según lo expuesto previamente, puede apreciarse que la discusión aún continúa abierta y que no se ha llegado a un consenso en cuánto al momento de entrada al continente y la/s rutas/s utilizada/s luego de haber cruzado Beringia. Cada línea de investigación plantea un escenario diferente, aunque algunos de ellos coincidan. Sin embargo, actualmente la posición mayoritaria sostiene que no habría un grupo fundador paleoamericano anterior a los amerindios, sino que todos los nativos americanos provendrían de un mismo grupo fundador que habría ingresado a América desde el noreste de Siberia antes del último periodo glacial. Estas poblaciones se habrían restringido a áreas de refugio durante la LGM y la variación génica se habría remodelado posiblemente por deriva, manteniendo una parte de los linajes ancestrales, pero también originando nuevas variantes. La ruta de dispersión hacia Sudamérica por la costa pacífica parecería ser la que tiene mayor aceptación, sobre todo si se tienen en cuenta los fechados radiocarbónicos como por ejemplo el del sitio Monte Verde, en Chile (12.800 – 12.300 años AP).

1.2 Poblamiento de América del Sur

El relevamiento de sitios arqueológicos antiguos en este sector del continente es aún desigual y se sabe muy poco del poblamiento de algunas regiones como la Amazonia (con la excepción de algunos sitios como Monte Alegre), gran parte de la cuenca del Orinoco, la región chaqueña, y del bosque pluvial de la falda oriental de los Andes. No obstante, otros sectores son relativamente bien conocidos y disponen de una cantidad de datos considerable, como la Patagonia, las llanuras pampeanas, los valles centrales de Chile, la sabana de Bogotá, la costa norte de Perú y el planalto brasileño. En el caso del actual noroeste argentino (NOA), es la región del país más intensamente estudiada a nivel arqueológico (Williams *et al.*, 2007). A continuación se hará un breve recorrido por los registros arqueológicos y bioantropológicos propuestos para Sudamérica, centrándonos en el actual territorio argentino.

1.2.1 Abordaje desde la evidencia Arqueológica

1.2.1.1 del Fin del Pleistoceno - Holoceno Temprano

Para el poblamiento de Sudamérica, el Istmo de Panamá se presenta como un cuello de botella geográfico que se abre a una amplia región, con una gran variedad de ambientes. Las evidencias arqueológicas más abundantes de los primeros pobladores provienen del cordón norandino (Borrero, 1996; Rivero y Berberian, 2007; Steele y Politis, 2008; Rothhammer y Dillehay, 2009), e indicaría que los primeros pobladores que llegaron al continente debieron pasar necesariamente por las cordilleras colombianas, por los valles de los grandes ríos (Cauca y Magdalena) o surcar la costa pacífica. En todas estas regiones se han encontrado evidencias de poblamiento temprano, presentando algunos sitios dataciones pre o para-Clovis como se mencionó en el capítulo anterior, y evidencias de diferentes modos de vida de sus ocupantes dependiendo de los recursos disponibles (Fehren-Schmitz *et al.*, 2011).

Los diferentes escenarios ecológicos que presenta el cono sur se asocian a la diversidad de artefactos líticos que se encontró en esta región (Rothhammer y Dillehay, 2009). La existencia de “puntas Cola de Pescado” se encuentra distribuida por toda la región, pero otros tipos de puntas como las lanceoladas en Monte Verde, triangulares medianas en Patagonia, o pequeñas en la Puna chileno-argentina, se registran localmente. Esta evidencia, a diferencia de las puntas Clovis en Norteamérica, no da una idea de unificación tecnológica a nivel subcontinental (Flegenheimer *et al.*, 2013).

En general, los registros arqueológicos de varias regiones pertenecientes al Holoceno Temprano, estarían indicando que las poblaciones durante ese periodo presentaban varias estrategias adaptativas generalizadas. Es decir, una alta movilidad y un uso no especializado de los recursos, con la caza oportunista de megafauna y el carroñeo (Rivero, 2007). Es de destacar que tanto en la cuenca de los ríos como en la zona cordillerana hay evidencia de poblamiento temprano como ya ha sido mencionado, por lo que los primeros pobladores podrían haber colonizado y se habrían adaptado a diferentes ambientes simultáneamente.

Una de las rutas que podrían haber utilizado para poblar el sur del continente sería la costa pacífica (de Saint Pierre *et al.*, 2012), lo que implicaría una vía rápida de expansión hacia el sur. Otra posibilidad podría ser la Costa Atlántica, pero el problema que aquí se plantea es la posible pérdida de sitios tempranos en las zonas costeras debido al ascenso del nivel del mar con un cambio de la línea de costa hacia el interior del continente (Miotti y Salemme, 2004). El material líticos y faunístico recuperado es una posible evidencia de que la Costa Atlántica del Cono Sur podría haber sido ocupada antes de la transgresión marina del Holoceno Medio, ya que la datación más temprana obtenida para la costa es de 7420 ± 90 años AP (Prates *et al.*, 2013). Los sitios arqueológicos en el este de Sudamérica, cercanos al Atlántico están ubicados próximos a los cursos de los ríos, los cuales siempre fueron una vía natural de circulación, sugiriendo posiblemente un ingreso a través del litoral fluvial (Miotti, 2006; Motti, 2012).

Para el actual territorio brasileño aún no se ha establecido cuándo habría comenzado su poblamiento. Esta región presenta varios inconvenientes como la preservación de sitios debido a la erosión, fluctuación del nivel del mar y rápida descomposición del material orgánico por las condiciones climáticas. Existen sitios como Pedra Furada o Lagoa Santa que presentan dataciones antiguas controversiales en restos humanos, pero sus fechados de ocupación son cercanos a los 12.000 años AP. Hasta el momento, los fechados más tempranos con mayor consenso corresponden a Pedra Pintada, en Monte Alegre, con 11.200 años AP (Prates *et al.*, 2013).

Respecto a los Andes Centrales, a partir de información arqueológica se postula que la llegada de los primeros pobladores podría haber ocurrido cerca de los 12.000 a 11.000 años AP o más tardíamente en la zona costera (Rademaker *et al.*, 2014). La evidencia de sitios arqueológicos en los valles altos de los Andes es escasa encontrándose algunas cuevas por encima de los 4.000 m.s.n.m. (Aldenderfer, 1999). Entre los 11.000 y 10.000 años, la región del litoral del Perú habría sufrido un aumento del nivel del mar (por lo que habrían quedado sitios arqueológicos bajo el agua), aridización de la costa pacífica, enfriamiento del agua oceánica y modificaciones de la distribución de plantas y animales (Rothhammer y Dillehay, 2009). Esas condiciones desfavorables habrían llevado a los pobladores a migrar a zonas con disponibilidad de agua dulce y nuevos recursos para explotar, generando como consecuencia, un aumento demográfico en otras regiones. Aunque también algunos grupos habrían comenzado a explotar un rango más amplio de especies marinas posibilitando una ocupación litoral consolidada (Politis *et al.*, 2010).

En el sur de los Andes meridionales la dispersión humana habría sido un proceso iniciado en torno de los 11.000 años AP, ocupando una marcada diversidad de ambientes en extensos rangos de acción, mediante redes de intercambio de recursos. A este periodo se lo conoce como Arcaico y se lo relaciona con el Holoceno Temprano y la extinción de la megafauna. Además, se da la aparición de variados conjuntos de puntas de proyectil, anzuelos de concha en la costa, cuchillos, instrumentos de molienda y diversos tipos de raspadores

para el trabajo de pieles y cueros, conjuntamente con el desarrollo de la cordelería y la cestería, una mayor frecuencia de prácticas mortuorias, arte rupestre, el uso de cuevas y aleros, y el énfasis en la recolección de alimentos vegetales (Muscio, 2001).

Durante el Arcaico se habrían establecido las bases para el desarrollo de distintos mecanismos de complementariedad ecológica como la transhumancia entre los diferentes ambientes surandinos, incluyendo las interacciones entre las poblaciones de ambas vertientes de la cordillera de los Andes planteando la existencia de complementariedad social (Berón, 2007). Los estudios realizados en el NOA (Fig. 7) especialmente en Inca Cueva 4, las cuevas de Yavi y Pintoscayoc, sugieren que la región fue ocupada a finales del Pleistoceno, cerca de los 10.600 años AP (Aschero y Podestá, 1986; Politis *et al.*, 2010; Prates *et al.*, 2013). Se encontraron puntas de proyectil similares a las encontradas en Perú, lo que podría plantear un escenario dinámico con circulación de bienes y de artefactos, posiblemente relacionados a flujo génicos entre las poblaciones. Por otro lado, se ha planteado que los sitios del noroeste encontrados en altura podrían haber sido sólo ocupados en determinadas estaciones del año (Muscio, 2001).

Las Sierras Centrales, en el actual centro-oeste del territorio de Argentina (Fig. 7) presentan la misma temporalidad que el NOA según por los fechados más tempranos del sitio El Alto 3 de 11.040 y 9.790 años AP (Rivero, 2007) y Candonga de 10450 ± 50 años AP (Cornero *et al.*, 2014), lo cual podría estar indicando un ingreso rápido al interior del continente. Este último hallazgo no brinda demasiadas evidencias sobre el modo de vida de los pobladores de la región serrana, pero se propone que no habría sido muy diferente a la del resto de las poblaciones del Cono Sur, es decir, poblaciones de baja densidad y amplio rango de acción (Rivero y Berberían, 2006; Borrero, 2008).



Figura 7. División del actual territorio argentino en regiones arqueológicas. Mapa tomado y modificado de Prates et al. (2013)

Hacia el oeste, los focos de poblamiento y de paso desde la ladera occidental de Los Andes hacia el actual territorio argentino habrían sido los sectores aledaños a los sitios Gruta del Indio (Gil *et al.*, 2005) y Agua de la Cueva (Gil *et al.*, 2011) fechada en 10.950 Años AP (García, 1999).

Dentro de las llanuras pampeanas de Argentina, los sitios más antiguos son Arroyo Seco 2 con fechados entre 12.175 y 11.200 años AP, Cerro la China (11.150 – 10.525 años AP) y El Sombrero (10.725 – 10.270 años AP) (Fig. 3), (Flegenheimer y Zárate, 1997; Prates *et al.*, 2013). Es importante destacar que en esta área las dataciones son más tempranas que en el NOA y similares a las de Patagonia, como se menciona más adelante, y además presenta el mayor

porcentaje de sitios tempranos del Cono Sur (32,1%) seguido por la Patagonia (31,6%), (Prates *et al.*, 2013). En la región pampeana se encontraron puntas “cola de pescado” propias del cono sur americano. Como se ha dicho, éstas también fueron halladas en la Patagonia, valles centrales de Chile y costa de Perú, mostrando una amplia distribución y sosteniendo la idea de un sistema de intercambio y/o circulación (Politis *et al.*, 2004; Flegenheimer *et al.*, 2013). Hay indicios de intercambio también en el sitio El Sombrero, donde se halló un tipo de roca exótica para la región de Tandilia, proveniente del centro-sur de Uruguay o de Entre Ríos, que también estaría dando cuenta de cierto contacto o sistema de redes sociales de interacción entre los amerindios de hace 10.000 años atrás (Politis *et al.*, 2010).

En la región de la Patagonia, a ambos lados de la cordillera, las primeras ocupaciones humanas se habrían establecido entre los 13.000 a 12.000 años AP (Borrero, 1999; Dillehay, 2000; Miotti y Salemme, 2004). El fechado radicorbónico más antiguo obtenido en el actual territorio argentino es de 12.890 años AP (Prates *et al.*, 2013). Este periodo ha sido caracterizado por importantes cambios climáticos y geológicos que afectaron la composición y distribución de la flora y fauna de la región, generando un escenario de inestabilidad ambiental. Comenzó a registrarse una tendencia en el aumento de la temperatura y retiro de glaciares, a partir de los 14.000 años AP aproximadamente (Borrero, 1999; Bernal, 2008).

El poblamiento de la Patagonia se describe como un proceso de expansiones y contracciones de las poblaciones humanas, vinculadas con las fluctuaciones climáticas, y por tanto con la disponibilidad y distribución de recursos (Miotti y Salemme, 2004). Los sitios cercanos a ríos, lagos y cuencas bajas habrían funcionado como puntos de atracción para la instalación de poblaciones, mientras que las mesetas, la cordillera y los bosques habrían sido utilizados de forma estacional (Goñi *et al.*, 2002; Bernal, 2008).

Por otro lado, la formación del Estrecho de Magallanes, ocurrido durante fines del Pleistoceno- principios del Holoceno, habría restringido la dispersión y circulación, limitando el flujo entre las poblaciones y favoreciendo la evolución

relativamente independiente, tanto en aspectos biológicos como culturales, de los grupos ubicados al norte y al sur del Estrecho (Borrero, 2008).

Es de destacar que no se han encontrado hasta el momento sitios de ocupación temprana en la región de Chaco y Nordeste de Argentina (Fig.7) Esto puede deberse posiblemente a características del ambiente y la humedad de la región que pueden haber disminuido la visibilidad de los sitios. Por ejemplo, ambas regiones carecen de abrigos rocosos, los cuales son buenos conservadores de evidencia (Prates *et al.*, 2013). Como también puede deberse a la falta de estudios arqueológicos en la región.

1.2.1.2 del Holoceno Medio

No hay acuerdo entre los autores acerca de la extensión de este periodo, a los fines de la presente tesis se seguirá el criterio de Mandrini (2008) que establece su duración entre los 7.000 y 3.000 años AP aproximadamente. Los importantes cambios climáticos que se produjeron durante el Holoceno Medio ocasionaron modificaciones en la composición de la vegetación y de la fauna del continente. El clima frío y árido que prevalecía durante el periodo anterior se fue tornando más cálido y húmedo, pero con ocasionales reversiones a condiciones pasadas. El máximo en las precipitaciones y las temperaturas se alcanzan con el Optimo Climático alrededor de los 6.500 a 5.500 años AP.

Luego de los 4.000 años AP las condiciones se volvieron semejantes a las actuales. Sin embargo, hay evidencia de aparición de periodos de aridez a nivel global y otros con mayor consecuencia a niveles más locales (Rodríguez, 2010).

Estas alteraciones climáticas y ambientales, podrían haber generado cambios en la distribución espacial y el desarrollo de las poblaciones humanas, y modificaciones culturales, por ejemplo en las tecnologías empleadas, como consecuencia de una adaptación a nuevos recursos y hábitats (Miotti, 2006; García, 2010). Para el norte del actual territorio argentino el aumento de los sitios encontrados hacia los 5.000 – 4.000 años AP reflejaría el crecimiento poblacional

con ocupaciones más intensas. Esto sería causa y consecuencia del comienzo de la domesticación de plantas y animales (Tarragó, 2002; Yacobaccio, 2007; Larson *et al.*, 2014), provenientes desde sociedades complejas de los Andes Centrales (Altiplano y Perú) con un posible origen cercano a los 10.000 años AP (Stanish, 2001).

Martínez y Gutiérrez (2004) por su parte propusieron un traspaso hacia una “Economía Regional Especializada” para la región pampeana, haciendo hincapié en la explotación de ciertas especies de mamíferos, como el guanaco, y una continuidad tecnológica desde el Holoceno Temprano, debido a las extinciones de algunas especies de megafauna. También para algunas regiones de Patagonia el Holoceno Medio es considerado como de “Consolidación Territorial”, aunque para regiones como el Canal de Beagle o la Isla Grande de Tierra del Fuego puede ser un periodo de ocupación inicial (Miotti y Salemme, 2004). Estas diferencias regionales podrían ser causadas por fenómenos ambientales ocurridos en cada área.

En este periodo aparecen los primeros registros arqueológicos en la Costa Atlántica. El sitio más temprano registrado es Arroyo Verde 1, costa de Río Negro, con un fechado de 7.400 años cal AP (Favier Dubois, 2013), pero en general las ocupaciones comienzan a partir de los 6.000-5.000 años cal AP. Se ha detectado en el curso inferior del Río Colorado ocupaciones humanas débiles desde los 5.600 años cal AP, volviéndose más intensas a partir de los 3.200 años cal AP. Los análisis isotópicos realizados han demostrado una dieta combinada con recursos terrestres y peces, lo que implicaría posiblemente circuitos de movilidad que incluían sectores de diferentes nichos ecológicos (Martínez, 2008-2009; Martínez *et al.*, 2009 y 2013). Las investigaciones arqueológicas han demostrado que dichas poblaciones tendrían una adaptación marítima muy marcada hasta por lo menos los 1.500 años cal AP, momento en el cual tenderían a incorporar recursos terrestres (Favier Dubois *et al.* 2009). La costa de Chubut posee una temporalidad de ocupación cercana a los 6.000 años AP, representada por el sitio Cabo Tres Puntas 1, Golfo de San Jorge, el cual evidencia el consumo de recursos marinos (Gómez Otero *et al.*, 1998).

El sector Norpatagónico andino registra sitios tempranos en donde las ocupaciones demuestran flujo entre poblaciones de ambos lados de la cordillera y con sectores de la estepa desde momentos muy tempranos, presentándose a partir del Holoceno Medio señales discontinuas y al parecer estacionales. Para la Provincia de Neuquén Barberena *et al.* (2015) propuso que la discontinuidad ocupacional de los sectores norpatagónicos andinos se explicaría por la ausencia de adaptaciones al bosque, habiéndose utilizado durante los periodos más secos.

1.2.1.3 del Holoceno Tardío

Luego de un largo proceso de colonización y adaptación, hacia el Holoceno Tardío (3.000 a 250 años AP aprox.) (Martinez *et al.*, 2013) se evidenció mayor variabilidad en los patrones de asentamiento dependiendo de la zona climática que ocupaban las poblaciones, y junto con ello comenzaron a emerger diferentes estilos de vida y dietas (Borrero, 1999; Aschero, 2000; Perez, 2011). Luego de un periodo húmedo, se incrementó la aridez en algunas regiones entre 1.150 – 600 años AP, durante la llamada Anomalía Climática Medieval (ACM), con variaciones en la temperatura y en el grado de humedad (Morales *et al.*, 2009).

Los grupos incorporaron de manera diferencial gran cantidad de nuevas tecnologías, como la cerámica, el arco y flecha y la agricultura, (Perez, 2011). Además, presentaban una subsistencia diversificada con explotación de un amplio espectro de recursos terrestres, fluviales y marinos, dependiendo de la región, con intensificación sobre alguno de ellos (Stoessel y Martinez, 2014). Según lo propuesto por Morales *et al.*, (2009). Los estilos de vida que llevaban los diferentes grupos humanos, están determinados por el ambiente y la disponibilidad de recursos. Si bien estos factores no afectaban directamente la organización social de los grupos humanos, marcaban los límites dentro de los cuales se desarrollaron y aplicaron diferentes estrategias sociales.

Noroeste Argentino

La agricultura y domesticación de animales se dio principalmente en la región norandina del actual territorio argentino donde se empezaron a conformar aldeas más tempranamente que en el sur donde todavía predominaba un modo de vida cazador-recolector que se extendió casi hasta tiempos prehispánicos (Perez, 2011).

Durante el Formativo el tráfico de caravanas asumió un importante rol, el cual fue aumentando hacia el periodo de Desarrollos Regionales, facilitando la obtención e intercambio de recursos (Tarragó 1984, Nielsen 2000; Albeck, 2003; Torres-Rouff *et al.* 2012). La ubicación de las comunidades agrarias del NOA en puntos estratégicos del gradiente andino, o en el cruce de antiguos caminos, les habría permitido aprovechar los productos de los distintos pisos (ganadería en altura y cultivos en los valles fluviales), así como la participación en el intercambio de bienes con aldeas próximas o grupos humanos que se encontraban a largas distancias (Tarragó, 2002).

Los antecedentes arqueológicos del NOA indican que esta región recibió influencias en diferentes momentos y de magnitud variable desde el sur de Perú, el altiplano boliviano (con influencias Tiwanacu) y la floresta tropical (González y Pérez 1972; Berenguer y Dauelsberg 1989; Rivera 1991). Se ha señalado que la Quebrada de Humahuaca habría sido utilizada como un corredor para el transporte de bienes conectando la región andina de altura, con las regiones más selváticas hacia el sudeste, como valles, yungas y planicies chaqueñas (Cocilovo *et al.*, 2001).

La actividad agropastoril tuvo su apogeo en el periodo de Desarrollos Regionales con una economía basada en *Lama guanicoe* (guanaco), siendo la zona de Casabindo-Doncellas la de mayor desarrollo (Albeck. 2003). Este periodo se caracterizó por la conformación de sociedades pre-estatales jerarquizadas, gracias al crecimiento demográfico, a esa intensificación de la actividad agropastoril y a la especialización artesanal (Tarragó, 2002).

Según Krapovickas (1983) el análisis de fuentes etno-históricas indica que durante el periodo Hispano- Indígena, la Puna jujeña estuvo habitada por grupos étnicos como los Chichas, los Casabindos, los Cochinos y los Apatamas (Albeck, 2007).

Región Pampeana

En la Región Pampeana hacia fines del Holoceno Medio y sobre todo en el Tardío, las vías de interacción se daban en un sentido amplio en el eje este – oeste, a diferencia del poblamiento inicial donde predominaba el vector norte – sur (Berón, 2007). Durante este periodo, especialmente hacia el final (1000 a 250 años AP), se presentaba una intensa dinámica poblacional acompañada de un complejo panorama de contactos interétnicos entre grupos locales, extra-regionales y trasandinos (Berón 2004; Martínez, 2008-2009).

Barrientos y Perez (2004) basándose en patrones morfométricos craneofaciales e información arqueológica, plantearon un posible reemplazo poblacional de las poblaciones del sudeste de la Región Pampeana, por poblaciones que provenían de Norpatagonia (sector inferior de la cuenca de los Ríos Colorado y Negro, y costa sur pampeana) o desde el Río Chubut. En este sentido los autores hacen referencia a que las dinámicas poblacionales observadas para la región serían producto de expansión y retracción de las mismas, tanto en sentido geográfico como demográfico, y podrían incluir extinciones locales y relocalizaciones. Sin embargo, según lo propuesto por Martínez (2008-2009), no necesariamente las poblaciones del sudeste pampeano tienen que haberse extinguido sino que podrían haber interactuado con las norpatagónicas.

Patagonia

La complejización de los asentamientos para este periodo se evidenció en la presencia de entierros primarios y secundarios aislados (en algunos casos

múltiples), en sitios específicos para la inhumación o asociados a sitios residenciales, además de la presencia de “Chenques” en algunas zonas de la región patagónica (Goñi y Barrientos, 2004; Gómez Otero, 2006; Bernal, 2008; Martínez, 2008-2009).

El gran número de registros arqueológicos del Holoceno Tardío permite inferir que los movimientos poblacionales de ese periodo, dados posiblemente por anomalías hidrológicas luego de la ACM, fueron en varias direcciones (norte, sur, etc.) sugiriendo un escenario más complejo que el planteado en sentido unidireccional de norte a sur o desde el sur hacia algunas regiones del centro del actual territorio argentino (Martínez, 1999; Béguelin *et al.*, 2006; Motti, 2012). Los grupos asentados en Norpatagónia habrían estado en contacto con grupos del centro y sur de Chile, sur de Neuquén, Cuyo y según lo propuesto, con la Región Pampeana, por lo que puede ser considerada una zona de transición entre las sociedades agricultoras del norte y los cazadores-recolectores del sur de la actual Argentina (Neme y Gil, 2005; Bernal, 2008).

La evidencia de intercambio a ambos lados de la cordillera es anterior al periodo de contacto, al menos 1.000 o 1.500 años AP, con cerámica de tipo Valdivia y Pitrén en sitios de la Pampa (Berón, 1999). Productos ya manufacturados y diferentes tipos de obsidiana encontradas en sitios con más de 900 km de distancia del lugar de origen también dan evidencia de la alta movilidad de los grupos de este periodo (Bernal, 2008). Pero para el periodo de contacto, la relación con el actual territorio chileno podría deberse a la entrada de grupos araucanos a la región, conocido como “proceso de araucanización” (Casamiquela, 1990).

1.2.2 Abordaje del poblamiento de Sudamérica desde la evidencia molecular

Desde una perspectiva bioantropológica, para Sudamérica aún no hay un consenso acerca del modo de poblamiento. Pueden haber sucedido dos posibles

escenarios: El grupo que se expandió desde el norte sólo pudo haber progresado en el lado costero de los Andes posiblemente mediante el uso de canoas y luego haber cruzado la Cordillera en diferentes latitudes (Bodner *et al.*, 2012). La otra alternativa propone que se pudo haber dado una separación de la población en el norte de Sudamérica, resultando en dos grupos poblacionales separados, uno costero y el otro continental (Rothhammer y Dillehay, 2009). Estas hipótesis serán ampliadas a continuación.

Díaz-Matallán y Martínez-Cruzado (2010) propusieron que las migraciones no sólo fueron desde Centroamérica hacia el sur, sino que durante el Holoceno Medio y Tardío, las migraciones podrían haber ocurrido también en sentido opuesto, según evidencias de estudios de linajes maternos en poblaciones modernas.

Varios estudios genéticos, utilizando marcadores autosómicos, del cromosoma Y y del ADN mitocondrial, así como investigaciones en craneometría y estudios lingüísticos, apoyan la hipótesis de una división temprana en una población andina y en una población probablemente menos diversa que habría ingresado al continente, con intercambio limitado entre ellas (Cavalli-Sforza *et al.*, 1994; Rothhammer *et al.*, 2001; Bodner *et al.*, 2012).

Otros modelos proponen múltiples migraciones separadas desde el norte hacia Sudamérica con diferentes patrones de dispersión (Lewis *et al.*, 2007). Las poblaciones andinas actuales exhiben una gran diversidad, mostrando señales de expansión, un gran tamaño poblacional efectivo, y una baja diferenciación (Motti *et al.*, 2014). Por el contrario, las poblaciones del este poseen una baja diversidad, una gran diferenciación y signos de cuellos de botella y/o un tamaño poblacional efectivo reducido durante la expansión, sugiriendo así que la acción de la deriva génica y el flujo génico fue diferencial en ambas regiones (Wang *et al.*, 2007; Lewis, 2010).

Rothhammer y Dillehay (2009) propusieron un esquema sobre la posible dispersión humana en América del Sur, a partir de la recopilación de evidencia bioantropológica y arqueológica. Los cazadores-recolectores habrían llegado a

estas tierras atravesando el Istmo de Panamá, hacia la tierra alta de los Andes abriéndose paso, como se mencionó anteriormente, a través de los valles de los Ríos Cauca y Magdalena. Una vez adaptados a este clima, podrían haber existido barreras que impedían continuar su migración más al sur, por lo que un grupo pudo haber migrado hacia el este siguiendo la costa caribeña de Venezuela, las Guyanas y noreste de Brasil. Otro grupo podría haber llegado al interior de Venezuela y luego desplazarse hacia el sureste y/o sudoeste por varios sistemas de ríos hasta la cuenca amazónica. Por otro lado, también podrían haber migrado por la costa pacífica hacia Chile. Desde los Andes podrían haber migrado hacia el este de Brasil y siguiendo otro camino hacia la Pampa y la Patagonia. Por lo tanto, las poblaciones a los dos lados de la Cordillera, en Chile y Argentina, pudieron haber tenido una relación más cercana entre ellas que con aquellas de la misma latitud. Además proponen que la cuenca amazónica podría haber funcionado como una barrera natural para el flujo génico en sentido norte- sur, con lo que las poblaciones al norte de la misma tendrían su origen en la vía de poblamiento por las costas de Venezuela y las que se encuentran al sur, provendrían de migraciones por dentro del continente, o desde el sur por Argentina.

Sin embargo, a partir de análisis genéticos de comunidades originarias actuales se ha postulado un escenario diferente al anteriormente mencionado. Los resultados presentados por de Saint Pierre *et al.* (2012) indican que las poblaciones nativas al sur del paralelo 40° tanto en Chile como en Argentina comparten un origen común y pertenecen al mismo sustrato poblacional. Además no han encontrado evidencia genética que demuestre que la ruta por la ladera este de la Cordillera de Los Andes, propuesta por Rothhammer y Dillehay haya llegado a Patagonia. Por lo tanto, proponen que la Patagonia ha sido poblada por migrantes que seguían la ruta pacífica. Una vez que llegaron a las cercanías de Monte Verde en Chile, no pudieron avanzar hacia el sur, posiblemente por la presencia de glaciares que cubrían la mayor parte de la costa pacífica; entonces pudieron haber cruzado Los Andes y continuar hacia el sur por la ladera oriental. El flujo migratorio, por ende, pudo haber sido en esta región de oeste a este más que en sentido norte a sur. Por último propusieron que las poblaciones habrían quedado aisladas con un débil intercambio genético con poblaciones localizadas

más al norte, por lo menos hasta la llegada de los europeos, también propuesto desde la evidencia arqueológica.

A través del análisis de secuencias de la HVR I Fehren-Schmitz *et al.* (2011) plantearon un escenario en el cual la población fundadora después de haber pasado el Istmo de Panamá, se habría dividido en por lo menos dos subpoblaciones. Una de ellas migró directamente hacia el sur, a lo largo de la costa pacífica hasta el extremo sur de Sudamérica, continuando con la idea de Rothhammer y Dillehay, mientras que el segundo grupo se extendió primero hacia la llanura amazónica, vía la costa norte de Sudamérica (Wang *et al.*, 2007) o a lo largo de las estribaciones orientales de los Andes y, luego, pobló las serranías andinas desde el este. No obstante, este escenario no puede ser probado estadísticamente en la actualidad, por lo que son necesarios mayor cantidad de datos de diferentes marcadores moleculares.

Capítulo 2: Estudio de las poblaciones Prehispánicas de Argentina desde la Arqueogenética: Marcadores moleculares y ADN

2.1 Marcadores moleculares utilizados en genética de poblaciones

En el estudio de poblaciones humanas tanto actuales como antiguas los datos biológicos más importantes son aquellos que aportan información sobre ancestros comunes, sobre la expansión, contracción y remplazo de poblaciones y sobre los procesos microevolutivos que pueden actuar en una población como el flujo genético o la deriva génica.

Dentro de la Bioantropología además de la morfometría craneal y dental, otro tipo de marcadores utilizados fueron los serológicos como los grupos sanguíneos (sistema ABO, Diego y RH) (Cavalli-Sforza *et al.*, 1994), las inmunoglobulinas (sistema Gm y KM) (Goicoechea *et al.*, 2001; Carnese *et al.*, 2003) y los antígenos leucocitarios. Estos marcadores revelaron la existencia de una jerarquía en la distribución de los alelos que los definen. Algunos de ellos poseen una amplia distribución dentro de un continente (Smith *et al.*, 2000), mientras que otros sólo están presentes en grupos reducidos o etnias. Para lo que respecta al continente americano hay marcadores compartidos entre “mongoloides” de Asia y amerindios como el DI*A del sistema sanguíneo Diego (Castro de Guerra, 1997). Otro marcador como la hemoglobina S (variante producida por un cambio conformacional en un aminoácido de la cadena de la hemoglobina A debido a una mutación en su secuencia) permitió inferir el aporte de poblaciones africanas y de ciertas regiones de Europa al pool génico de los amerindios actuales (Rodríguez Romero *et al.*, 1998). Algunos de estos marcadores se pudieron implementar en el estudio de restos esqueléticos humanos, pero la falta de reproducibilidad de los mismos y las posibles contaminaciones con antígenos de plantas y bacterias (Salaberry *et al.*, 1999) generaron gran controversia sobre su uso y factibilidad.

Recién con el advenimiento de nuevas técnicas moleculares pudieron detectarse variantes específicas directamente a nivel del ADN, denominados marcadores moleculares. Estos a diferencia de los anteriores permiten estimar variaciones no observables a nivel fenotípico. *“El empleo de marcadores moleculares para estudiar el origen y evolución de la diversidad biológica de*

nuestra especie distingue a la Antropología Molecular como una sub-disciplina dentro de la Antropología Biológica” (Bravi, 2007).

La mayoría de estos marcadores moleculares se encuentran ubicados en la región no codificante del ADN tanto nuclear como mitocondrial. Es por ello que al no generar cambios en la expresión de proteínas y otros productos biológicos, presentan un gran número de variantes. También existen modificaciones dentro de la región control, algunas de las cuales pueden ser silenciosas y no generan cambios en la secuencia de aminoácidos, también utilizadas para la caracterización de variantes poblacionales (Lodish *et al.*, 2005).

“Se entiende por marcador molecular a toda molécula, o fracción de molécula, que es polimórfica dentro de una población, especie, o taxón de categoría superior. En Genética de Poblaciones se acepta que un marcador molecular es polimórfico cuando presenta al menos dos formas distinguibles, llamadas alelos, y cuando el menos común de ellos tiene una frecuencia igual o mayor al 1 % en una población dada” (Bravi, 2007). Si alguna variante aparece en un porcentaje menor se lo considera una mutación rara y se pone a prueba para comprobar si es específica de una población, de una familia o propia de un individuo.

Los marcadores genéticos son variables, polimórficos y en su análisis se basa la posibilidad de diferenciar individuos y establecer vínculos biológicos de parentesco. Los diferentes tipos se clasifican según la capacidad de detectar la variabilidad, la cual puede resultar de la diferencia en la longitud de los fragmentos de ADN o, por cambios en su secuencia nucleotídica (Simpson, 1997). En función de estas características se pueden clasificar los diferentes tipos de detección de polimorfismos.

2.1.1 Tipos de marcadores más comúnmente utilizados en genética de poblaciones

- *Minisatélites o Número variable de repeticiones en tándem (VNTRs, por sus siglas en inglés)*: son secuencias no codificantes e hipervariables del ADN de entre 6 y 25 pares de bases (pb) repetidas en número variable. Se generan así gran cantidad de alelos diferentes, con un alto porcentaje de heterocigosis. Generalmente están ubicadas en regiones centroméricas y teloméricas de los cromosomas. Los sitios de restricción de las enzimas se encuentran flanqueando los VNTRs, lo que fue notado ya por Wyman y White en 1980 (Lodish *et al.*, 2005).

- *Microsatélites o Repeticiones simples en tándem (STRs por sus siglas en inglés)*: consisten en secuencias pequeñas altamente variables en tamaño entre y dentro de individuos, con hasta 6 nucleótidos repetidos que se encuentran en los genomas de todos los eucariotas. Son mucho más polimórficos que los minisatélites. La variación se manifiesta normalmente como diferencias en longitud entre los distintos alelos del mismo locus. Estos marcadores presentan la ventaja de estar distribuidos al azar en la región codificante, intrónes y región intergénica. (Ellegren, 2004).

- *INDELS*: polimorfismos de inserciones o deleciones de ciertas cantidades de pares de bases. Representan entre el 18 y el 25% de sitios variables dentro del genoma humano (Mills *et al.*, 2006; Mullaney *et al.*, 2010)

- *SNPs, Polimorfismos de Nucleótido Simple*: se basan en la identificación de la sustitución de un nucleótido por otro en el ADN. La detección de estos cambios dados por mutaciones puede llevarse a cabo por diferentes técnicas como RFLPs (Polimorfismos en el Largo de los Fragmentos de Restricción), APLPs (Polimorfismo en el largo de los Fragmentos de Amplificación), la

secuenciación del genoma nuclear o mitocondrial o secuenciación de parte de éstos, o puede realizarse a través de Arrays³ o chips de base sólida.

2.1.2 Marcadores biparentales y uniparentales

Se denominan marcadores biparentales a aquellos que se heredan de ambos padres siguiendo un patrón mendeliano. Entre ellos los más utilizados en estudios genéticos poblacionales son: los grupos sanguíneos, STRs autosómicos, sistema HLA (genes de antígenos leucocitarios humanos del complejo mayor de histocompatibilidad) y SNPs autosómicos. La amelogenina, marcador utilizado para la determinación del sexo, podría incluirse en este grupo debido a que cada individuo recibe un cromosoma sexual de cada uno de sus progenitores y eso definirá el patrón diferencial mencionado.

El gen de la amelogenina codifica para una proteína que regula la producción del esmalte dental. Es dimórfico, en el cromosoma Y presenta 6 pares de bases más, por lo cual permite la determinación del sexo. Se encuentra localizado en la Xp22.3- p22.1 del cromosoma X y en la Yp11.2 del cromosoma Y.

Por el contrario, los marcadores uniparentales son aquellos que se heredan exclusivamente de alguno de sus progenitores, ya que no están sujetos al proceso de recombinación. Los más conocidos son:

- La región no recombinante del cromosoma Y que es transmitida únicamente por el padre a toda su descendencia masculina (SRY). Se encuentra ubicada en la porción más distal del brazo corto del cromosoma Y (Yp). Este marcador es importante para la reconstrucción de la filogenia de los linajes masculinos de una población ya que presenta características especiales tales como poseer una rápida tasa de mutación, no recombinar con su porción homóloga en el cromosoma X y transmitirse en bloque como un grupo de ligamiento del

³El microarray es un arreglo o chip de cientos a millones de secuencias de ADN inmovilizadas y ordenadas en forma de matriz adheridas a una superficie sólida. Cada secuencia puede ser un gen diferente. (Moreno y Solé, 2004).

padre a todos sus descendientes varones. Estos linajes están caracterizados por la combinación de STRs y SNPs de esa región (Bianchi *et al.*, 1997) En los estudios sobre poblaciones sudamericanas se observó que más del 90% de los varones amerindios poseían el linaje denominado Q1a3a (Geppert *et al.*, 2011).

- El ADN mitocondrial que se transmite por línea materna solamente. Este último por ser el marcador por excelencia más utilizado en estudios con ADN se describirá más detalladamente en el apartado siguiente.

2.1.3 Aplicación de los marcadores moleculares en estudios de genética de poblaciones

Son varias las fuentes de ADN donde pueden detectarse los marcadores descriptos dependiendo el tipo de organismo a analizar, como por ejemplo, el ADN nuclear, el ADN contenido en los cloroplastos de las plantas, en las mitocondrias (ADNmt) y en los ribosomas. Del ADN nuclear se desprenden los marcadores biparentales como los STRs utilizados en los análisis forenses (Corach *et al.*, 2010), y los marcadores uniparentales masculinos del SRY. Este último junto al ADN mitocondrial son especialmente importantes para el estudio de la historia filogeográfica y de la estructura genética de una población. También permiten inferir cambios demográficos y de dispersión entre especies (Alcántara, 2007).

A partir de los resultados obtenidos en diferentes disciplinas como la biología del desarrollo, la biología molecular y la ecología de poblaciones, se ha demostrado que los marcadores moleculares utilizados en el ADNmt y la SRY, constituyen una excelente fuente de información para el estudio de la historia evolutiva (Perez *et al.*, 2007). El ADNmt de gran importancia en esta tesis doctoral será descripto detalladamente en el apartado a continuación.

Tanto el ADNmt como la SRY poseen una serie de marcadores moleculares diferentes que permiten definir linajes genéticos específicos maternos y paternos respectivamente. Analizando las variaciones en las secuencias de estas dos porciones del genoma humano se pueden identificar los diversos linajes presentes

en cada una de las poblaciones y estimar la manera en la cual se distribuyeron en los continentes. Por otra parte, midiendo la variación acumulada en cada linaje se puede calcular el tiempo aproximado de divergencia de su ancestro más cercano, y así saber cuál fue su origen geográfico y la relación que presenta con otros linajes.

2.2 El ADN Mitocondrial. Marcador uniparental preferencial en genética de poblaciones antiguas

Desde el primer análisis detallado realizado por Brown (1980) el ADNmt ha sido el marcador más utilizado para el estudio de las migraciones y el proceso poblamiento del género Homo, dado que presenta características únicas y particularmente adecuadas para el abordaje de este objetivo.

El análisis de la historia de los linajes, grupos relacionados de secuencias que están definidas por compartir mutaciones y que muestran posiblemente especificidad regional (esta información se amplía en el siguiente capítulo), puede emplearse para tratar de reconstruir la historia de las poblaciones humanas, tanto a una escala acotada en tiempo y espacio, como de la misma evolución de nuestra especie.

El notable aumento en los estudios de ADNmt es consecuencia tanto de los avances técnicos como del interés que despiertan las características de esta molécula que la hacen particularmente interesante para estudios evolutivos, forenses y de genética de poblaciones, tanto en poblaciones antiguas como actuales. Dependiendo de la antigüedad de la muestra estudiada, generalmente solo esta molécula está presente, por lo tanto en muchos casos es la única evidencia que se puede utilizar.

En este capítulo se presentan las características de la mitocondria, la estructura genómica y las características del ADNmt, las técnicas para el análisis del ADNmt y las áreas del conocimiento en las que se emplea esta evidencia.

2.2.1 Teorías sobre el origen de las mitocondrias

Desde 1918, a partir de las investigaciones de Portier sobre el origen de las mitocondrias (Nass *et al.*, 1965), numerosos autores han adherido a la hipótesis de la simbiosis intracelular hereditaria como mecanismo principal por el cual se habrían originado diferentes organismos complejos a partir de formas de vida libre. Correspondió a Margulis (1970) proponer una versión moderna conocida como Teoría Endosimbionte, según la cual habría existido una célula eucariota primigenia con una forma de vida predadora, alimentándose de otras células. Se cree que las mitocondrias se originaron a partir de eubacterias libres metabolizadoras de oxígeno. Al eludir la digestión, estos organoides establecieron una relación simbiótica con la célula que los capturó, recibiendo refugio y alimentación en compensación por la generación de energía que producirían para sus huéspedes (Alberts *et al.*, 2004).

Apoyando a esta teoría, Andersson *et al.* (1998) observaron que las mitocondrias tienen un tamaño parecido al de las bacterias más pequeñas (género *Rickettsia*) y, como ellas, contienen su propio genoma en forma de una molécula circular de ADN, sus propios ribosomas, y sus propios ARNs de transferencia. Además, determinaron que existen más de 150 proteínas mitocondriales codificadas en el núcleo celular, que comparten homología con la secuencia de las proteínas de *Rickettsia prowazekii*. Éstas están involucradas en la producción y transporte de ATP (Adenosin Trifosfato, molécula primordial de transporte de energía en la célula), para los complejos de la cadena respiratoria, complejo de la ATP sintetasa y de la ATP/ADP translocasa. Estos hallazgos también fueron respaldados por el descubrimiento de la sensibilidad de la síntesis proteica mitocondrial y de *Rickettsia* a ciertos antibióticos como cloranfenicol, eritromicina o tetraciclina, y el uso de formil-metionina como aminoácido inicial en la traducción (Lane, 2014).

Las mitocondrias pueden ser observadas al microscopio óptico y varían su forma y tamaño dependiendo del tipo de célula y el estado metabólico en el que se encuentran. Generalmente, son elipsoides con un diámetro de 0,5 μm

aproximadamente y 10 μm de largo. Su cantidad depende de la función de la célula huésped (Álvarez Iglesias, 2008).

2.2.2 Estructura genómica del ADNmt

Las mitocondrias presentan un genoma circular de doble cadena que en nuestra especie posee 16.569 pares de bases (pb) y codifica sólo algunas proteínas mitocondriales, siendo el resto codificadas por el ADN nuclear. Dado que existe una distribución diferencial de guanina y citosina entre ambas cadenas, se denomina cadena H (del inglés Heavy) a la que posee mayor cantidad de guanina y L (ligera o light) a la que posee mayor porcentaje de citosina. La mayor parte de las secuencias codificantes se encuentra en la cadena H (Alberts *et al.*, 2004).

En el ADNmt los genes no están interrumpidos por intrones, algunas de las secuencias codificantes de polipéptidos superponen sus marcos de lectura (Alberts *et al.*, 2004) y, en muchos casos, parte de los codones de terminación no están presentes en este genoma, siendo generados post-transcripcionalmente por poli-adenilación de los ARN mensajeros. Esta molécula contiene la información para 37 genes: 2rRNA (ARN ribosomales 12S y 16S), 22tRNA (ARN de transferencia) y 13 genes estructurales, relacionados con los complejos enzimáticos del sistema de fosforilación oxidativa: 3 subunidades de la citocromo C-oxidasa (COI, II y III), 1 subunidad de la citocromo C óxido-reductasa, 7 subunidades del complejo NADH deshidrogenasa y 2 subunidades del complejo ATP sintetasa.

2.2.2.1 Región no codificante del ADNmt

De las diferentes regiones del ADNmt, la región Control ha sido la más utilizada en las investigaciones de genética de poblaciones, sobre todo para el poblamiento Americano, tema principal de esta tesis. Como se mencionó

anteriormente, prácticamente no existen posiciones no codificantes, con la excepción de origen de replicación de la cadena liviana y las regiones Control y V. La mayoría de los genes están yuxtapuestos o separados por una o unas pocas bases no codificantes.

La región V posee una secuencia básica de 9 pares de bases (5'-CCCCCTCTA-3') que puede presentarse como copia única o bien repetida en tándem a la altura de las 8.272-8.289 pb de la secuencia mitocondrial.

La región control o también conocida como D-Loop, ocupa 1.122 pb. En ella se localiza el origen de replicación de la cadena H, los promotores para la transcripción de las dos hebras, lugares de unión de factores de transcripción, tres bloques de secuencias conservados asociados con el inicio de la replicación y las secuencias asociadas a la terminación de cadenas. Esta secuencia se extiende en forma continua entre las posiciones 16024-16569 y 1-576 (Fig. 8). Dicha numeración se debe a que la primera secuencia humana completa, conocida como la Secuencia de Referencia de Cambridge (SRC), comienza dentro de la región control (Anderson *et al.* 1981). Luego ésta fue corregida ya que presentaba 4 errores y 7 polimorfismos poco comunes. La nueva versión fue obtenida por Andrews *et al.* (1999) pero la numeración se mantuvo.

Vigilant *et al.* (1989) en un estudio de secuenciación completa de la Región Control realizado en 21 muestras humanas de diferentes continentes lograron mapear la distribución de los sitios polimórficos y determinaron que en dos fragmentos (~400 pb) se concentraban el 92% de las posiciones variables. Los denominaron Región Hipervariable I y II (HVR I y HVR II). Los límites para estas regiones no están establecidos rígidamente sino que varían según los autores. Usualmente, la HVR I es informada entre las posiciones 16024 y 16569 mientras que la HVR II entre 1 y 576, aunque otros autores proponen a la HVR I entre las posiciones 16024- 16365 y a la HVR II entre 73 y 340 (Bravi, 2004).

- Poliplasmía o elevado número de copias

Una célula eucariota posee varias mitocondrias, las cuales contienen a su vez varias copias de ADNmt dependiendo de la especie y del tejido en estudio (Ballard y Whitlock, 2004). Por otra parte, en una muestra de nueve oocitos provenientes de cinco mujeres, Chen *et al.* (1995) estimaron la presencia de entre 80.000 y 290.000 moléculas, con una media de 138.000 por célula. Esta propiedad facilita la obtención de material genético para su análisis, sobre todo en muestras arqueológicas o forenses donde puede existir una degradación importante.

- Herencia estrictamente materna

En la enorme mayoría de los animales sólo las gametas femeninas (oocitos) contribuyen con sus mitocondrias al embrión en desarrollo, con lo cual todo el ADNmt es heredado por vía materna (Giles *et al.*, 1980; Stoneking y Soodyall, 1996; Wallace *et al.* 1999), con escasas excepciones, como en los mejillones *Mytilus galloprovincialis*; y en algunas especies de *Drosophila* (Ballard y Whitlock, 2004). Varios estudios documentaron que el ADNmt era transmitido en forma uniparental en los vertebrados (Hayashi *et al.*, 1978). Correspondió a Wallace y colaboradores (Giles *et al.*, 1980; Case y Wallace, 1981) demostrar la herencia estrictamente materna en humanos, aunque Schwartz y Vissing (2002) publicaron un controvertido caso donde un hombre poseía en el tejido muscular ADNmt paterno. Sin embargo, otro estudio desarrollado por el mismo equipo de investigación sobre pacientes con miopatías mitocondriales no presentó evidencias de herencia paterna refutando su primer trabajo (Schwartz y Vissing, 2004).

No se conocen todavía exhaustivamente los mecanismos moleculares por los cuales se da este tipo de herencia. Algunos estudios explicaban la falta de ADNmt paterno como consecuencia de la no incorporación de la pieza media del espermatozoide dentro del oocito (Ankel-Simons y Cummings, 1996) pero se ha detectado ADNmt paterno en embriones humanos tempranos en estadio cercano a 8 blastómeros, al tercer día luego de la fecundación (St.John *et al.*, 2000). En

otras investigaciones se encontró que las mitocondrias paternas son aparentemente destruidas por un mecanismo activo implicado en la ubiquitinación⁴ residente en el citoplasma del oocito y de gran especificidad (Sutovsky *et al.*, 2000), o como se demostró para *Drosophila*, donde las mitocondrias de las células sexuales del macho carecen de ADN (De Luca y O` Farrell, 2012). Otra explicación que se ha propuesto consistía en la diferencia, en la mayoría de los mamíferos, del número de moléculas de ADNmt de origen materno y paterno en una proporción de 20.000-100.000 aproximadamente contra 50 a 70, respectivamente, generando un efecto de “dilución” (Ankel-Simons y Cummings 1996).

En los últimos años se ha cuestionado la transmisión estrictamente materna de este genoma, por lo que se han reportado varios estudios que proponen recombinación in vivo de ADNmts en humanos (Hagelberg, 2003; Manfredi *et al.*, 2004; Bandelt *et al.*, 2005). No obstante, la metodología empleada podría crear artefactos que pueden llevar a resultados erróneos o de difícil replicación. Por tanto, parecería hasta el momento no haber razones para cuestionar el dogma tradicional de la herencia estrictamente materna, aunque el debate continúa. Este modo uniparental de herencia es una de las ventajas más significativas, ya que permite a los investigadores trazar líneas hacia el pasado de parentesco materno, determinar la ancestría materna de una población en particular, sin los efectos confusos que presentan los marcadores de herencia biparental (Pakendorf y Stoneking, 2005).

- Ausencia de recombinación

Awadalla *et al.* (1999) plantearon la existencia de recombinación en humanos, basándose en la presencia de homoplasmías⁵ y desequilibrio de

⁴Proceso por el cual se marca una proteína con una molécula que se une en forma covalente a los residuos de lisina de la misma, haciendo que sea degradada por un proteosoma, o puede alterar la función de la proteína, o hacer que una proteína de membrana sea enviada hacia los lisosomas (Lodish *et al.*, 2005)

⁵Esto hace referencia a que todas las copias de ADNmt que posee un individuo son idénticas.

ligamiento. Estos estudios fueron rápidamente desestimados, argumentándose que la información que utilizaban era deficiente, los alineamientos de las secuencias eran erróneos y/o utilizaban métodos estadísticos cuestionables (Kivisild y Villems, 2000; Pakendorf y Stoneking, 2005). Un estudio posterior sobre la correlación entre el desequilibrio de ligamiento y la distancia logró demostrar que el ADNmt no sufre recombinación, y la presencia de variantes en un individuo se debería a tasas de mutación heteróneas del ADNmt (Stoneking, 2000).

- Tasa de sustitución

No todas las partes del genoma mitocondrial evolucionan a la misma velocidad. La zona que muta con una tasa mayor es la región no codificante, más precisamente la región control (D-loop) (Witas *et al.* 2004). La tasa de mutación del ADNmt con un promedio de $0,017 \times 10^{-6}$ sustituciones por sitio por año, resulta ser de un orden de magnitud (~ 10 veces) más elevada que el del ADN nuclear (Ingman *et al.*, 2000; Pakendorf y Stoneking, 2005). Esto, sin tener en cuenta la región control, ya que la tasa de mutación de la HVR es aún más elevada, como se describirá a continuación.

Se han reportado dos métodos distintos para estimar la tasa de sustitución del ADNmt humano. El primero en ser desarrollado fue el llamado método filogenético, que consiste en la construcción de árboles filogenéticos utilizando secuencias mitocondriales de un grupo de individuos, a partir del cual se estima el número de sustituciones acumuladas. Para la datación del árbol luego se utiliza una fuente independiente de información (ej: la separación de los clados *Homo* y *Pan*, o un cuello de botella poblacional, o el poblamiento inicial de un área previamente deshabitada), permitiendo derivar la tasa de divergencia antes mencionada (Bravi, 2004; Pakendorf y Stoneking, 2005).

El otro método, denominado genealógico o de pedigrí, intensamente utilizado en los últimos años, utiliza el conteo de las mutaciones observadas en pedigríes conocidos para la estimación de la tasa mutacional, y propone una tasa de $0,47 \times 10^{-6}$, significativamente más alta que la filogenética.

Mientras que el método filogenético ha sido aplicado tanto al análisis de los diferentes componentes del genoma mitocondrial como a la molécula completa, el del pedigrí ha sido casi exclusivamente empleado para estudiar la Región Control (Bravi, 2004). Howell *et al.* (2003) argumentaron que la diferencia entre los dos métodos de la estimación de la tasa de sustitución no tiene un efecto causal, sino que se debe a *hot spots*⁶, deriva génica, selección natural y falta de detección de mutaciones frecuentes en estudios filogenéticos.

La tasa de mutación del ADNmt puede estar directamente relacionada con el entorno que lo rodea, dado que esta molécula no está protegida por proteínas como las histonas del ADN nuclear, viéndose expuesta continuamente a los agentes oxidantes como los radicales libres⁷. Además, los sistemas genéticos de reparación de este genoma son menos eficientes que los nucleares.

Por otro lado, se comprobó la susceptibilidad de este material genético por su menor tamaño efectivo poblacional a los efectos de la deriva, por la que las mutaciones tienen alta probabilidad de fijarse (Wallace, 1999).

2.2.4 Técnicas para el estudio del ADNmt

Los primeros análisis de la variabilidad del ADNmt en humanos se basaban en la utilización de enzimas de restricción para cortar el ADN, obteniendo segmentos de longitud variable (RFLPs). En esos primeros análisis se utilizaban entre 9 y 12 enzimas que mostraban la existencia de varios sitios polimórficos estables, algunos de los cuales se heredan en conjunto (Brown, 1980; Johnson *et al.*, 1983; Schurr, 1990; Torroni *et al.*, 1992). Luego se comenzó a utilizar la

⁶Sitio en el ADN en el cual la frecuencia de mutación o recombinación es más elevada con relación a otros sitios.

⁷Los radicales libres son moléculas inestables muy reactivas. Para conseguir la estabilidad modifican las moléculas de su alrededor provocando la aparición de nuevos radicales. Atacan a los lípidos y proteínas de la membrana celular por lo que la célula no puede realizar sus funciones vitales, o atacan al DNA impidiendo que tenga lugar la replicación celular y contribuyendo al envejecimiento celular. Los procesos normales del organismo producen radicales libres como el metabolismo de los alimentos, la respiración y el ejercicio.

secuenciación del genoma mitocondrial principalmente de la región hipervariable (Andrews *et al.*, 1999). Actualmente se están desarrollando tecnologías más sofisticadas como la secuenciación de genoma completo de los individuos, tanto nuclear como mitocondrial, a través de “Next Generations Sequencing” (NGS), técnica revolucionaria en investigaciones genómicas, sobre todo en ADN_a (ADN antiguo). Se basa en generar librerías de secuencias, donde todos los fragmentos de ADN de una muestra en estudio son modificados en sus extremos para poder unirse a cebadores de secuenciación universales. Esto permite que se den en paralelo la amplificación y la secuenciación de todos los segmentos (Shapiro y Hofreiter, 2012). Sin embargo, esta última tecnología es aún muy costosa en nuestro país, como para ser utilizada en genética de poblaciones donde se necesita analizar varias muestras a la vez.

2.3 Haplogrupos mitocondriales de América

En el área de la antropología biológica, los estudios realizados sobre el genoma mitocondrial en diversas poblaciones humanas han contribuido, junto a la información aportada por otros marcadores moleculares y también por otras disciplinas como la arqueología, la lingüística, la morfometría dental y craneal, entre otras, a la interpretación y conocimiento del origen de las poblaciones, movimientos migratorios, e interacción con otros grupos humanos.

Como se mencionó en el capítulo anterior, el ADN_{mt} está presente en gran cantidad de copias en cada célula, su mayor tasa de mutación favorece a la acumulación de eventos mutacionales y por ende a la detección de los mismos. Además, se hereda por línea materna, por lo que cada descendiente posee el mismo conjunto de mutaciones. Una única versión de esa secuencia es lo que se conoce como un sistema haploide. Una determinada secuencia de bases nucleotídicas recibe el nombre de haplotipo o subhaplogrupo. Cada uno de estos puede diferenciarse de otro por un cambio de base dado por una mutación, o varias de ellas (Motti, 2012). Un conjunto de haplotipos que comparten una serie de mutaciones y que habrían estado presentes en un ancestro común conforman

un haplogrupo (Hgs). Al conjunto de Hgs relacionados se lo denomina Cluster o clado, con el linaje fundador considerado como nodo o raíz.

Por otro lado, algunos investigadores definieron a un haplogrupo o linaje como un grupo de ADNmts relacionados filogenéticamente por compartir sets específicos de RFLPs, mientras que un haplotipo es un genotipo único de ADNmt definido por análisis con RFLP. En este último caso el linaje y no el haplotipo es el que se utiliza para describir la secuencia única de HVR I en una población dada (Schurr et al., 2002; Kemp y Schurr, 2010). Una definición más integrativa es la propuesta por Raff *et al.* (2011) en la cual un haplogrupo es un grupo de ADNmts que comparten ciertos marcadores tanto de la región hipervariable como de la región codificante, y además se considera que están relacionados filogenéticamente. Para el mismo autor el término haplotipo hace referencia a diferentes sets de ADNmt dentro de un Hg que comparten una o varias características.

Cabe destacar que los Hgs determinados por RFLP en la región codificante incluyen más de un haplotipo. Éstos se definen por secuenciación de la región control o hipervariable del ADNmt, debido a la mayor velocidad de mutación que presenta dicha región (Kemp y Schurr, 2010).

A los Hgs mitocondriales se los describe con letras mayúsculas del alfabeto latino (Torrioni *et al.*, 1992; 1993; 1994; 1996; Chen *et al.*, 1995, entre otros), o mediante la combinación de letras y números (por ejemplo A2 dentro de A). Para los haplotipos o divisiones menores (clasificados según mayor cantidad de mutaciones) se alternan letras y números en el sufijo (J1a y J1b dentro de J1; J1a1 y J1a2 dentro de J1a, etc.). Como puede verse, la denominación de los haplogrupos se fueron otorgando a medida que se iban describiendo, sin poseer una organización jerarquizada que los enumere de forma lógica, siendo imposible deducir cómo están emparentados cada uno de los linajes (Fig. 9).

Se cree que el ancestro común más reciente para el ADNmt humano habría surgido hace aproximadamente 200.000 años AP (Mishmar *et al.*, 2003). La letra L fue asignada al haplogrupo presente en el continente Africano (a veces

denominado como Macrohaplogrupo, para dar cuenta de su importancia) y es el que mayor variabilidad a nivel mundial y del cual, según se estableció hasta el momento, derivan el resto de todos los linajes mitocondriales (Fig. 9). “El clado L es en realidad una parahaplogrupo debido a que no incluye a todos los descendientes de un mismo ancestro, ya que los superhaplogrupos M y N constituyen ramas derivadas del L” (Motti, 2012).

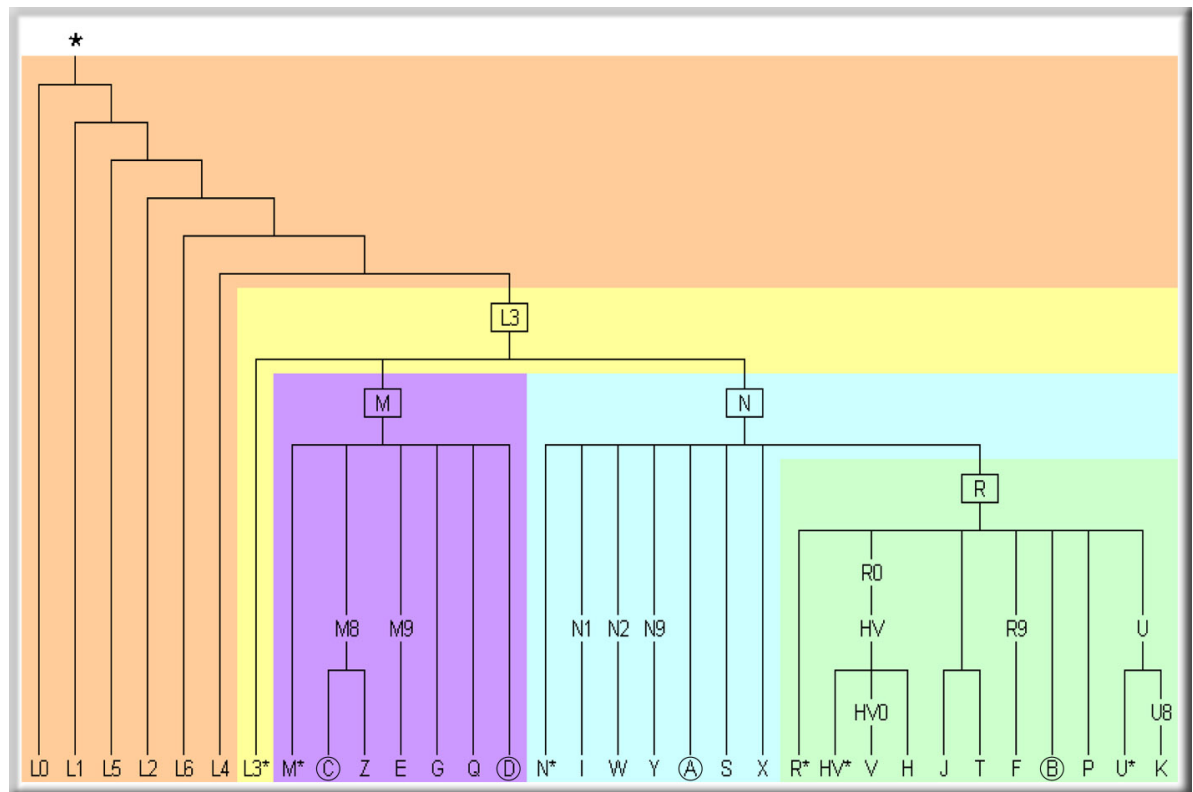


Figura 9. Filogenia del ADNmt ilustrando la letra asignada a cada linaje. Los Hgs amerindios están marcados con un círculo. Imagen tomada y modificada de van Oven y Kayser, (2008).

Bajo la teoría de la evolución “Out of Africa” se ha demostrado que todas las variantes mitocondriales no africanas tienen su origen en el haplogrupo L3. Se estimó que la primera migración fuera del continente africano tuvo lugar cerca de los 50.000 -70.000 años AP (Soares *et al.*, 2009) con poblaciones portadoras de M y N (según Mishmar *et al.*, 2003 también serían macrohaplogrupos), y de un derivado de N conocido como Hg R. Poblaciones portadoras de estos linajes

poblaron Cercano Oriente y migraron hacia Europa y Asia (Macaulay *et al.* 2005). Posteriormente, algunos de sus descendientes, como se mencionó en otro capítulo, llegaron a Beringia portando sólo 5 de los haplogrupos presentes en sus ancestros. Del M se desprenden los linajes C y D y sus variantes, y del N derivan el haplogrupo A, B y X con todos sus haplotipos (van Oven y Kayser, 2009; O'Rourke y Raff, 2010).

A continuación y luego de haber realizado una breve introducción para presentar el estado de la cuestión, se pasará a describir y revisar lo que se conoce hasta el momento de los linajes maternos y la filogeografía mitocondrial en América.

2.3.1 Historia de los haplogrupos de América

Wallace *et al.* (1985) ampliando el primer trabajo que incluía muestras de poblaciones sudamericanas de Johnson (1983), y utilizando 6 enzimas de restricción describieron a partir de las combinaciones de RFLPs diferentes "morphs" y propusieron un posible efecto fundador para la población amerindia. Ampliando el número de enzimas de restricción y confirmando el linaje C descrito en ese trabajo, Schurr *et al.* (1990) comenzaron a denominar a esos grupos de RFLPs como haplogrupos. Este estudio llevó a la conclusión de que los linajes maternos de los nativos americanos derivan de 4 linajes asiáticos, y dentro del continente la fuerza de la deriva génica, habría moldeado su distribución entre las poblaciones (Kemp y Schurr, 2010). El primer estudio en determinar los linajes maternos para poblaciones americanas tal como se los clasifica actualmente, Hgs A, B, C y D fue el de Torroni *et al.* (1992), surgiendo así el paradigma de "los cuatro linajes fundadores". Torroni *et al.* (1993 a y b) confirmaron los resultados anteriores mediante la secuenciación de la región HVR I de individuos asiáticos y americanos. Estos Hgs también fueron descritos en el mismo año por dos equipos de investigación distintos (Horai *et al.*, 1993; Ghinter *et al.*, 1993).

El haplogrupo X fue definido posteriormente y hasta el momento sólo se encuentra en América del Norte (Foster *et al.*, 1996; Brown *et al.* 1998; Wallace *et al.*, 1999). Los linajes encontrados en América (X2a y X2g) son distintos a los encontrados en Europa y Centro de Asia (X1, X2b-X2f) (Brown *et al.*, 1998).

Posteriormente Malhi *et al.* (2006) analizando tres individuos del Holoceno Medio provenientes de Norteamérica, describieron la presencia en dos muestras del macrohaplogrupo M, común en el este de Asia, pero no reportado para América hasta el momento. Estos resultados fueron de gran controversia para el modelo de los 5 Hgs fundadores (A-D y el X) propuesto a partir de estudios en poblaciones actuales y corroborado por los resultados obtenidos hasta el momento en muestras antiguas.

2.3.2 Linajes fundadores

Un Hg para ser considerado como fundador en el continente americano debe cumplir con ciertos requisitos. Primero debe estar presente en poblaciones asiáticas, ya que poseen su origen en esas poblaciones. El tiempo de coalescencia⁸ que presenta debe ser cercano al tiempo de ingreso de los humanos modernos al nuevo mundo. Además debe ser nodal o central en los análisis de filogenia poblacional debido a que la gran diversidad de haplotipos debe derivar del mismo. Por último debe presentar una amplia distribución en las poblaciones amerindias.

Debido a los avances tecnológicos en la biología molecular y a la optimización en la secuenciación del genoma completo, sobre todo el mitocondrial, el número de linajes fundadores aumentó considerablemente de 5, como se mencionaba anteriormente, a al menos 13: A2, B2, C1b, C1d, C1c, C4c, D1, D2a, D3, D4h3a, D4e1c, X2a y X2g (Fig. 10) (Bandelt *et al.* 2003; Tamm *et al.*, 2007; Achilli *et al.*, 2008; Perego *et al.*, 2009, 2010; Malhi *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2011; Bodner *et al.*, 2012).

⁸ Es el tiempo de separación entre dos moléculas contemporáneas y el ancestro de ellas.

Algunos investigadores sostienen que los linajes A2a, A2b, D2a, D3 y X2a al estar presentes sólo en Norteamérica, tendrían su origen en algunas poblaciones del oeste de Beringia o Este de Siberia entrando al continente en el milenio posterior a la llegada de los primeros fundadores (Torroni *et al.*, 1992; Schurr y Sherry, 2004; Achilli *et al.*, 2008; Perego *et al.*, 2009).

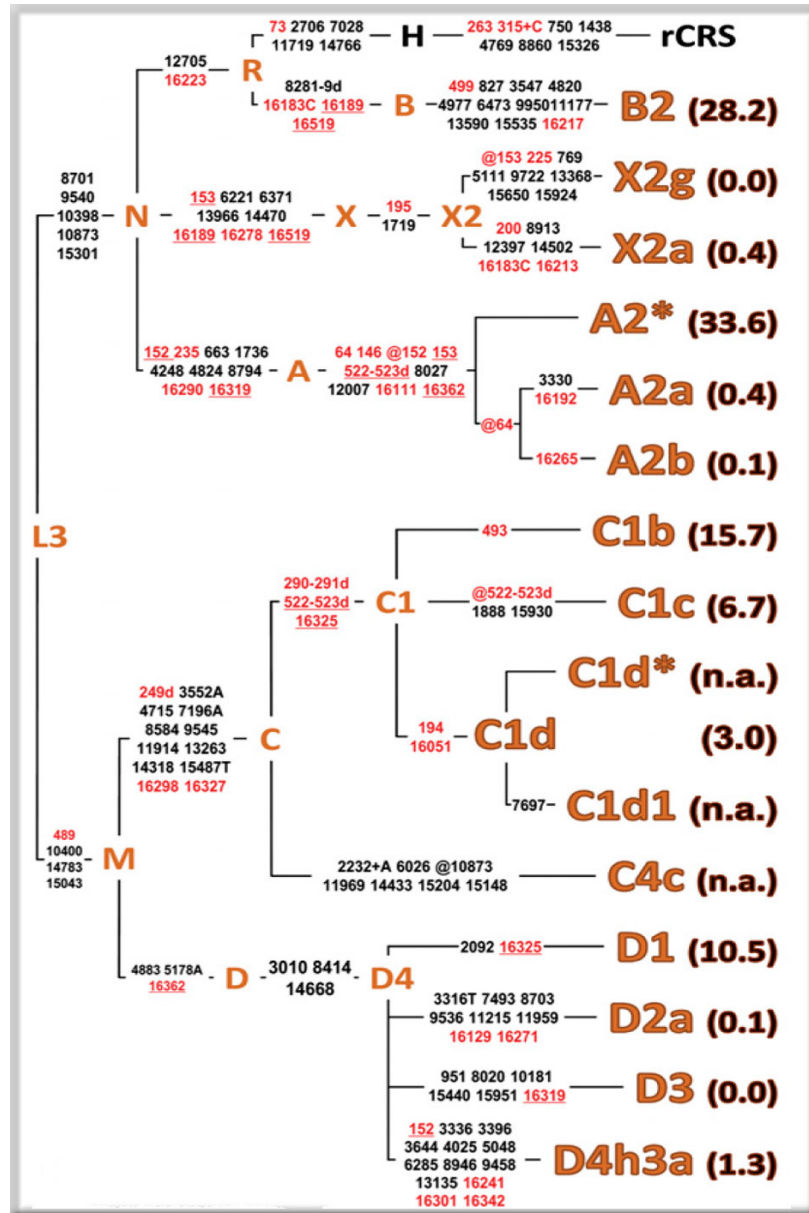


Figura 10. Árbol filogenético de los linajes presentes en los nativos americanos con las mutaciones específicas y las raíces de origen de cada uno. Imagen tomada y modificada de Perego *et al.* (2010)

Rickards *et al.* (1999) detectaron una variante poco común en aproximadamente un 22% en la población Cayapa de Ecuador. Al no estar descrito hasta el momento, lo nombraron el “Haplotipo Cayapa”. Luego, éste fue descrito en poblaciones de Brasil (Alves-Silva *et al.*, 2000) y en Mapuches y Yaganes de Chile (Moraga *et al.*, 2000), siendo denominado como D4h3a. Perego *et al.* (2009) relacionaron este linaje a una dispersión rápida por la ruta costera del Pacífico desde América del Norte hasta el sur del continente y fue considerado un linaje fundador derivado del Hg D.

Recientemente, Rasmussen *et al.* (2014) reportaron el haplotipo de los restos de un infante en Anzick, Montana, al noroeste de Estados Unidos, con una datación entre los 12.707 y los 12.556 años AP. Este niño fue asociado a la cultura Clovis y fue el primer resto arqueológico del cual se obtuvo la secuencia completa en América. Su linaje también corresponde al D4h3a. En este trabajo se hace mención a que habría existido una gran variabilidad genética en las poblaciones precolombinas ya que hay restos arqueológicos de individuos de Norte América que no presentan relación genética con individuos de Centro y Sudamérica, lo cual ya había sido señalado por Kemp *et al.* (2007).

Luego de varios años de considerar al D1 como un Hg fundador, Bodner *et al.* (2012) refinaron la filogenia de este linaje, describiendo dos haplotipos novedosos en poblaciones actuales. Denominaron D1g al caracterizado por las mutaciones A8116G y C16187T. Dentro del mismo describieron 6 ramas diferentes (D1g1-D1g6). El otro haplotipo fue nombrado D1j y presenta las mutaciones T152C, C16242T y T16311C. Los autores calculan su antigüedad dentro del rango de 16.900 ± 1.600 años, con lo cual pueden ser considerados como provenientes de las primeras poblaciones fundadoras del cono sur.

Ambos linajes hasta el momento sólo fueron descritos para Sudamérica, encontrándose el D1g disperso por Chile y Argentina, con su mayor proporción en la Provincia de Río Negro, y el D1j en Argentina (no alcanzando el extremo sur de la Patagonia), Brasil, Bolivia, y según restos antiguos de Tainos, en República Dominicana (Ginther *et al.*, 1993; Moraga *et al.*, 2000; Lalueza-Fox *et al.*, 2001; Garcia-Bour *et al.* 2004; Salas *et al.*, 2008; Bobillo *et al.*, 2010). Bodner *et al.*

(2012) formularon una hipótesis de la posible dispersión de estos linajes dentro de América del Sur, proponiendo un poblamiento por la costa pacífica con posterior flujo génico desde ambos lados de la cordillera (Fig. 11).

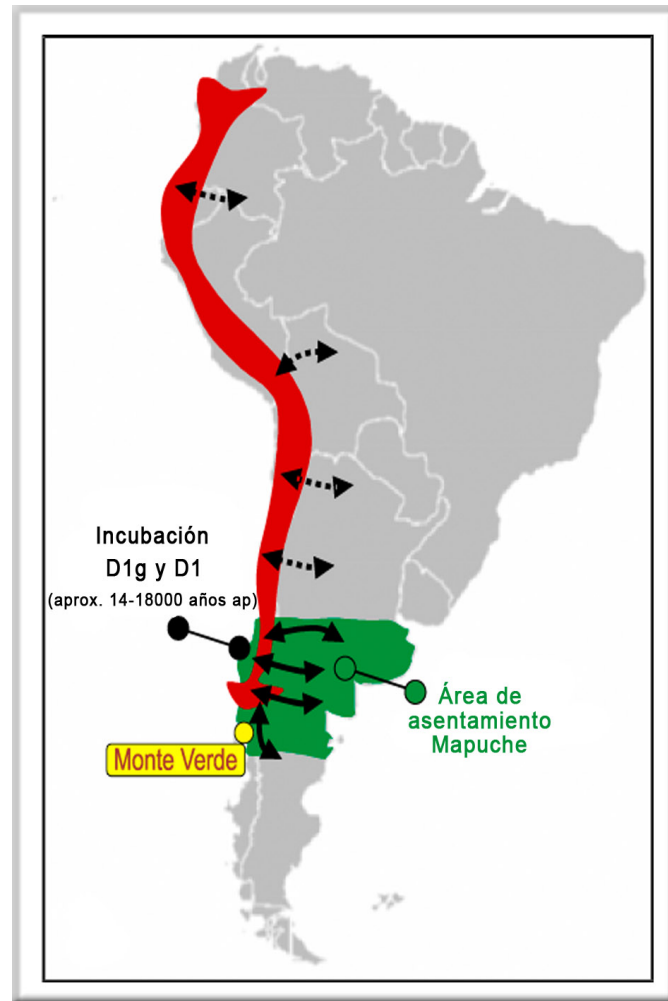


Figura 11. Modelo hipotético de migración para Sudamérica con una entrada por la Costa Pacífica y flujo génico a ambos lados de la cordillera. En verde se enmarca el área posiblemente habitada por los mapuches según Rothhammer...

Por el contrario, Garcia *et al.* (2012) propusieron un origen distinto para el D1j, a partir de su gran incidencia en las Sierras Pampeanas, y su baja frecuencia en Chile. Postularon que los individuos portadores del D1j presentes en Bolivia, Perú, Uruguay y Brasil pueden ser producto, probablemente, de flujo génico

reciente en tiempos históricos. Además propusieron que este linaje sería más moderno (13.900 ± 2.900 años) respecto a lo propuesto por Bodner *et al.* (2012). Los Hgs fundadores descritos para poblaciones actuales también fueron encontrados en las muestras de poblaciones prehispánicas.

2.3.3 Momentos de entrada de los linajes fundadores al nuevo mundo

Los datos obtenidos a partir de estudios genéticos proponen un ingreso al continente americano más antiguo que el propuesto desde la evidencia arqueológica. Se cree, según Torroni *et al.* (1992) y Mishmar *et al.* (2003) que los Hgs A, C y D llegaron a América desde el norte de Siberia a través de Beringia. El B habría llegado más tardíamente, ya que su frecuencia es menor con respecto a los otros 3 Hgs, y es poco frecuente en el norte de Norteamérica. Podría haber ingresado por una ruta pacífica ya que en Asia se encuentra a lo largo de la costa.

Bonatto y Salzano (1997) sugirieron a partir de la diversidad encontrada dentro del Hg A, un origen único entre 43.000 y 30.000 años AP, dependiendo de la tasa de sustitución empleada, para todas las poblaciones americanas. La población que llegó al sur de Norteamérica, al cerrarse nuevamente el Corredor Alberta, habría tenido mayor cantidad de recursos y espacio para diferenciarse y crear nuevos haplotipos respecto de aquellas poblaciones que quedaron restringidas a Beringia (Na-Dene, Eskimos y probablemente Chukchis), las que pueden haber sufrido la pérdida de diversidad haplotípica.

Kemp *et al.* (2007) publicaron un estudio de ADN antiguo realizado en On-Your-Knees-Cave, Alaska de 9.200 años AP, en el cual determinaron la presencia de un haplotipo fundador del haplogrupo D. Estos resultados sugieren que los modelos previos realizados en base al estudio e inferencia en poblaciones actuales han considerado una variación del ADNmt muy baja en las primeras poblaciones americanas, y por lo tanto, es probable que el tamaño de las poblaciones fundadores de América haya sido mayor a lo propuesto y que la diversidad de linajes que poseían sea mayor a la pensada.

Tamm *et al.* (2007) retoman el modelo de Incubación en Beringia con una dispersión por América entre los 17.000 y 10.000 años AP aproximadamente. Este estudio tuvo sus bases en el análisis de genomas mitocondriales de poblaciones asiáticas y americanas actuales, y la aparición de diversos linajes maternos, algunos compartidos entre ambos continentes y otros nuevos encontrados solo en América. Continuando con la teoría de ese periodo de ingreso de los nativos americanos, Mulligan *et al.* (2008) propusieron que luego de la incubación en Beringia las poblaciones sufrieron un cuello de botella durante la entrada al continente entre los 17.000 y 16.000 años AP seguida de una re-expansión (Kemp y Schurr, 2010). Estos estudios se oponen a la propuesta de un poblamiento por varias oleadas migratorias.

Siguiendo con esta idea y basándose en 86 genomas amerindios completos, Fagundes *et al.* (2008) propusieron que el poblamiento de América estaba dado por una sola población fundadora, con una diferenciación inicial de la población asiática que se produjo en Beringia hace 19.000 a 23.000 años atrás. Achilli *et al.*, (2008) coinciden con Fagundes *et al.* (2008) proponiendo una expansión hacia el nuevo mundo hace aproximadamente 18.000 a 15.000 años AP. Estos datos presentan una edad para los Hgs amerindios más moderna que el estudio anterior.

En conclusión, los análisis más recientes señalan que la diferenciación inicial de los haplogrupos americanos no sería tan antigua, sino que habrían divergido de los de Asia entre los 25.000 y 15.000 años AP según datos de coalescencia (Horai *et al.*, 1993; Silva *et al.*, 2002; Schurr y Scherry, 2004), lo que sería coincidente con la evidencia arqueológica.

2.3.4 Breve revisión de linajes maternos en poblaciones actuales de Sudamérica

Ginther *et al.* (1993) llevaron a cabo el primer análisis de secuencias de la región hipervariable del ADNmt en muestras de Mapuches, llegando al resultado

de que los linajes que presentan los nativos americanos surgieron antes de la llegada al continente. Salas *et al.* (2009) por su parte, realizaron un compendio sobre la distribución de los linajes del ADNmt en poblaciones actuales del centro y sur de América (Fig. 12). El haplogrupo A es muy frecuente en Mesoamérica y en el Noroeste de Sudamérica, seguido de los Hgs B y C. A medida que la frecuencia de A disminuye hacia el sur, comienza a aumentar la aparición de linajes C y D. Por su parte, el B posee su mayor frecuencia en las poblaciones andinas, esto podría deberse a una migración por la costa pacífica. Avena *et al.* (2009), publicaron un trabajo en el cual demuestran el gran componente amerindio de la población argentina siendo este más frecuente en el norte y el sur del país (más del 60%) y menos del 50% en las poblaciones del centro (Avena *et al.*, 2006; 2007; 2009; 2010). Sin embargo, García y Demarchi (2009) presentaron un estudio donde demuestran la persistencia de los linajes amerindios en más de un 80% de los individuos de 9 poblaciones rurales de las Sierras Centrales.

También en concordancia con el decrecimiento latitudinal del Hg A y el aumento en sentido opuesto del D, Bisso-Machado *et al.*, (2012) realizaron una revisión muy completa sobre los estudios en ADNmt y región no recombinante del cromosoma Y de varias poblaciones actuales y algunas antiguas de Sudamérica, llegando a la conclusión de que la distribución de los linajes maternos en esta porción del continente está influenciada por factores geográficos y lingüísticos.

Analizando 1108 secuencias de poblaciones actuales de 6 provincias del centro-oeste y noreste de Argentina, Motti (2012) caracterizó a 8 de los 13 linajes fundadores, siendo estos: A2, B2, C1b, C1c, C1d, C4c, D1 y D4h3.

Para el NOA Cardoso *et al.* (2013) dividieron la provincia de Jujuy en 4 regiones y a partir de la secuencia del D-loop del ADNmt reportaron una alta proporción de linajes maternos amerindios (98%), entre ellos: A2, B2, B4b, C1, C1b, C1d, D1, D1a2, D1f, D1j y D4h3a4.

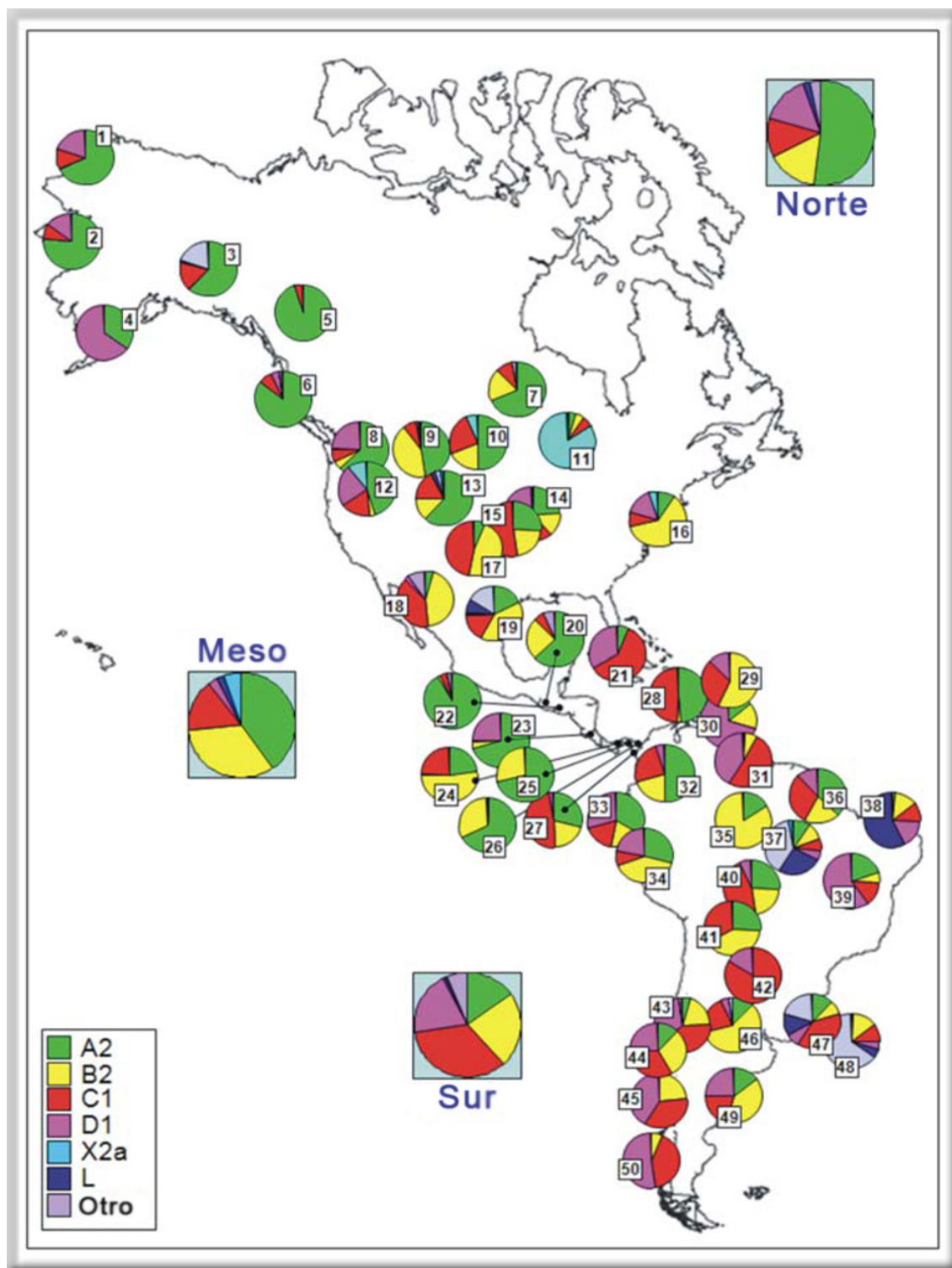


Figura 12. Distribución de haplogrupos fundadores en el continente americano para poblaciones actuales. Imagen tomada y modificada de Salas et al. (2009).

2.3.5 DNmt en muestras antiguas e históricas de Sudamérica

En 1991 Horai *et al.* publicaron las primeras secuencias de Sudamérica utilizando restos óseos de 5 individuos pertenecientes a un sitio de Arica, Chile. Luego, en 1996 Ribeiro-Dos-Santos *et al.* y Monsalve *et al.* publicaron más secuencias de la HVR I en sudamerindios precolombinos. Lalueza *et al.* (1997) analizaron muestras de la región patagónica encontrando una elevada proporción de los Hgs C y D, y no hallando resultados para A y B. Luego se publicaron otros trabajos que permitieron la ubicación geográfica y temporal de otros linajes maternos para la región (Moraga *et al.*, 2000; Demarchi *et al.*, 2001; Garcia-Bour *et al.*, 2004; Moraga *et al.*, 2005; Dejean *et al.*, 2006, 2008; Crespo *et al.*, 2009; Carnese *et al.*, 2010; Mendisco *et al.*, 2011; Nores *et al.*, 2011; Nores y Demarchi 2011; Mendisco *et al.*, 2014). En este último año nuestro equipo de investigación ha realizado varias contribuciones: Dejean *et al.* (2014) sobre variabilidad biológica en el NOA, Postillone *et al.*, (2014a) sobre un compendio de resultados de RFLP para varias muestras precolombinas de todo Sudamérica, y Postillone *et al.* (2014b) para la Puna jujeña en comparación con muestras Chilenas y por último el presentado por Russo *et al.* (2014) también para el NOA, específicamente para el sitio Salvatierra ubicado en los valles Calchaquies, Salta.

En el mapa (Fig. 13) se resumen todos los estudios de linajes maternos para ADN_a en Sudamérica descritos hasta el 2014. El detalle de cada uno de ellos se presenta en la tabla anexa (tabla anexa 1)

La distribución latitudinal en las frecuencias de haplogrupos podría ser explicada por un aislamiento por distancia, la acción de la deriva génica, movimientos poblacionales y efectos estocásticos a medida que los humanos se iban dispersando por el subcontinente.

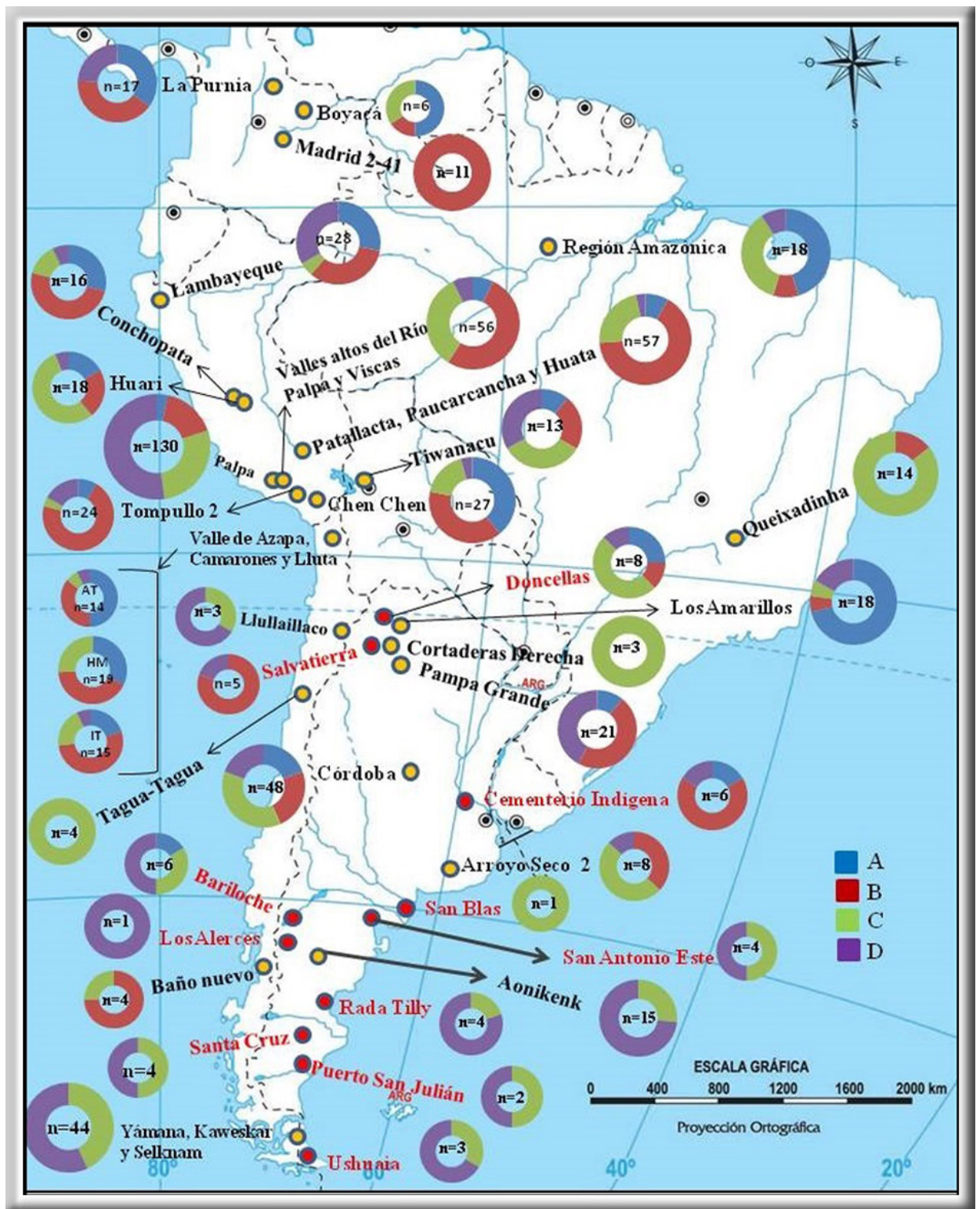


Figura 13. Distribución de los haplogrupos amerindios en muestras antiguas de Sudamerica. Mapa tomado de la recopilación realizada por Postillone *et al.* (2014)

Algunas variantes genéticas que son poco frecuentes en las poblaciones modernas podrían haber sido más comunes en el pasado, y las que hoy son ubicuas, pueden haber aumentado en frecuencia durante los últimos miles de años. Más aún, la distribución actual de los linajes mitocondriales puede no estar reflejando el área geográfica en la cual se encontraban en el pasado. Lo que se observa a partir del estudio de ADN antiguo es que no necesariamente los patrones de distribución actuales de los haplogrupos son representativos de los antiguos.

En resumen coincidiendo con lo propuesto en el apartado 1.1, puede proponerse que en lo que respecta a los amerindios el continente americano pudo haber sido poblado en una sola migración proveniente del este de Asia, con un tamaño poblacional reducido. Esas poblaciones pudieron haber estado aisladas durante un tiempo, mientras la deriva génica podría haber fijado las nuevas variantes haplotípicas producidas y haber suprimido otras. Luego habría seguido un periodo de expansión geográfica poblacional rápida (Tamm *et al.*, 2007; Kitchen *et al.*, 2008). Una vez que las poblaciones fueron ocupando diferentes territorios, pudo haber existido flujo génico entre ellas que contribuyó a moldear la composición genética encontrada en las poblaciones arqueológicas y actuales.

2.4 ADN antiguo

La historia de nuestra especie puede rastrearse en la información genética de los individuos a la cual hemos podido acceder a partir de los avances tecnológicos en genética y biología molecular. Los primeros estudios involucraban clonación en bacterias para amplificar los pequeños segmentos que existían en el material genético de restos momificados de animales y humanos, pero rápidamente fueron desestimadas por la baja reproducibilidad de los resultados (Solorzano Navarro, 2006). En 1986 con el descubrimiento de la PCR sucedió una revolución en el campo de la genética de poblaciones a nivel del ADN (Mullis *et al.*, 1987). Esta técnica facilitó la reproducción de secuencias polimórficas de ADN obtenido de poblaciones actuales, y permitió la replicación de material genético

preservado en restos arqueológicos y paleontológicos (Pääbo, 1989; Hagelberg *et al.*, 1989).

Las técnicas moleculares se han convertido en una gran herramienta no sólo para el estudio de la dispersión del género *homo* y su historia evolutiva, sus migraciones y procesos demográficos que contribuyeron a dar forma a las poblaciones actuales, sino también a la reconstrucción del medio ambiente en el cual esas poblaciones se desarrollaron. Así fue posible abordar tópicos tan diversos como la búsqueda de estratificación social a partir del análisis de isótopos para deducir el tipo de alimentación, la presencia de enfermedades causadas por microorganismos, la domesticación de plantas y animales, etc. (Poinar *et al.*, 2001)

A medida que se iba avanzando en el estudio sobre muestras prehistóricas, comenzaron a aparecer diversas fuentes de obtención de ADN, no sólo partes esqueléticas que son las más abundantes en una excavación, o tejido blando asociada a éstas, sino también coprolitos, material lítico hallado en el yacimiento, sedimentos, permafrost, y para el caso de las aves, plumas y restos de cáscaras de huevos. Sin embargo las piezas óseas y dentales siguen siendo las preferidas para ser utilizadas en investigaciones de ADN (Shapiro y Hofreiter, 2012). En estas últimas, el esmalte y el cemento dental se convierten en una barrera natural contra los cambios físicos y químicos a los que se expone el yacimiento y se generan enlaces químicos fuertes entre el ADN y los cristales de hidroxiapatita presentes tanto en huesos como en dientes (Ricaud *et al.*, 2004).

Las primeras extracciones de ADN fueron realizadas en animales extinguidos, por Higuchi *et al.* (1984), quienes identificaron ácidos nucleicos en un quagga y demostraron su afinidad filogenética con la cebra moderna. Un año después Pääbo (1985) obtuvo la secuenciación de ADN de una momia egipcia de 2.400 años. Este hallazgo, sumado al de finales de la década de 1980 cuando se extrajo por primera vez ADN humano procedente de tejido óseo (Hagelberg *et al.*, 1989), dio el inicio a un nuevo campo de estudio dentro de la Antropología Biológica acerca de la variabilidad genética de las poblaciones humanas antiguas. Esta nueva disciplina asociada a la información obtenida por la arqueología, obtuvo el nombre de Arqueogenética (Renfrew *et al.*, 2000).

Al material genético en estudio se lo englobó bajo el concepto de ADN antiguo (ADNa) y se lo describió como aquel recuperado de restos biológicos preservados natural o artificialmente (Fraile, 2006). Las secuencias de ADN multicopia son las que tienen mayor tasa de supervivencia en especímenes antiguos, por lo que la mayoría de las secuencias de ADN que se han recuperado han sido de ADN mitocondrial y de cloroplastos en las plantas (Hofreiter *et al.*, 2001). Recién a partir de 1990 fue posible obtener secuencias cortas de ADN nuclear genuino en un resto arqueológico de 7.500 años (Lawlor *et al.*, 1991) y a partir de megafauna (Greenwood *et al.*, 1999).

Una revisión acerca de las aplicaciones del ADNa en investigaciones arqueológicas y bioantropológicas, considerando sus alcances y limitaciones junto a las implicancias legales y éticas ha sido realizada recientemente por Crespo *et al.* (2010).

Uno de los estudios pioneros fue el publicado por Horai *et al.* (1989) donde establecía la posible filogenia de japoneses contemporáneos con sus antepasados. Luego en 1993 Stone y Stoneking dieron origen al primer estudio poblacional en nativos americanos. Hagelberg *et al.* (1999) analizaron las relaciones filogenéticas entre los antiguos habitantes de la Isla de Pascua y Polinesios. El análisis genético de restos antiguos también han colaborado con estudios forenses de identificación de restos de familias. Por otro lado, sobre muestras de diferentes regiones vascas del antiguo continente, Izaguirre y de la Rúa (2000) realizaron otro estudio poblacional con el fin de dilucidar el origen continental de los linajes mitocondriales presentes en la actualidad.

2.4.1 Ventajas del ADNa

A diferencia de los estudios genéticos sobre poblaciones actuales donde debe asumirse que son representativos de los grupos que habitaban esa región en el pasado, el ADNa ofrece la posibilidad de analizar los patrones genéticos que

existieron en un tiempo y lugar determinado, generando evidencia directa sobre las posibles relaciones que mantenían las poblaciones precolombinas entre sí y con las actuales (Pickrell y Reich, 2014). Algunos de los resultados de mayor relevancia alcanzados gracias a las investigaciones en ADN fueron por ejemplo:

- La evidencia de posible flujo génico desde Neandertales a humanos anatómicamente modernos entre los 85000 a 37.000 años atrás fuera de África, con una contribución del 2% de la ancestría (Green *et al.*, 2010).

- El descubrimiento de un representante de una población arcaica que no se correspondía con neandertales, ni con humanos modernos de Siberia. El descubrimiento del individuo denominado *Denisoviano* demostró cómo el ADN puede dar cuenta de los genomas de fósiles, poblaciones o especies de los cuales no se conocía su existencia (Reich *et al.*, 2010).

- Evidencia de que los individuos que habitaban Norteamérica hace 12.000 años estarían más relacionados con los sudamerindios que con los nativos actuales del norte del continente (Rasmussen *et al.*, 2014).

Por otro lado, el estudio de ADN en microorganismos ha permitido determinar la prevalencia de algunos patógenos en el tiempo, la interacción con sus huéspedes y evidenciar la presencia de enfermedades infecciosas en las poblaciones del pasado, importante para la investigación clínica. Como por ejemplo *Yersinia pestis* causante de la peste bubónica (Drancourt *et al.*, 1998; Gilbert *et al.*, 2004) *Mycobacterium tuberculosis* (Tuberculosis), y *Mycobacterium leprae* (Lepra) (Spigelman y Lemma, 2002; Donoghue *et al.*, 2005).

2.4.2 Limitaciones y precauciones en el uso de ADN

- Contaminación

Existen algunos desafíos a tener en cuenta a la hora de trabajar con ADN. El primero y más importante es la alta probabilidad de contaminación que posee el material arqueológico. No solo puede contaminarse con ADN propio de los investigadores que lo manipulan sino también de microorganismos o animales que hayan estado en contacto con la muestra, o de haber realizado una inadecuada recolección de las mismas que pueden estar en contacto entre sí y contaminarse unas con las otras - para una revisión más extensa y detallada leer la revisión de Willerslev y Cooper (2005).

Por otro lado, para controlar y autenticar que el ADN obtenido es propio de las muestras analizadas, en cada reacción de extracción realizada deben incluirse blancos de reacción y demostrar por replicación la autenticidad de los resultados obtenidos.

- Degradación

Otra de las dificultades que presenta el trabajo con ADN, es la degradación y la falta de metodología apropiada para la identificación de muestras que contengan ADN bien conservado. Por procesos *post-mortem* de un organismo, el ADN puede presentar fragmentación y daño molecular, como rotura de las cadenas, plegamientos inusuales de las mismas, pérdida de bases nucleotídicas, y uniones inespecíficas a ADN exógeno, que interfieren con la replicación del ADN endógeno, generan artefactos y facilitando la amplificación preferencial de ADN contaminante en el caso de que esté presente debido a la alta sensibilidad que posee la PCR (O'Rourke *et al.*, 2000; Willerslev y Cooper, 2005). Los productos de ADN amplificados generalmente suelen caracterizarse por la presencia de errores como el cambio de bases. Los más comunes son C por T y G por A (Hofreiter *et al.*, 2001). Se ha considerado que los daños ocurridos en la secuencia de ADN se producían en regiones al azar, pero luego se observó que se concentraban en "sitios calientes" (en inglés "hot spots") (Gilbert *et al.*, 2003).

Las condiciones ambientales son de vital importancia en la conservación del ADN pues la velocidad de las reacciones químicas responsables de la

degradación orgánica aumenta a temperaturas altas. Otros factores que tiene un efecto adverso y favorece las reacciones de degradación son la humedad ambiental y la acidez del suelo. Por otro lado puede influir la antigüedad que presente el resto esquelético con el que se esté trabajando.

- Inhibición

Algunos de los extractos de ADN, pueden contener moléculas que inhiban la reacción de PCR, generando otro problema a la hora de analizar las muestras. Se ha propuesto que puede tratarse de compuestos del suelo (ácidos húmicos y/o fúlvicos, residuos de porfirinas y/o productos de su degradación y taninos) y/o de subproductos de degradación orgánica, entre otros.

Todas estas dificultades no sólo pueden influir en la manipulación del material genético, sino también luego durante el procesamiento bioinformático. Es decir, las secuencias obtenidas pueden presentar gran cantidad de mutaciones que no son propias del genotipo del individuo, sino que son artefactos producidos por la degradación que presentan (Hofreiter *et al.*, 2001). Es por ello que al momento de realizar los análisis de las secuencias y comparaciones hay que tener en cuenta si las transiciones o transversiones encontradas se repiten en al menos tres de las secuencias obtenidas para una misma muestra.

Otra gran dificultad a tener en cuenta es el bajo número de muestras que presentan la mayoría de los sitios arqueológicos, sumado a aquellas pocas que poseen fragmentos de ADN propios para el análisis genético. Esto resulta desfavorable para los análisis estadísticos, ya que a las muestras con estas características sólo pueden aplicarse pocos métodos debido a que no cumple con los supuestos esperados.

Teniendo en cuenta las ventajas y desventajas de trabajar con material genético arqueológico, cada resultado que se obtiene y es publicado es de suma importancia por todo el laborioso proceso que conlleva detrás y por el valor fundamental que posee esa información. Sobre todo en el intrincado abordaje de la historia de la dispersión y poblamiento de diferentes regiones por el género *Homo*.

Capítulo 3: Objetivos e Hipótesis

Habiéndose descripto todo el marco teórico de los capítulos 1 y 2 para el estudio de ADN, a continuación se detallan los objetivos e hipótesis propuestos para el desarrollo de los estudios involucrados en esta tesis de doctorado.

3.1 Objetivos

Se plantean dos niveles de objetivos:

El general es aquel al cual se intenta aportar nuevos datos con esta investigación:

Esperamos contribuir a una mejor comprensión de la dinámica de los procesos de microevolución que tuvieron lugar durante el poblamiento autóctono del actual territorio argentino, tomando en cuenta los ejes espacial y temporal empleando marcadores genéticos en muestras arqueológicas.

Los objetivos específicos de esta investigación son:

- Determinar los linajes maternos en varios grupos de muestras arqueológicas del Noroeste Argentino y Patagonia a partir del estudio de los haplogrupos mitocondriales en diversos sitios arqueológicos y muestras de colecciones de museo.

- Estimar los patrones de intra e intervariación poblacional en haplotipos mitocondriales-

- Comprender las posibles relaciones filogenéticas de las muestras estudiadas, considerando la existencia o no, de lazos filogeográficos entre ellas y con otras poblaciones sudamerindias extintas y actuales.

- Definir la composición de la muestra, mediante la determinación del sexo de los individuos estudiados.

- Evaluar los potenciales y limitaciones que presenta el trabajo con material genético antiguo.

- Evaluar el grado de diferenciación a nivel poblacional local y regional que posee un marcador genético uniparental como la secuencia de la región control del ADN mitocondrial.

- Estimar el mejor rendimiento en la obtención de ADN utilizando diferentes métodos de extracción.

3.2 Hipótesis

Las hipótesis propuestas para esta investigación se basan en la evidencia publicada hasta el momento

- Las muestras precolombinas del norte como del sur de nuestro país pertenecían a una misma población.

- La deriva y el flujo génico son los únicos procesos microevolutivos que modelaron la diversidad entre y dentro de las poblaciones del pasado.

- La diversidad de linajes encontrada en una muestra depende de la ubicación geográfica.

- Las muestras analizadas están relacionadas filogenéticamente con poblaciones del mismo periodo temporal.

- Las muestras del Noroeste argentino presentan mayor diversidad de linajes que las muestras de Patagonia.

Capítulo 4: Descripción de las muestras analizadas y consideraciones éticas en el estudio con restos humanos

4.1 Consideraciones éticas y legales en el trabajo con restos óseos humanos

Este estudio involucra restos esqueléticos humanos por ello es importante tomar en consideración las implicancias éticas del mismo. Actualmente la intervención que se realiza para obtener el material genético a partir de huesos largos es muy poco invasiva y permite remontar el hueso luego de la extracción. Lo mismo sucede con las piezas dentales, de las cuales se utiliza únicamente la pulpa dental y por lo tanto las mismas pueden rellenarse y ensamblarse con facilidad.

Cabe señalar, como se mencionó en la introducción, que este tipo de material arqueológico puede presentar un grado de degradación física importante y durante el procesamiento las muestras pueden sufrir algún tipo de daño como fisuras o fracturas. Por esta razón, antes de comenzar con el procesamiento de las muestras, se debe realizar una evaluación sobre el estado de cada una de las piezas, priorizando el valor que poseen los restos arqueológicos, que son únicos y escasos, sobre cualquier interés científico. Sólo en el caso en el que el resultado que pueda obtenerse sea novedoso e informativo y permita aportar datos para la resolución de debates esenciales en las disciplinas relacionadas, puede considerarse la utilización de este material.

Antes de comenzar con las investigaciones pertinentes de esta tesis para cada muestra se realiza una réplica en caso de que la misma pueda perder su estructura original. Una vez realizados los análisis genéticos, las muestras que no sufrieron ningún daño son remontadas como se explicó más adelante y junto a las réplicas son devueltas al investigador o institución que las haya cedido con un informe detallado del tratamiento, procesamiento y resultados obtenidos sobre las mismas, determinando el uso respetuoso de los restos humanos y el valor de la información aportada.

En la actualidad las investigaciones llevadas a cabo sobre restos arqueológicos, deben enmarcarse dentro de lo propuesto por ciertas normas

legales, como la Ley Nacional n° 25.517. Por otro lado, la Asociación de Antropología Biológica Argentina, en vista al considerable aumento de estudios bioarqueológicos ha propuesto una serie de recomendaciones para el tratamiento y desarrollo de las investigaciones con material arqueológico de restos humanos (AABA, 2007). Estas normativas se van ajustando y se incorporan nuevos ítems a medida de que van surgiendo nuevos problemas y sugerencias en los Talleres de Discusión sobre Restitución de Restos Humanos.

Tal como mencionan Crespo *et al.* (2010), a través del decreto 710/2010 se dictaminó la formación del INAI (Instituto Nacional de Asuntos Indígenas) y se estableció que dicha institución será la encargada de coordinar, articular y asistir en el seguimiento y estudio del cumplimiento de las directivas y acciones de la ley. Este marco legal da respaldo a los estudios que se realizan desde diferentes disciplinas, acerca del pasado de las poblaciones indígenas que habitaron nuestro país desde, en particular a los análisis genéticos del ADN, que es una rama del conocimiento relativamente nueva.

4.2 Procedencia de las muestras analizadas

Las muestras prehispánicas analizadas en esta tesis corresponden a diferentes regiones geográficas del actual territorio argentino. Las mismas provienen de tres áreas: 1) la Puna Jujeña en el Noroeste, 2) la zona de transición entre Pampa y Patagonia, y 3) de la región continental y costera de la Patagonia. Todas las muestras pertenecen al periodo del Holoceno Tardío (3.000 – 200 años AP) según los fechados radiocarbónicos publicados. A continuación se describe brevemente cada región y las muestras analizadas en cada una de éstas (figura.14).

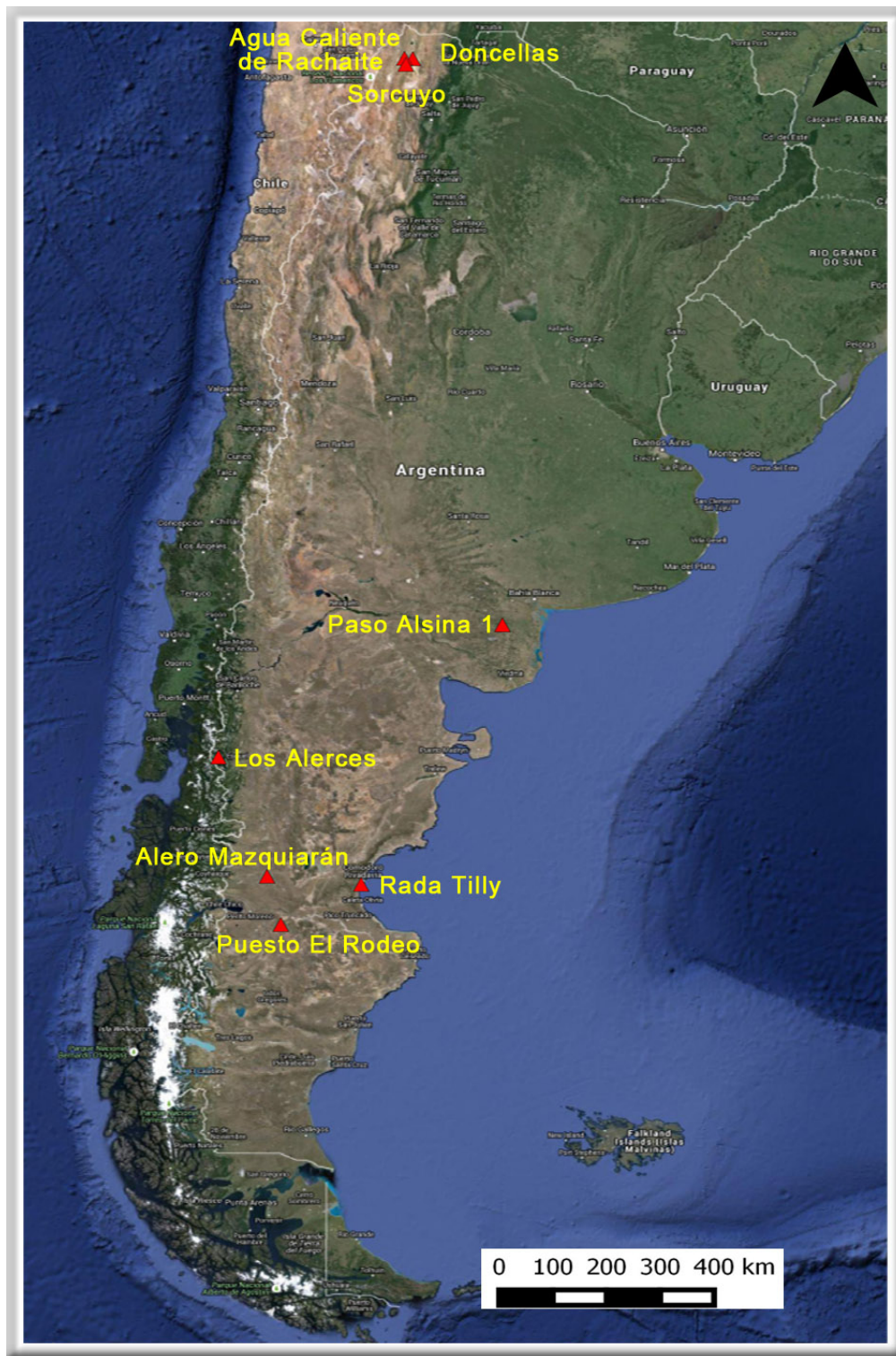


Figura 14: Ubicación geográfica de las muestras analizadas en este trabajo

4.2.1 Muestras de Puna Jujeña

La Puna se emplaza en una región de semidesierto de estepa arbustiva. En la misma, la disposición de vegetales se establece en forma de fajas por la disposición de cuencas alargadas de las cuales emergen importantes cordones montañosos. En las cuencas bajas, predominan las formaciones de estepa matorral y de pastizal, en cambio, a medida que va aumentando la altitud decrece la población arbustiva gracias a la mayor humedad. Asimismo abundan las vegas pastas, inundadas durante todo el año (Pérez y Killian Galván, 2011). La Localidad Arqueológica Río Doncellas (Dto. de Cochinoca, Provincia de Jujuy) se encuentra ubicada entre los 22° 49' 12,28'' lat. Sur y 66° 03' 54,89'' long. Oeste, en un ambiente típico de Puna con una altitud de 3900 msnm, precipitaciones anuales actuales entre los 100 y 300 msnm y cuenta con recursos hídricos permanente (Alfaro, 1988).

Las muestras correspondientes a la Puna de Jujuy analizadas en esta tesis provienen de los sitios arqueológicos Doncellas, Agua Caliente de Rachaite y Sorcuyo. El material esquelético correspondiente a estos sitios se encuentra depositado como colección osteológica de la Puna de Jujuy en el Museo Etnográfico Juan B. Ambrosetti (FFyL, UBA). Se analizaron 23 piezas dentales cuya procedencia se detalla en la tabla (Tabla 1).

Según Fuchs y Varela (2013) esta colección de gran valor arqueológico, se formó a partir de tres campañas arqueológicas llevadas a cabo por el Dr. Casanova, la primera en 1940 en el poblado de Doncellas, la segunda en 1941 y junto con Osvaldo Paulotti en el poblado de Agua Caliente de Rachaite, y la tercera en 1944 en Río Negro, Sorcuyo y Casabindo, sitios cercanos geográficamente a los antes mencionados.

De acuerdo a los fechados radiocarbónicos obtenidos por Fuchs y Varela (2013) empleando piezas dentales, Doncellas (n=3) presentó una antigüedad de entre 602 y 568 años AP, Agua Caliente (n=1) de 559 ± 41 años AP y Sorcuyo

(n=1) de 633 ± 38 años AP, lo que ubica a las muestras de este análisis en el Periodo de Desarrollos Regionales.

Tabla 1: Detalle de cada muestra correspondientes a la Puna Jujeña analizadas en este trabajo.

Muestra	Nº de catálogo	Pieza dental ^Δ	Sitio Arqueológico	Datación (años AP)
DC1	13954	3 MSI	Doncellas	-----
DC2	13986	3 MSD	Doncellas	-----
DC3	14071	3 MSI	Doncellas	-----
DC4	14091	3 MSI	Doncellas	-----
DC5	13989	3 MSD	Doncellas	-----
DC6	14118	1 PMSD	Agua Caliente	-----
DC7	13955	3 MSD	Doncellas	568 ±44
DC8	13958	3 MSD	Doncellas	585 ±42
DC9	14136	3MSD	Agua Caliente	509 ± 42
DC10	15438	2 MSI	Agua Caliente	559 ± 41
DC11	13937	3 MSI	Doncellas	602 ± 33
DC12	14103	1 PMSI	Doncellas	-----
DC13	14176	3 MSI	Sorcuyo	-----
DC14	15421	2 MSD	Agua Caliente	-----
DC15	15418	2 MSI	Agua Caliente	-----
DC16	15445	3 MID	Agua Caliente	-----
DC17	15404	2 MII	Agua Caliente	-----
DC18	14040	2 MSI	Doncellas	-----
DC19	14051	3 MSD	Doncellas	-----
DC20	15400	3 MII	Agua Caliente	-----
DC21	15500	3 MID	Agua Caliente	-----
DC22	14173	2 MSD	Sorcuyo	-----
DC23	15410	3 MSD	Agua Caliente	-----

Δ Para las piezas se asignó: con número la posición en la mandíbula, y con letras en orden: M: molar, PM: premolar, posición S: superior, I: inferior, y por último la lateralidad I: izquierdo, D: derecho

Los sitios mencionados se encuentran ubicados en la cuenca endorreica de Miraflores-Guayatayoc-Salinas Grandes, en el centro de la Puna jujeña. Dentro de

esta localidad, según Alfaro (1983) y siguiendo las descripciones de Casanova, las localidades originalmente podrían haber tenido funciones complementarias entre ellas y con otras de la región. Estos poblados poseían un patrón de asentamiento característico del tipo semi-conglomerado agropastoril, con viviendas de planta rectangular, relacionados con la cuenca del Lago Titicaca en Bolivia, con San Pedro de Atacama, en el norte de Chile y con la Quebrada de Humahuaca. Según Albeck (2007) la Puna de Jujuy era un área prospera en pasturas para la crianza y mantenimiento de animales, en su mayoría camélidos. Las características ecológicas de la zona como la altitud, el suelo, las condiciones climáticas y la poca disponibilidad de agua, limitaron la práctica agrícola en la región. Aunque se ha descrito un cierto desarrollo agrícola en el área de Doncellas – Casabindo, se mantenían estrechas relaciones con áreas esencialmente agrícolas como el sur de Bolivia, los oasis atacameños y Quebrada de Humahuaca, (Alfaro, 1983; Albeck, 2003).

El intercambio de bienes entre los distintos pisos ecológicos parecería haber estado a cargo de poblaciones de tierras altas (pastoriles y agropastoriles) (Torres-Rouff *et al.*, 2012) que se desplazaban a ambos lados de la cordillera, conectándose con poblados que se encontraban ubicados en regiones de menor altitud como las quebradas y las yungas. Estas rutas ubicaban a la Puna en una posición estratégica muy relacionada a grupos caravaneros (Núñez Atencio, 2007).

4.2.2 Muestras de transición Pampa - Patagonía

Esta área se caracteriza por sus particularidades ecológicas distintas a las de Pampa y Norpatagonia, siendo un área transicional, ecotonal-árida. El sitio Paso Alsina 1 (39° 23.277' Lat. S y 63° 15.360' Long. O) se encuentra ubicado a 400 mts aproximadamente de la margen sur del Río Colorado, y a unos 100 km de la costa Atlántica en el partido de Patagones de la Provincia de Buenos Aires. Se caracteriza por ser un área exclusiva de inhumación que no cumple con las

características requeridas para ser considerado un cementerio. Se estimó la existencia de 10 entierros secundarios (Fig. 15) cada uno con uno o más fardos funerarios sin evidencia de usos repetitivos del área ni de actividades de mantenimiento (Martínez *et al.*, 2006). En esta tesis se realizaron análisis genéticos en 20 piezas dentales (PA1 a PA20) provenientes de este sitio, descritos en la Tabla 2. Para algunos de los restos óseos los autores obtuvieron fechados radiocarbónicos determinando un antigüedad de 500 y 450 años AP, correspondientes al Holoceno Tardío Final (Martínez *et al.*, 2006; Flensburg *et al.*, 2013).



Figura 15. Foto tomada y modificada de Flensburg *et al.*, 2013. Disposición de los 10 paquetes funerarios en el sitio Paso Alsina 1.

Paso Alsina 1 se distingue del resto de los sitios analizados en la región (La Petrona, San Antonio y El Tigre, entre otros) pues la mayoría presenta evidencia de ser bases residenciales asociadas a lugares de entierro. A partir de esos sitios pudieron determinarse las características del estilo de vida de los individuos que habitaban la región y que podrían reflejar el de la población de Paso Alsina 1,

donde no hay suficientes evidencias artefactuales relacionadas (Martínez *et al.* 2008-2009).

De acuerdo a los restos de fauna asociados se propone una mayor diversificación de la subsistencia durante el periodo tardío en relación a las poblaciones que habitaron el área en momentos previos, con incorporación a la dieta de especies de tamaño pequeño, como aves y peces de diferentes microambientes, incorporando también especies vegetales. En cuanto a los artefactos, estarían indicando que los asentamientos se volvieron más complejos con variabilidad intra e intersitio, en algunos casos con mayor tiempo de ocupación. Según los rastros encontrados en entierros primarios y la disposición de los secundarios, se podría haber dado un patrón de recurrencia en los sitios residenciales. Por otra parte, el hallazgo de algunas rocas silíceas provenientes de regiones vecinas estaría indicando relaciones de intercambio con otros grupos sociales, con lo cual los autores proponen a esta región como una “frontera blanda” de interacción en sentido norte-sur y este- oeste (Martínez *et al.*, 2008-2009).

A partir de este contexto, presentado según las poblaciones que habitaban la región donde se encuentra localizado Paso Alsina 1, puede inferirse que la estructura de entierro se generó como parte de un proceso social regional a raíz de un incremento en la densidad demográfica, una menor movilidad residencial, una circunscripción espacial de los diversos grupos y cambios en el modo de comportamiento funerario, que se evidencian con un intenso tratamiento de los restos (desarticulación y desprendimiento del material blando asociado al hueso, además del pintado de los mismos con colorantes rojos) (Flensburg *et al.*, 2013).

Tabla 2. Descripción de las muestras analizadas para Paso Alsina 1. La información fue provista por el Dr. Martínez y el Dr. Flensburg

Muestra	Nº de catálogo	Entierro	Cráneo	Pieza dental ^Δ	Sexo morfológico
PA1	19	4	6	3 MSD	Masculino
PA2	18	6	30	3 MSD	Masculino
PA3	20	7	K	3 MID	Masculino
PA4	1	2	4	3 MSD	Femenino
PA5	2	5	17	3 MSI	Masculino
PA6	3	7	12	3 MII	Femenino
PA7	4	10	8	3 MID	Masculino
PA8	5	10	9	3 MII	Masculino
PA9	6	10	26	3 MSD	Indeterminado
PA10	7	10	34	3 MSI	Femenino
PA11	8	1	18	3 MSD	Femenino
PA12	9	8	14	2 MSD	Masculino
PA13	10	4	20	2 MID	Indeterminado
PA14	11	9	21	3 MII	Femenino
PA15	12	10	24	1 MSI	Indeterminado
PA16	13	10	27	1 MSD	Indeterminado
PA17	14	10	35	2 MSD	Masculino
PA18	15	1	42	2 MSI	Femenino
PA19	16	8	53	3 MSI	Femenino
PA20	17	2	22	3 MSD	Femenino

Δ Para las piezas dentales el número indica la posición seguido de M=Molar, Ubicación: S=superior, I=inferior y la lateralidad: I=zquierda, D=derecha

4.2.3 Muestras de Patagonia

Se considera región Patagónica al territorio situado al sur de los Ríos Barrancas y Colorado, contando con una superficie aproximada a los 800.000 km². Incluye a las provincias del Neuquén, Río Negro, Chubut, Santa Cruz y el Territorio Nacional de Tierra del Fuego, como así también los partidos bonaerenses de Villarino y Patagones. De esta zona geográfica se tuvo acceso a

diferentes regiones ecológicas enumeradas de este a oeste y en nivel creciente de altitud, comenzando por la Costa Atlántica, la Meseta Patagónica y la región

4.2.3.1 Región de la Cordillera Patagónica

El sitio Alero Santos Salina (42° 48' 27' Lat. S y 71° 53' 56" Long. O) se encuentra en las cercanías del Río Desaguadero en el Parque Nacional Los Alerces (Esquel, Provincia de Chubut). En los años 1990/1991 se hallaron restos de al menos 5 individuos adultos y subadultos que presentaron diferentes grados de completitud y preservación. Los dos individuos analizados en esta tesis RT9 LA1 y RT9 LA 2 (Tabla 3) son adultos de sexo masculino que no presentaron modificación artificial del cráneo. Un fechado radiocarbónico realizado sobre el Individuo 1 arrojó una antigüedad de 1303 ± 45 años AP.

Tabla 3. Descripción de las muestras del sitio Alero Santos Salina

MUESTRA	CÓDIGO	PIEZA DENTAL ^Δ	SEXO MORFOLÓGICO	DATACIÓN (años AP)
LA 1	RT9-LA-1	2 PMSI	----	----
LA 2	RT9-LA-2	2 IID	----	----

^Δ Para las piezas dentales se asignó: PM= premolar; I= incisivo; C= canino; M= molar. La segunda letra indica S=superior; I= inferior y por último la lateralidad: I=izquierda; D= derecha

4.2.3.2 Región de la Costa Atlántica de la Patagonia

Esta región ecológicamente pertenece al matorral xerófilo mixto, presenta todas las características ambientales de la meseta central patagónica y se inscribe dentro de la provincia fitogeográfica de estepa arbustiva (Castro *et al.*, 2003). Está asociada a condiciones de aridez o semiaridez con precipitaciones anuales cercanas a los 200 mm.

Los sitios arqueológicos descritos para esta región son en su mayoría de superficie y a cielo abierto, ubicados cercanos a la costa y en las zonas de médanos. En consecuencia están muy expuestos a varios agentes erosivos. En el área la expansión urbana moderna, junto a la ampliación de la red vial y la construcción de plantas industriales, contribuyeron a la destrucción de algunos de los sitios arqueológicos que se encontraban en la costa (Gómez Otero, 2006).

En la Costa Atlántica de Patagonia las ocupaciones humanas se incrementaron durante el Holoceno Tardío, como indica el aumento notorio del registro arqueológico de ese periodo (Bernal, 2008). Durante el mismo, según Gómez Otero (2006) se habría dado una reducción de la movilidad del área residencial, lo cual puede sustentarse con la aparición de zonas formales de entierro.

En particular, la urbanización de la localidad de Rada Tilly (45° 55' 49,7" lat. S y 67° 33' 16,4" Long. O), (Fig. 14) ha ido dejando al descubierto diferentes evidencias arqueológicas: concheros, líneas de fogones y enterratorios humanos que podrían dar cuenta de la historia de los pueblos que habitaban la región (ver descripción de alguno de los rescates en Gordón *et al.*, 2014). Esos hallazgos fortuitos fueron recolectados en diferentes acciones de salvataje y se han ido depositando en el Museo Regional de Rada Tilly. La colección que se estaba formando, se encontraba en un estado precario de preservación, por lo que un grupo de antropólogos de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo de la Universidad Nacional de La Plata realizaron labores de acondicionamiento de la colección y difusión sobre la conducta ante posibles nuevos hallazgos (Béguelin *et al.*, 2010).

De esta colección se analizaron piezas dentales de 6 individuos (DB1-DB6) descritos en la Tabla 4. En el 2014, Gordón *et al.* realizaron estudios de isótopos estables y fechados radiocarbónicos (^{14}C) en 5 de los individuos analizados en este estudio, ubicándolos en un periodo cronológico que abarca gran parte del Holoceno Tardío entre 2955 ± 51 años AP y 334 ± 36 años AP.

La costa patagónica se caracteriza por la diversidad de recursos alimenticios tanto de origen marino (moluscos, peces y mamíferos marinos) como terrestres (guanacos, aves, plantas silvestres, roedores y semillas). En base a registros zooarqueológicos y a análisis de isótopos estables obtenidos para la región, se postuló que los grupos que la habitaban desarrollaron una estrategia de movilidad que incluía el interior del continente como un espacio al que se recurría en busca de recursos terrestres según los ciclos reproductivos de las presas y sus periodos migratorios. Se trataba entonces de grupos con amplios rangos de acción (Gordón *et al.*, 2014).

Tabla 4: Descripción de las muestras de Rada Tilly analizadas.

Muestra	Código	Pieza dental ^Δ	Sexo morfológico	Datación (años AP)
DB1	RT3-AA	CSI	----	----
DB2	RT8-ESC	3 MSD	Masculino	1306 ± 48
DB3	RT7-BJ	3 MSI	Masculino	1355 ± 49
DB4	RT4-MY	3 MID	Indeterminado	334 ± 36
DB5	RT2-SG	3 MII	Femenino	1392 ± 46
DB6	RT5-BB	2 IID	masculino	2944 ± 51

^Δ Para las piezas dentales se asignó: PM= premolar; I= incisivo; C= canino; M= molar. La segunda letra indica S=superior; I= inferior y por último la lateralidad: I=izquierda; D= derecha

La costa patagónica se caracteriza por la diversidad de recursos alimenticios tanto de origen marino (moluscos, peces y mamíferos marinos) como terrestres (guanacos, aves, plantas silvestres, roedores y semillas). En base a registros zooarqueológicos y a análisis de isótopos estables obtenidos para la región, se postuló que los grupos que la habitaban desarrollaron una estrategia de movilidad que incluía el interior del continente como un espacio al que se recurría en busca de recursos terrestres según los ciclos reproductivos de las presas y sus periodos migratorios. Se trataba entonces de grupos con amplios rangos de acción (Gordón *et al.*, 2014).

La gran movilidad que presentaban además, podría estar relacionada a redes de intercambio con regiones alejadas geográficamente, como lo evidencia el caso de la costa de Golfo Nuevo (noreste de Chubut) donde se hallaron artefactos de obsidiana proveniente de un sitio precordillerano de Santa Cruz (Gómez-Otero *et al.*, 2006) o por ornamentos de bronce provenientes del NOA, encontrados en los entierros (Gómez Otero *et al.*, 2003).

4.2.3.3 Región de la meseta patagónica

La región de la meseta patagónica extra andina es una zona esteparia, con escaso régimen de lluvias y tiene como límite este el océano Atlántico. Sin embargo, los ríos que la cruzan con sus cursos en sentido oeste a este hasta la Costa Atlántica, conforman excelentes, sitios para la ubicación de poblaciones que aprovechan de sus recursos.

Para el sudoeste de Chubut y noroeste de Santa Cruz durante el Holoceno tardío se habrían dado condiciones de mayor aridez que en el Holoceno Medio, disminuyendo las zonas con disponibilidad de agua, lo que habría conducido a una reorganización de los asentamientos humanos en torno a las fuentes de agua y en consecuencia a una disminución en la movilidad residencial (Goñi, 2000). Esta región presenta una diversidad de ríos importantes como el Río Mayo y el Río Pinturas. En los cañadones formados en torno a los mismos se formaron cuevas y aleros óptimos para el uso como abrigos y lugares de vivienda para las poblaciones que habitaban la región (Gradin *et al.*, 1976).

Estos grupos humanos eran cazadores recolectores con posibles circuitos de movilidad estacional y un gran rango de acción (Gradin *et al.*, 1979). Para esta región Cueva de Las Manos, según Gradin y Aguerre (1999) habría sido la “cabecera” de un grupo de sitios dispuestos geográficamente cercanos entre si y proponen que el Alero Mazquiarán podría ser ejemplo de ellos y haber albergado a un grupo humano pequeño.

4.2.3.3.1 Sitio Alero Mazquiarán, sudoeste de Chubut

El sitio Alero Mazquiarán (ubicación: 45° 44' 15" Lat. S y 70° 25' 9" Long. O) es un ejemplo de lo mencionado anteriormente. Se encuentra localizado en la estancia Don José en Río Mayo, al sudoeste de la Provincia de Chubut. Está ubicado en un abrigo rocoso en una de las extremidades de un cañadón. En esta región se halló un entierro múltiple compuesto por restos esqueléticos de 5 individuos, más paquetes de huesos de fauna y escasos objetos líticos. Las campañas para recuperar los restos encontrados en el lugar fueron llevadas a cabo por la Dra. Pérez de Micou y la Dra. Aguerre durante el periodo 2004 – 2005 (Pérez de Micou, 2009).

Para este trabajo, se cuenta con fragmentos de costilla de dos individuos (AMZ 1 y AMZ 5, Tabla 5). El entierro del individuo AMZ 1 parecería ser secundario y el individuo AMZ 5 se encontró en el estrato inferior y estaba envuelto en un poncho, conservado en buen estado (Fig.16)

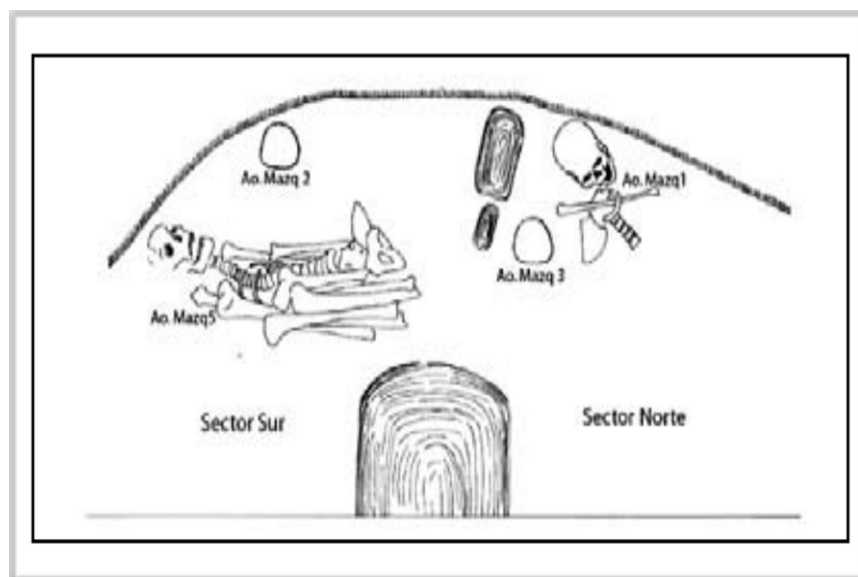


Figura 16. Imagen tomada y modificada de Bernal y Aguerre (2009) en la que se muestra la disposición en el entierro de los esqueletos analizados en este estudio.

Los análisis de isótopos estables realizados indicaron que los individuos parecerían haber consumido una dieta con base en recursos terrestres, al igual que lo evidenciado para otros estudios similares en muestras patagónicas. Además no se encontraron caries lo que estaría indicando una dieta con bajas proporciones de azúcares y almidón (Bernal y Aguerre, 2009).

Por su parte, los fechados radiocarbónicos obtenidos para los coirones (especie cespitosa de la familia de las gramíneas) que cubrían el entierro y para el poncho de lana que cubría al individuo hallado en la parte más inferior indicarían una edad de 210 ± 70 años AP y 212 ± 35 años AP respectivamente, lo que ubicaría a estas muestras entre el último siglo de la etapa colonial y la formación del Estado Nacional (Pérez de Micou, 2009). Los entierros con presencia de textiles y adornos de metal, patrón descrito para otros entierros de la región, denotan la coexistencia de araucanos con tehuelches (Bernal y Aguerre, 2009).

Tabla 5: Descripción de las muestras analizadas del Alero Mazquiarán

Muestra	Descripción*	Sexado morfológico	Pieza esquelética	Sitio Arqueológico
AMZ1	individuo 1	Masculino	costilla	Alero Mazquiarán
AMZ5	individuo 5	Masculino	costilla	Alero Mazquiarán

* corresponde a los individuos descritos por Bernal y Aguerre (2009)

4.2.3.3.2 Sitio Cañadón del Río Pinturas, Santa Cruz

La Cueva de Las Manos de la estancia Alto Río Pinturas, al noroeste de la provincia de Santa Cruz, es considerada como uno de los sitios más relevantes a nivel arqueológico de la Patagonia por el arte rupestre que presenta. Este sitio fue

mencionado por primera vez por el Padre de Agostini en 1941 y luego a partir de la década del 70' intensamente estudiado por el Dr. Gradin y la Dra. Aguerre (Gradin *et al.*, 1976).

En esta región del curso medio del Río Pinturas los autores antes mencionados hallaron un enterratorio múltiple de tipo “chenque” en las proximidades del Puesto El Rodeo (46° 53' Lat. S y 70° Long. O), ubicado en la margen derecha del cañadón. El entierro estaba compuesto por 3 individuos, en diferentes estratos y aparentemente de diferentes temporalidades. El Esqueleto 1 es el más superficial, se encontraba envuelto en cuero o “retobo” lo que ayudó a mantener su preservación. Por debajo del mismo se encontraba el Esqueleto 2 cubierto por restos de vegetación los cuales fueron datados en 1280 ± 90 años AP. Unos 30 cm más abajo, yacía el Esqueleto 3 en condiciones de preservación muy precarias. El carbón encontrado en el mismo estrato fue datado en 4860 ± 150 años AP.

En esta tesis se analizaron una pieza molar de los esqueletos 1 y 2, y un fragmento de costilla del individuo 3. Además se incluyó en los análisis un molar de un individuo de la misma región del Río Pinturas, sin fechado ni contexto (Tabla 6).

Tabla 6. Muestras analizadas de la región del Río Pinturas

MUESTRA	DESCRIPCIÓN	PIEZA ESQUELETAL ^Δ	SITIO ARQUEOLÓGICO
RP1	INDIVIDUO 1	3 MID	Cañadón Río Pinturas, El Rodeo, Santa Cruz
RP2	INDIVIDUO 2	3 MSD	Alto Río Pinturas, El Rodeo, Santa Cruz
RP3	INDIVIDUO 3	FRAGMENTO DE COSTILLA	Cañadón Río Pinturas, El Rodeo, Santa Cruz
RP4	-----	3 MSD	Perito Moreno, Río Pinturas, Santa Cruz

^Δ Para las piezas dentales: son 3° molares (M), I=inferior; S= superior y D=derecho

4.3 Permisos y consideraciones sobre las muestras analizadas

4.3.1 Muestras de Puna Jujeña

La autorización para el análisis de las muestras procesadas de Puna de la colección Doncellas del Museo Etnográfico “Juan B. Ambrosetti” de la Facultad de Filosofía y Letras de la Universidad de Buenos Aires fue obtenida por el Dr. Cocilovo quien en el marco del proyecto FONCYT (PICT: 02210/07) “El Poblamiento Antiguo del Área Andina Centro Meridional. Origen y Evolución de las Poblaciones Nativas: Interacciones Biosociales, Aislamiento, Dispersión y Diferenciación”, y en forma conjunta con la Dra. Fuchs realizaron paralelamente un análisis morfológico de los cráneos además de obtener las dataciones que se incluyen en estas tesis. Las piezas cuyo análisis ha concluido han sido restituidas a la colección del Museo Etnográfico con el correspondiente informe de análisis.

4.3.2 Muestras transición Pampa y Patagonia

El Dr. Gustavo Martínez es responsable del estudio del sitio arqueológico Paso Alsina 1 y cuenta con los permisos correspondientes. En conjunto con el Dr. Gustavo Flensburg, solicitaron el análisis genético de las muestras antes mencionadas.

4.3.3 Muestras de la Patagonia

Las muestras fueron recuperadas en el marco de los proyectos “Estudio integral del poblamiento prehistórico e histórico del Parque Nacional Los Alerces y Análisis del Poblamiento Prehistórico e Histórico del Parque Nacional Los Alerces. (Área del valle del Río Desaguadero)- Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de la Patagonia SJB, de Comodoro Rivadavia/Administración de Parques Nacionales- 1985/1999” dirigido por la Lic. Gloria Arrigoni.

Las muestras de Rada Tilly obtenidas fueron cedidas gentilmente por la Lic. Gloria Arrigoni quien es responsable de la sección Arqueología del Museo Regional de Rada Tilly.

Las muestras del Alero Mazquiarán fueron cedidas para realizar estudios genéticos por la Dra. A. M. Aguerre quién recolectó las mismas en el marco de los proyectos de investigación “Arqueología, paleoambiente y antropología biológica de Patagonia Central, Argentina” (PIP 02466- 2004) e “Investigaciones interdisciplinarias del Holoceno Tardío en Patagonia Central: arqueología, antropología biológica y geología” (PICT Agencia 01527).

Las muestras procedentes del sitio Puesto El Rodeo y Rio Pinturas fueron recolectadas por C.J. Gradin y A.M. Aguerre durante los años 1985-1988 en trabajos de campo realizados en el marco de Proyectos de Investigación y Desarrollo del CONICET (3910801-1985 y 3038100-1988) y de Proyectos de la Secretaria de Ciencia y Técnica de la Facultad de Filosofía y Letras de la Universidad de Buenos Aires (SECYT UBA-1985).

Todas las muestras analizadas en esta tesis no han sido reclamadas por ninguna comunidad originaria hasta el momento, siendo cada uno de los arqueólogos e instituciones mencionadas, los encargados de su cuidado y protección. Adicionalmente, este proyecto fue autorizado y avalado por las autoridades del Centro de investigaciones (CEBBAD) y por el Comité de Ética de la Universidad Maimónides, donde se llevaron a cabo los estudios de la presente tesis.

4.4 Selección de las muestras

En los estudios de ADN_a pueden emplearse diferentes materiales biológicos para obtención del mismo, aunque las más frecuentes son los huesos largos de las extremidades y las piezas dentales. Estos restos esqueléticos presentan un proceso de descomposición *post-mortem* diferencial respecto a otras

partes del cuerpo, conservando mejor el ADN, probablemente por la menor humedad que retienen y la barrera física que presentan contra microbios por su mayor proporción de cristales de hidroxiapatita (Gilbert *et al.*, 2005).

Los huesos presentan mayor porosidad que los dientes por lo cual en los procedimientos de extracción de los mismos en el sitio arqueológico o en el mismo laboratorio, si se realizan lavados de la superficie de las piezas para limpiarlas se corre el riesgo de arrastrar material genético exógeno hacia su interior. Por lo tanto, existe un consenso en que el uso de piezas dentales es más adecuado, siempre que sea posible, por ser donde el ADN se preserva mejor (Pilli *et al.*, 2013; Cardozo *et al.*, 2014).

El mayor problema asociado a la selección de piezas dentales para análisis de ADN es la poca cantidad de dentina disponible debido al tamaño de los dientes y la necesidad de conservación de estas partes esqueléticas para otros estudios bioantropológicos, relacionados con dieta, estado de salud bucal y determinación de la edad. Una posible solución a estos problemas es la utilización de terceros molares, que son las piezas dentales de mayor tamaño y suele ser la menos utilizada en los estudios bioantropológicos. Puede suceder que en los sitios arqueológicos no se cuente con la presencia de piezas dentales, que éstas estén en mal estado o que la corona se haya deteriorado. En esos casos se procede a la selección de piezas óseas, preferiblemente los ya señalados. En consecuencia siempre es necesario realizar una evaluación anterior al muestreo y seleccionar las piezas en relación a la disponibilidad y el estado de conservación con el fin de aumentar las posibilidades de éxito en la tipificación genética de cada individuo.

Por todos estos motivos, para esta tesis se seleccionaron piezas dentales (especialmente terceros molares siempre que fuera posible y en su defecto premolares), teniendo en cuenta el estado de preservación de la corona y la ausencia de caries. En el caso en que éstas no estaban disponibles en buen estado o estaban ausentes, como es el caso de la colección a cargo de la Dra. Aguerre se decidió tomar una muestra de costilla (generalmente la más pequeña) o un fragmento de ella en algunos individuos.

Capitulo 5: Metodología empleada en el estudio de ADN a de las muestras prehispanicas

5.1 Medidas de prevención de contaminación en el laboratorio de ADNa

En este trabajo se tomaron las precauciones necesarias para el trabajo con ADNa propuestas por Kemp y Glenn-Smith, (2010), Crespo *et al.* (2010), Pickrell y Reich, (2014). Existe un consenso generalizado sobre los recaudos a tener en cuenta antes de realizar el análisis genético de restos arqueológicos:

- 1** Es necesario que el laboratorio donde se manipulan las muestras antiguas esté separado del laboratorio donde se realizan las técnicas de PCR y el lugar de procesamiento de los resultados obtenidos. A su vez este laboratorio debe estar aislado de aquel donde se realizan análisis de ADN humano actual.
- 2** Todo el material utilizado dentro del laboratorio debe ser previamente lavado con hipoclorito de sodio al 6%, alcohol al 70% e irradiado por al menos 45 min. de cada lado con luz UV⁹ (Fig. 17). El agua para limpiar las muestras debe ser calidad biología molecular, al igual que el agua utilizada para preparar cualquier reactivo necesario. Este procedimiento se realiza cada vez que va a ser utilizado el material. Los tubos de plástico a utilizar, sí bien vienen libres de ADN directo de fábrica, son previamente esterilizados en autoclave e irradiados con luz UV. El autoclavado no puede realizarse en las puntas descartables de las micropipetas denominadas tips, por lo que solamente son irradiadas, al igual que las cápsulas de Petri y las pipetas Pasteur.
- 3** Además los investigadores involucrados en el procesamiento de las muestras deben utilizar la indumentaria adecuada como barbijos, cofias, doble par de guantes estériles y guardapolvos todo debidamente irradiado con luz UV para su descontaminación. Es recomendable, para minimizar las

⁹El sistema de luz ultravioleta (UV) transfiere energía electromagnética desde una lámpara de vapor de mercurio al material genético de cualquier organismo, sobre todo microorganismos. Cuando la radiación UV penetra en las paredes de la célula destruye la habilidad de reproducción de la misma.

probabilidades de contaminación, que una sola persona sea responsable del procedimiento de extracción, purificación y amplificación del ADN.

- 4 Todos los reactivos, soluciones y enzimas fueron preparadas dentro del laboratorio de ADN. Los equipos de reactivos comerciales empleados también fueron abiertos y utilizados exclusivamente en el laboratorio de ADN.
- 5 Todo el personal del laboratorio de ADN fue tipificado para los marcadores estudiados en este trabajo con el fin de comparar los perfiles genéticos obtenidos de las muestras y así poder validar los resultados. Además al personal del área de genómica del INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria) donde se enviaron las muestras de ADNmt para su secuenciación, se les solicitaron los perfiles de los controles utilizados en el procedimiento.

5.2 Criterios de control y autenticación de los procedimientos y resultados de ADN

Como se mencionó en el punto anterior, el continuo control de posibles eventos de contaminación es de crucial importancia en estudios con material antiguo, sobre todo como primer método para validar los resultados obtenidos. A continuación se describirán algunos conceptos y criterios a tener en cuenta utilizados a la hora de realizar estudios en arqueogenética:

- 1) Para cada muestra se realizó un control “blanco” como testigo en cada protocolo de extracción, con los mismos reactivos y procesos utilizados en las mismas pero sin la alícuota de ADN.
- 2) Para evitar contaminaciones cruzadas entre las muestras, cada una de ellas fue extraída por separado, y se utilizaron al menos tres protocolos de

extracción distintos con las distintas alícuotas del polvo obtenido para cada una.

- 3) En cada amplificación por PCR se realizó un “blanco” de reacción como testigo de posible contaminación en la mezcla de reactivos de esta técnica. Además en cada amplificación realizada se involucraron los blancos de extracción de cada muestra para evidenciar si hubo contaminación durante la obtención del ADN o si alguna de las soluciones utilizadas en esa parte del procedimiento poseía restos de ADN.
- 4) Además, para corroborar que la amplificación por PCR y los reactivos utilizados, como por ejemplo los cebadores, hayan funcionado una vez preparados los tubos con las muestras de ADN, en el laboratorio de ADN moderno se prepararon controles con ADN de muestras actuales, y se incorporaron en la reacción de amplificación.
- 5) Se tomaron como resultados válidos para cada muestra aquellas tipificaciones por RFLP que hayan sido idénticas en al menos dos extracciones. Para los 3 segmentos solapantes de la HVR I se utilizaron aquellos que sus mutaciones se reproducían en al menos dos extractos diferentes. Esto se realizó para evitar incorporar mutaciones erróneas, ya sea por falla de lectura durante la secuenciación o por daño post-mortem a las bases.

5.3 Metodología empleada para la obtención y análisis de ADN

En las investigaciones que emplean material arqueológico no se utilizan los mismos protocolos en todos los laboratorio, generalmente éstos dependen del tipo de material a analizar. Si bien ciertas condiciones deben cumplirse estrictamente, muchas prácticas relacionadas con el proceso de descontaminación de las piezas, la extracción y método de obtención del ADN de los tejidos y su tipificación posterior pueden variar. La utilización diferencial de protocolos puede ocurrir

incluso dentro de un mismo laboratorio según las condiciones de cada muestra. Por esta razón la puesta a punto de los protocolos es una tarea constante que se debe precisar antes de cada estudio, y se debe ir ajustando a medida que se va observando el rendimiento de los mismos.

En los estudios de ADNa, a diferencia de los trabajos con poblaciones actuales, cada muestra es tratada individualmente, requiriendo un procedimiento específico y laborioso.

5.3.1 Preparación de la muestra. Las superficies de las piezas dentales fueron descontaminadas sumergiéndolas por 5 minutos (min.) en hipoclorito de sodio al 6% en un tubo Falcon de 15 ml. Luego se enjuagaron varias veces con agua calidad biología molecular y se colocan en una caja de petri estéril, dentro de una campana aislada que posee luz UV para irradiarla durante 45 min. de cada lado (Fig.17).



Figura 17. Laboratorio de ADNa irradiándose con luz UV todo el cuarto. Además dentro de la campana de trabajo existe otra lámpara UV donde se irradia el material a utilizar.

Este primer paso se realiza para eliminar posibles fuentes de contaminación con ADN exógeno como puede ser el proveniente de los investigadores que manipulan las muestras, o el ADN de microorganismos propios del suelo donde estaban depositadas.

A continuación se procedió a la obtención del polvo de dentina. Para ello cada pieza es sujeta con una morsa previamente tratada para eliminar ADN exógeno contaminante. Se realizó un corte transversal en la unión de la corona con la raíz empleando un disco de corte de 23,8 mm con un minitaladro Dremel 3000 y se procedió al desbaste de la pulpa del interior de la pieza utilizando la misma herramienta pero esta vez con una fresa de punta fina (figura 18). El polvo que se iba obteniendo fue recolectado en tubos Eppendorf de 1,5 ml estériles e irradiados. Las alícuotas fueron de entre 70 a 100 mg de polvo, y se obtuvo en total un promedio de 400 mg por muestra. Este paso facilita la obtención del material genético durante el procesamiento posterior ya que al obtenerse polvo se aumenta la superficie de contacto con las soluciones de extracción. Una vez finalizada la recolección del polvo de dentina, las muestras fueron conservadas en bolsas herméticas descontaminadas a -20°C en un freezer propio del laboratorio de ADNa.

Para el caso de los fragmentos de costilla, la superficie primero fue pulida con un minitaladro Dremel 3000 para eliminar la capa más externa. Sobre todo porque presentaba una capa de laqueado realizado previamente por el personal encargado de la colección. Luego fue lavada muy suavemente con un hisopo con lavandina al 6% y enjuagada con agua calidad biología molecular. De las costillas enteras se obtuvo una porción de aproximadamente 200 mg cortando con el mismo minitaladro. Ese fragmento fue congelado a -80°C y luego pulverizado en mortero de cerámica previamente esterilizado e irradiado. Al exponer la pieza a temperaturas de congelamiento, se favorece la cristalización de las moléculas que conforman el hueso facilitando la pulverización. En el caso en que solo se contaba con un fragmento de costilla, se realizó el mismo procedimiento pero con el total de la muestra. El polvo obtenido fue recolectado en tubos Eppendorf estériles en

alícuotas de 100 mg aproximadamente y preservadas del mismo modo en que fue descrito para las piezas dentales

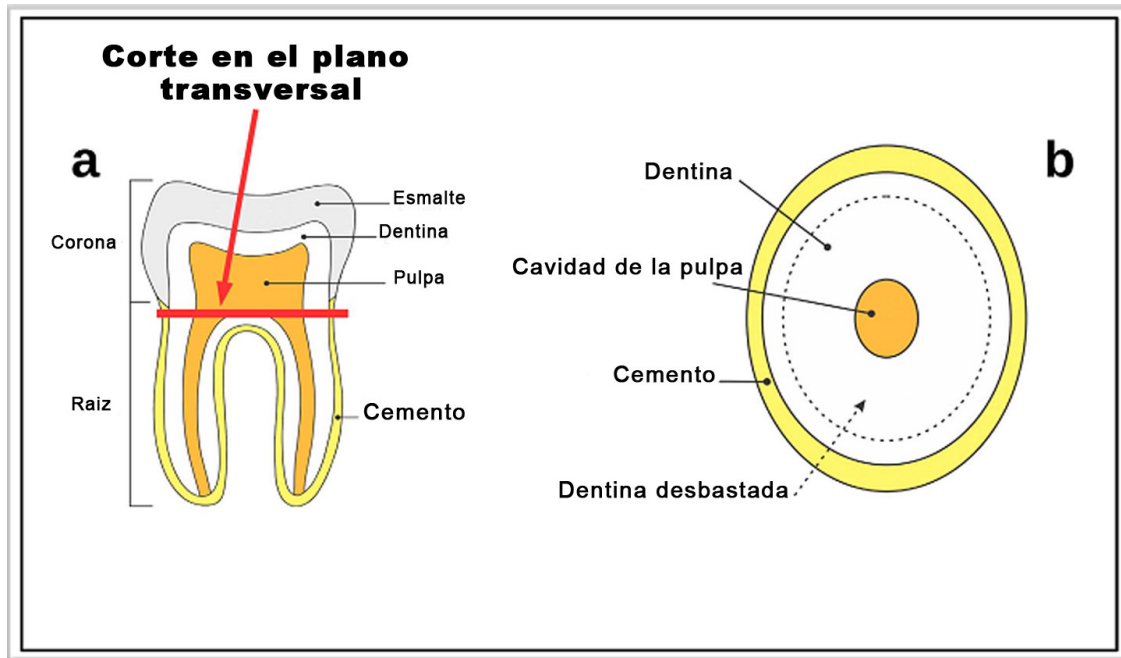


Figura 18: a) Esquema del corte que se le realiza a las piezas dentales. b) composición interna de la pieza dental. En línea punteada se indica el área de dentina desbastada. Figura tomada y modificada de Damgaard et al., 2015

5.3.2 Extracción de ADN Este paso es probablemente el más importante y crucial en todo el análisis. Si algún proceso falla, puede reducirse o hasta destruirse la información potencial que ha sido conservada durante mucho tiempo en la pieza arqueológica a analizar y que va a ser utilizada en los próximos pasos. Por esta razón, se ha generado debate acerca de cuál es el método de extracción más apropiado (Hummel, 2003). En este estudio utilizamos sólo aquellos que consideramos más apropiados para el tipo de muestras con el que contamos.

Para cada muestra se realizaron al menos tres extracciones de ADN utilizando diferentes métodos. Siempre se utilizó para cada extracción entre 75 y 100 mg del polvo obtenido en el paso anterior. Además en cada protocolo de

extracción se realizó un “blanco” como control de contaminación de extracción, el cual fue sometido al mismo procedimiento que la muestra.

Las extracciones de ADN a partir del polvo obtenido se realizan por el método de fenol – cloroformo – alcohol isoamílico (25:24:1) modificado del protocolo descrito por Green y Sambrook, 2012 y luego purificados con el equipo AccuPrep PCR purification Kit (BIONEER). También se implementó un método de extracción que aprovecha el EDTA que se descarta del método de fenol-clorofomo-Alcohol isomálico. Además se han empleado dos equipos comerciales: QIAamp DNA Investigator Kit (Quiagen) utilizado para investigaciones forenses y Genclean (MP Biomedicals), ambos basados en extracción de ADN mediante columnas de sílica. Estos dos últimos se emplearon siguiendo las indicaciones del fabricante. La elución final en todos los protocolos se realizó utilizando agua calidad biología molecular en lugar de los buffer propuestos por los kits. Todos los protocolos se detallan en el capítulo de Material suplementario.

5.3.3 Tipificación de Haplogrupos del ADNmt mediante RFLP

El descubrimiento de enzimas de restricción o endonucleasas de origen bacteriano que cortan el ADN doble cadena en secuencias de 4-8 pb condujo al desarrollo de la técnica conocida como *Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLPs)*, por sus siglas en inglés) para la obtención y diferenciación de fragmentos del material genético de distinto tamaño. La presencia o ausencia de sitios de reconocimiento para una enzima en cierto locus se da debido a la mutación de una base nitrogenada y eso en consecuencia determina el tamaño de los fragmentos en que resultará digerido el ADN. Las diferencias encontradas se observan mediante electroforesis.

Por su parte, la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) creada por Mullis *et al.* (1987) ha permitido un salto cualitativo en los estudios moleculares dada la posibilidad de duplicar la cantidad de ADN luego de cada ciclo de amplificación. Esta reacción consiste en ciclos de 3 temperaturas diferentes. La

primera es la temperatura de deshibridación de las hebras complementarias de ADN, la cual generalmente es de 94 o 95°C. Luego la temperatura baja hasta aquella óptima para la unión de los cebadores empleados, dependiendo de la cantidad de bases C y G que poseen y de su longitud. La última temperatura es de 72 o 73°C y es a la cual se activa la enzima Taq Polimerasa y comienza la elongación de las nuevas cadenas sintéticas de ADN. Esta enzima termoestable, proveniente de una bacteria que vive en aguas termales, conocida como *Thermus aquaticus* y al uso de cebadores (secuencia sintética de bases nucleotídicas utilizadas como inicio para la unión de más bases por la polimerasa en la replicación de ADN). El número de ciclos varía dependiendo de la muestra. En el caso del ADN a estar posiblemente fragmentado en segmentos pequeños esta reacción se debería realizar entre 35 a 50 ciclos (Hummel, 2014) de modo tal que los segmentos cortos de entre 150 y 250 pb o menores amplifiquen, debido a que rara vez el ADN presente en los restos arqueológicos supera esos tamaños.

Durante el procedimiento de este análisis primero se realizó una asignación de las muestras a cada uno de los Hgs amerindios A, B, C y D utilizando los cebadores publicados por Stone y Stoneking (1993) (Tabla 7).

Tabla 7. Cebadores utilizados para cada Haplogrupo junto a la posición complementaria del ADNmt a la cual se ensamblan y el tamaño de los fragmentos obtenidos en la amplificación con los mismos.

Hg	Cebadores	Posición en el ADNmt	Tamaño del segmento amplificado (pb)
A	F:5' ACCTCCTCAAAGCAATACACTG 3'	590 - 611	176
	R:5' GTGCTTGATGCTTGTTCCTTTTG 3'	743 - 765	
B	F: 5' ACAGTTTCATGCCCATCGTC 3'	8196 - 8215	121
	R: 5' ATGCTAAGTTAGCTTTACAG 3'	8297 - 8316	
C	F: 5' GCGCCTTACACAAAATGACATCAA 3'	13208 - 13232	209
	R: 5' TCCTATTTTTTCGAATATCTTGTTTC 3'	13393 - 13416	
D	F: 5' TAACTACTACCGCATTCCTA 3'	5101 - 5120	149
	R: 5' AAAGCCGGTTAGCGGGGCA 3'	5230- 5249	

Luego, al obtener un porcentaje de recuperación de resultados escaso en los primeros análisis se procedió a la modificación del protocolo incorporando pares de cebadores que amplifican segmentos de menor cantidad de pares de bases (Tabla 8). Las enzimas de restricción utilizadas se seleccionaron dependiendo del SNP de la región codificante del ADNmt específico de cada linaje (Tabla 8). El A se define por la ganancia de un sitio para la enzima Hae III en la posición 663; el haplotipo B por la delección de un fragmento de 9 pb en la región intergénica COII/tRNA^{LYS} o región V, por lo que no precisa digestión con enzimas de restricción. Por su parte el Hg C por la pérdida de un sitio para la enzima Hinc II en la posición 13259 y el D por la pérdida de un sitio para la enzima Alu I en la posición 5176.

La reacción de amplificación por PCR para cada uno de los 4 Hgs se realizó en un volumen final de 12,5 ul conteniendo: 1x de GoTaq® reaction buffer, 1,5 mM de MgCl₂ (Promega), 0,2mM de cada dNTP (thermo Scientific), 0,8 uM de cada cebador (Invitrogen) (Tabla. 7), 1,25U de GoTaq® DNA polymerase (Promega) y 5 ul de ADNa.

El programa de amplificación por PCR utilizado consiste en: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 94°C por 5 min. seguido de 45 ciclos de 3 pasos cada uno: i. 45 segundos a 94°C, ii. 45 segundos a 53°C para el anidamiento de los primers al ADN molde desnaturalizado y iii. 45 segundos a 73°C para que la Taq Polimerasa comience a fabricar o elongar las nuevas hebras de ADN. Por último se realiza un último paso de extensión de la elongación durante 5 min. a 73°C.

Para las amplificaciones realizadas de cada Hg primero se corroboró el buen desarrollo de la reacción sometiendo las muestras a electroforesis¹⁰ en gel de agarosa al 1%. A continuación, aquellas muestras que presentaban banda de ADN fueron digeridas con la enzima de restricción adecuada (Tabla 7) para los Hgs A, C y D. Este procedimiento consistió en la adición, a cada tubo de muestra

¹⁰La electroforesis es una técnica en la cual utilizando soportes sólidos como geles de agarosa, geles de poliacrilamida o placas de acetato de celulosa, permite separar biomoléculas esencialmente por su forma y tamaño , sometiéndolas a un campo eléctrico.

amplificada, de 10 ul de una solución de digestión que contiene: el buffer 5X de estabilización provisto con cada enzima, 1 unidad de enzima de restricción y agua calidad biología molecular. Esta mezcla se dejó incubando a 37°C durante toda la noche.

Tabla 8. Enzima de restricción y cebadores utilizados en RFLP para cada haplogrupo junto al tamaño del segmento amplificado y los tamaños de los frgmentos generados por el corte con dichas enzimas.

Hg	Marcador Estudiado ¹	Cebadores	Bibliografía	Segmentos (pb)
A	HaeIII + 663	F:628-648 y R: 688-707	Fehren-Schmitz et al., 2010	80 (35 y 45)*
B	Del 9pb	F:8250 y R:8289-8310	creado por nuestro equipo	61 o 52 con delección
C	HincII - 13259	F:13177-13195 y R:13265-13289	Fehren-Schmitz et al., 2010	113 (82 y 31)*
D	AluI - 5176	F:5112-5137 y R:16185-5207	Fehren-Schmitz et al., 2010	96 (31+65)*

1. El símbolo indica la presencia (+) o ausencia (-) del sitio de corte para cada enzima de restricción.

* Se describe el tamaño del fragmento total y entre paréntesis el tamaño de cada fragmento si está presente el sitio de restricción para cada enzima.

La tipificación de los Hgs culmina con la electroforesis de las digestiones enzimáticas de A, C y D, y el amplificado del Hg B durante 60 a 90 min. en geles de poliacrilamida¹¹ al 12%. Este tipo de gel, a diferencia de los de agarosa, permiten una resolución y discriminación entre bandas que se diferencian hasta por una sola base nucleotídica. Está compuesto por: una proporción 29:1 de acrilamida – bisacrilamida, buffer TBE 10X, agua calidad biología molecular, Persulfato de Amonio (APS) al 10% y N,N,N,N'-tetrametilen-diamina (TEMED, Life Technologies) al 1%.

¹¹Los geles de poliacrilamida se forman por la polimerización del monómero acrilamida y del monómero intercalador N,N'-metilen-bis-acrilamida. Estos dos compuestos en presencia de oxígeno, APS y TEMED generan un polímero poroso por el cual tendrán que migrar las moléculas de ADN dependiendo de su estructura, tamaño y carga electrónica. Las concentraciones de los reactivos varían de acuerdo a la necesidad del estudio.

5.3.4 Secuenciación de la HVR I de la región control del ADNmt

Sanger *et al.* (1977) propusieron un método de secuenciación de ADN determinando la secuencia de bases nucleotídicas de fragmentos de hasta aproximadamente 200 pb. Esta técnica se basaba en la síntesis de hebras hijas marcadas en su extremo y que difieren en longitud por un nucleótido. Esto se lograba utilizando una enzima polimerasa proveniente de la bacteria *E.coli* y 2',3'-didesoxirribonucleótidos (ddNTP), que a diferencia de los nucleótidos normales (dNTPs), carecen de un grupo hidroxilo 3' y en consecuencia, no generan un enlace fosfodiéster con el dNTP siguiente finalizando la cadena (figura 19). Los ddNTPs además, estaban marcados y de este modo las hebras que se iban formando se podían detectar mediante electroforesis (Hummel, 2003; Lodish *et al.*, 2005).

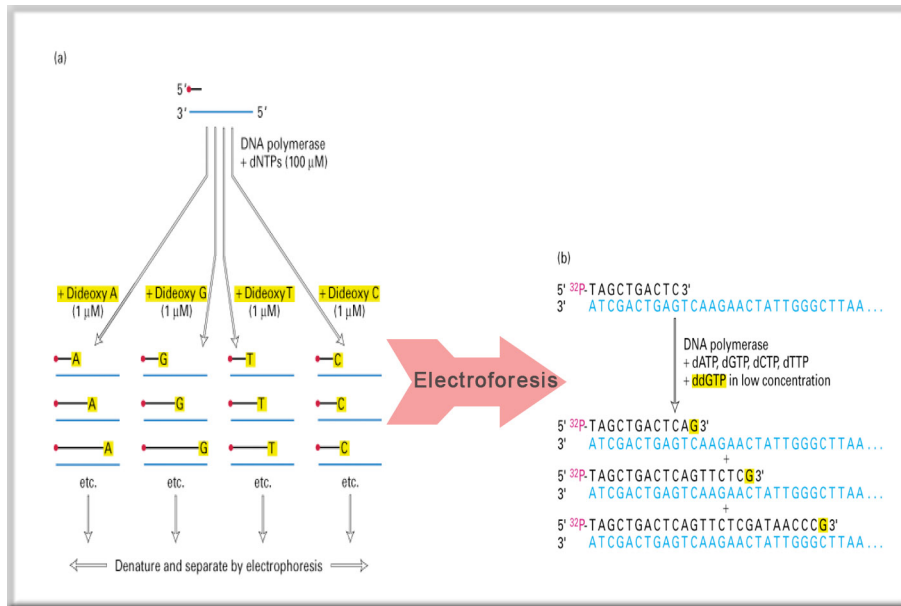


Figura 19: Tomada y modificada de De Necochea Campion *et al.* 2004. Ejemplificación de la adición de ddNTPs a las hebras complementarias en formación para la secuenciación de ADN.

Con el tiempo las técnicas de secuenciación fueron mejorando y se automatizaron, obteniendo como resultado un mayor número de secuencias en simultáneo y de fragmentos con mayor longitud pero el fundamento de este nuevo mecanismo es el mismo que el propuesto por Sanger *et al.* La diferencia primordial es que las cadenas de ADN que se van formando adhieren marcadores fluorescentes de terminación y en consecuencia pueden ser detectadas automáticamente por un haz de luz mientras que el patrón que se va obteniendo es codificado por un programa de computadora. Además el tamaño de los fragmentos obtenidos pasó a ser de 500 a 1000 pb. Esto permitió estudiar varias mutaciones en paralelo aumentando la resolución y afinando las comparaciones entre poblaciones.

Habiendo realizado una breve introducción a la metodología existente para la secuenciación de ADN, para obtener secuencias de la región HVR I del ADNmt en este estudio, se procedió con la amplificación por PCR de esta región en tres fragmentos solapados de menos de 200 pb que comprenden desde la posición 15984 a la 16410 del genoma mitocondrial utilizando los cebadores: F15984 (5'-TAG CAC CCA AAG CTA AGA TTC TAA T-3' modificado a partir de F15989, Gabriel *et al.*, 2001) y H16167 (Ricaut *et al.*, 2004); L16120 (Adachi *et al.*, 2004) y R16239 (Ivanov *et al.*, 1996); F16204 (5'-GCA AGT ACA GCA ATC AAC CCT-3', diseñado por nuestro equipo de trabajo) y R16410 (Gabriel *et al.*, 2001).

El protocolo que emplea estos cebadores fue aplicado luego de realizar las primeras amplificaciones de las secuencias con otros que ya estaban siendo utilizados por el equipo y se basaba en la amplificación de 2 fragmentos solapantes más largos (Tabla 9) y por tanto más difíciles de obtener en el material antiguo, por lo que el rendimiento de los resultados era desfavorable, y en consecuencia se desestimó su uso.

Tabla 9. Cebadores utilizados en los primeros fragmentos de secuenciación de HVR I del ADNmt

Segmentos de HVR I	Cebadores*	Posición en el ADNmt	Tamaño del segmento amplificado
1	F:5' CCCAAAGCTAAGATTCTAAT 3'	15989 - 16008	270
	R:5' TGGCTTTGGAGTTGCAGTTG 3'	16239 - 16258	
2	F: 5' CCCCATGCTTACAAGCAAGT3'	16190 - 16209	221
	R: 5' GAGGATGGTGGTCAAGGGAC 3'	16391 - 16410	

*Cebadores tomados de Carnese *et al.*, 2010.

El cebador F16204 se diseñó utilizando el programa Primer3 disponible en <http://simgene.com/Primer3> y luego la función *primer-BLAST* disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> para su corroboración de pegado específico a la porción HVR I en humanos.

Las reacciones de PCR esta vez se llevaron a cabo para cada uno de los 3 segmentos en un volumen de 25µl conteniendo: 1X de Hot Start PCR Buffer (Thermo SCIENTIFIC), 2mM de MgCl₂ (Thermo SCIENTIFIC), 0,4µM de cada par de cebadores (Invitrogen), 0,2mM de cada dNTP (Thermo SCIENTIFIC), 1U de Máxima Hot Start *Taq* DNA Polymerase (Thermo SCIENTIFIC) y 5µl de la muestra de ADNa como templado. En cada amplificación se incluyeron los “blancos” de extracción, un “blanco” de reacción de PCR y los controles modernos ya mencionados.

Para la PCR de amplificación se utilizó un programa de: 1 ciclo de 5 min a 94°C, seguido de 45 ciclos compuestos por tres pasos: i. 45 seg. a 94°C, ii. 45 seg. a 54°C, iii. 45 seg. a 72°. Para finalizar se realizó un último paso de extensión de la elongación por 7 minutos a 72°C.

5.3.5 Preparación de la muestra para secuenciación de HVR I

Para observar los productos de amplificación se realizó una electroforesis en geles de agarosa al 1% y una cuantificación aproximada comparando con

diluciones 1:10 y 1:100 del bacteriófago lambda (511ug/ml, Promega). Aquellas muestras que presentaban aproximadamente 10 ug/ml fueron purificadas con el equipo AccuPrep[®] PCR Purification kit (BIONEER), siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. La única modificación fue en el último paso donde la elución de las muestras se realizó en agua calidad biología molecular en vez de buffer de elución del equipo, según lo establecido en las condiciones de envío de las muestras. Las mismas se enviaron a la Unidad Genómica del INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria) de la sede Castelar, para ser secuenciadas con los mismos cebadores empleados en la amplificación de cada fragmento antes mencionados y utilizando un secuenciador automático 3130 XL Genetic Analyzer con el equipo BigDye[™] Terminator Sequencing Kit (Applied Biosystems).

5.3.6 Análisis de las secuencias obtenidas Se obtuvieron al menos dos secuencias por muestra provenientes de diferentes amplificaciones. Las secuencias de ADNmt fueron revisadas y corregidas manualmente utilizando el programa Bioedit 2.7.5 (Hall, 2013), y se compararon con la Secuencia de Referencia de Cambridge revisada (rCRS) (Andrews *et al.*, 1999) utilizando el mismo programa. La clasificación de las muestras para los diferentes haplotipos amerindios se realizó utilizando el programa Haplogrep (Kloss-Brandstätter *et al.*, 2011) y datos tomados de la literatura (Tamm *et al.*, 2007; Achilli *et al.*, 2008, 2013; Perego *et al.*, 2009, 2010; Bodner *et al.*, 2012; de Saint Pierre *et al.*, 2012).

5.3.7 Prueba de inhibición en las muestras no amplificadas

A todas aquellas muestras que no se hayan podido amplificar para RFLP o secuenciación, se realizó una PCR para corroborar si la falta de resultados se debía a la ausencia de ADN_a en la muestra o a que las mismas presentaban inhibidores para la Taq polimerasa. La mayoría de las sustancias inhibitorias como el ácido húmico, taninos, productos de maillard y ácidos fulvicos, entre otros,

proviene del suelo donde se encontraban depositadas las muestras. La actividad de estas sustancias depende de la humedad y temperatura del ambiente y del Ph y la composición orgánica del suelo (Hummel, 2003).

Para comprobar la presencia de estos inhibidores, se realizaron PCRs donde a cada tubo con una muestra de ADN se le agregó 2 ul de ADN de una muestra actual la misma para todas las muestras. Los cebadores utilizados y la reacción de amplificación fueron las mismas que las utilizadas para la secuenciación de HVR I. En aquellos casos en que la corrida electroforética mostró que no hay banda de ADN amplificado y tampoco banda de cebadores, como suele suceder en los casos de ADN se asumió que la muestra está inhibida.

5.4 Análisis estadísticos empleados

Los análisis estadísticos llevados a cabo se dividieron en dos. Primero se analizó cada muestra en su contexto regional comparando con muestras poblacionales antiguas cercanas geográficamente disponibles en la bibliografía (Tabla 9). En segundo lugar, se realizaron comparaciones entre todas las muestras prehispánicas del actual territorio argentino con el fin de realizar una evaluación de la posible composición genética de los pobladores de nuestro país en el Holoceno Tardío.

5.4.1 Análisis de la variabilidad intrapoblacional

Para cada una de las 3 muestras poblacionales, Puna Jujeña, Paso Alsina 1 y Patagonia, teniendo en cuenta las mutaciones entre las posiciones 16024 y 16365 obtenidas, se alinearon las secuencias de todos los individuos y se generó un archivo FASTA con el programa BioEdit (Hall, 2013). Ese archivo generado se utilizó en el programa DNAsp (Librado y Rozas, 2009) el cual permite calcular los estadísticos de variabilidad que se definirán a continuación y definir los conjuntos

de secuencias para cada población, obteniendo archivos que se pueden exportar para ser utilizados en otros análisis con el programa Arlequin 3.11 (Excoffier, 1995-2006). Los estadísticos calculados para la variabilidad de cada población fueron:

- 1) Número de haplotipos (h) presente en la muestra.
- 2) Número de sitios polimórficos (S) entre los haplotipos de la totalidad de la muestra.
- 3) Diversidad Haplotípica (H_d) (Nei, 1987) y su desvío estándar. Esta diversidad se define como la probabilidad de que dos haplotipos seleccionados al azar sean diferentes entre sí. Cuanto mayor sea esta probabilidad, más diversa será la muestra.
- 4) Diversidad Nucleotídica (π) (Nei y Li, 1989) y su desvío estándar. Es la probabilidad de que dos nucleótidos homólogos elegidos al azar sean diferentes. Esta diversidad es una medida de la variabilidad existente entre dos haplotipos con alto poder de resolución, que pueden diferir por una sola mutación o por muchas de ellas.
- 5) Número Medio de Diferencias Nucleotídicas Entre Pares de haplotipos (k). Consiste en el promedio de diferencias nucleotídicas entre todos los pares posibles de haplotipos de una muestra para la que se tiene en consideración una estimación del número de mutaciones ocurridas desde la divergencia entre dos haplotipos.

5.4.2 Análisis de la variabilidad interpoblacional

Para comparar las muestras poblacionales estudiadas se realizó una recopilación de datos de secuencia de la HVR I de otras muestras precolombinas analizadas con anterioridad por otros investigadores. Al haber pocos datos publicados de ADN_a para Argentina, se utilizó información de países limítrofes y

para el caso de la muestra de NOA, además se tuvieron en cuenta muestras antiguas de Perú y Chile (Tabla 10). Las muestras señaladas en rojo son aquellas de las cuales se utilizaron sus secuencias y las frecuencias de los 4 Hgs amerindios para compara con la Puna Jujeña, y en verde aquellas utilizadas para comparar con las muestras de la Patagonia estudiadas.

Con el fin de establecer las posibles relaciones biológicas las muestras poblacionales en estudio a nivel de cada región y en una escala global de todas las muestras precolombinas de Argentina, se llevó a cabo un Análisis de la Varianza Molecular (AMOVA) que es un análisis jerárquico de la varianza molecular para evaluar la distribución de la diversidad dentro y entre grupos de poblaciones. Además se realizaron comparaciones entre pares de poblaciones a través del índice F_{ST} (mide el grado de diferenciación genético de las poblaciones o grupos poblacionales calculando las varianzas estandarizadas de frecuencias alélicas), utilizando 1000 permutaciones para obtener la significación. Ambos análisis se llevaron a cabo con el programa Arlequin 3.11 (Excoffier, 1995 - 2006). Para este análisis se utilizó el modelo evolutivo de Tamura y Nei (1993) con un valor de Gamma= 0,36.

Además se realizó un escalamiento multidimensional (MDS por sus siglas en ingles) con las distancias de Nei calculada a partir de las frecuencias haplotípicas de cada muestra poblacional, utilizando el programa NTSYSpc 2.11S (Rohlf, 1998) a fin de generar un modelo de ordenamiento que represente en dos dimensiones las relaciones de similitud y diferenciación entre las poblaciones analizadas.

Tabla 10. Muestras prehispánicas tomadas de la bibliografía para la comparación con las muestras en estudio

Muestra	País	Antigüedad (años AP)	n	% A2	%B2	%C1	%D1	Bibliografía
Pampa Grande	Argentina	1310 ± 40	19	10,53	47,37	0,00	42,10	Carnese et al. 2010
Cortaderas Derecha	Argentina	550	3	0,00	0,00	100,00	0,00	Dejean 2006
Los Amarillos	Argentina	700-483	13	69,23	7,69	7,69	15,39	Mendisco et al. 2011
Banda de Pechel	Argentina	914-669	1	100,00	0,00	0,00	0,00	Mendisco et al. 2014
Huacalera	Argentina	n.d.	1	0,00	0,00	0,00	100,00	Mendisco et al. 2014
Juella	Argentina	700-520	3	0,00	33,34	33,33	33,33	Mendisco et al. 2014
San José	Argentina	930-679	1	0,00	0,00	100,00	0,00	Mendisco et al. 2014
Sarahuaico	Argentina	786-537	2	0,00	100,00	0,00	0,00	Mendisco et al. 2014
Tilcara	Argentina	700-520	4	25,00	75,00	0,00	0,00	Mendisco et al. 2014
Huichairas	Argentina	700-414	1	100,00	0,00	0,00	0,00	Mendisco et al. 2014
Fuerte Alto	Argentina	n.d.	1	100,00	0,00	0,00	0,00	Mendisco et al. 2014
Tero	Argentina	n.d.	4	25,00	50,00	25,00	0,00	Mendisco et al. 2014
Doncellas	Argentina	662 a 568	2	0,00	50,00	50,00	0,00	Mendisco et al. 2014
Llullaillaco	Argentina	520-430	3	0,00	0,00	33,33	66,67	Wilson et al. 2007
Canal de Beagle	Argentina	?	2	0,00	0,00	50,00	50,00	Dejean et al. 2008
Fuego-Patagónicos	Chile y Argentina	200 -100	24	0,00	0,00	58,33	41,67	Garcia-Bour et al. 2004
Valles de Azapa	Chile	6000-500	26	38,46	46,16	7,69	7,69	Moraga et al. 2005
Isla Madre de Dios	Chile	250	1	0,00	0,00	0,00	100,00	Moraga et al. 2010
Isla Englefield	Chile	1700	1	0,00	0,00	100,00	0,00	Moraga et al. 2010
Canal Maule-1	Chile	920	1	0,00	0,00	0,00	100,00	Moraga et al. 2010
Capitán Diego Araceno	Chile	siglo XIX o XX	1	0,00	0,00	100,00	0,00	Moraga et al. 2010
Tompullo II	Perú	550-450	24	8,34	70,84	4,15	16,67	Baca et al. 2012
Acchaymarca	Perú	770-450	11	0,00	72,73	18,18	9,09	Baca et al. 2014
Puca	Perú	770-450	14	42,86	42,86	7,14	7,14	Baca et al. 2014
Costa y Valles (Palpa)	Perú	*	97	3,09	24,74	33,00	39,17	Fehren-Schmitz et al. 2014
Valles altos del Río Palpa y Viscas (Tranca)	Perú	*	77	5,20	54,55	29,87	10,38	Fehren-Schmitz et al. 2014
Huari	Perú	850-500	12	16,67	25,00	50,00	8,33	Kemp et al. 2009
Conchopata	Perú	1350-1150	8	25,00	50,00	12,50	12,50	Kemp et al. 2009
Cuzco	Perú	970-780	1	0,00	0,00	0,00	100,00	Luciani et al. 2006

*Periodo intermedio temprano: 1690-1310AP. – Horizonte Medio: 1310-770 AP – Periodo intermedio tardío: 770-500 AP.

5.4.3 Asociación entre la distancia genética y la geográfica de cada muestra analizada para el linaje D1

Por último se realizó una matriz de distancia genética (MEGA 6 de Tamura *et al.*, 2007) entre pares de secuencias de las muestras precolombinas de Argentina y Chile con el modelo evolutivo Tamura y Nei (1993) con un $G= 0,05$. A partir de esta matriz se realizó el Análisis de Componentes Principales (ACP) utilizando el programa R 3.0.3 para extraer los dos primeros componentes. Los valores de ACP fueron rotados para obtener el mejor ajuste con las coordenadas geográficas utilizando la función *procrustes* y *protest* del paquete *Vegan* del programa R 3.0.3. La posición geográfica de cada muestra analizada, más las coordenadas genéticas rotadas fueron representadas en un mapa utilizando la aplicación QGIS 2.2.0 Valmiera (Free Software Foundation Inc. 1989, 1991). El objetivo de este análisis es comparar dos configuraciones de puntos homólogos provenientes de dos variantes (geográfica y genética) de la misma muestra. Este análisis se realizó solo con el linaje D1 que fue el que presentó más diversidad en las muestras analizadas.

5.4.4 Construcción de redes de asociación entre haplotipos

Como otro método para establecer las posibles relaciones entre las poblaciones se construyeron redes de haplotipos para cada haplogrupo teniendo en cuenta las muestras de este estudio, las muestras precolombinas ya utilizadas y además muestras de poblaciones actuales de la cuenca del lago Titicaca, Bolivia (Barbieri *et al.*, 2011), Chiloé, Chile (Horai *et al.*, 1993), Atacameños de Chile (de Saint Pierre *et al.*, 2012), Guaraníes y Kaingang de Brasil (Marrero *et al.*, 2007), Mbyá-Guaraní de Misiones (Sala *et al.*, 2010), Coyas de Salta y Jujuy (Álvarez-Iglesias *et al.*, 2007), muestras de la Puna de Jujuy (Cardoso *et al.*, 2013), Sierras centrales de Argentina (García *et al.*, 2012), Mapuches de Argentina (Ginther *et al.*, 1993; Sala y Corach, 2014), Tehuelches de Argentina (Sala y Corach, 2014), Mapuches de Chile (Moraga *et al.*, 2000) y muestras de un grupo étnico Kaweskar

de Chile (Moraga et al., 2010). Los sitios polimórficos de cada haplotipo por grupo muestral, el número de individuos que poseen y su filiación se describen detalladamente en la tabla anexa 2. Para este fin se empleó el programa Network 4.6.1.3 (Fluxus Technology Ltd 2004-2015), se utilizó el método de median joining por ser el que presenta mayor parsimonia y se asignaron los pesos otorgados a cada sitio polimórfico según lo propuesto por Soares *et al.* (2009).

5.5 Estimación del sexo mediante un marcador molecular

La amelogenina es un gen que codifica para una proteína del esmalte dental y se encuentra situado en la Región Xp22.3 - p22.1 (cromosoma X) y en la Región Yp11.2 (cromosoma Y).

Se determinó el sexo de las muestras a partir de la amplificación del gen de la amelogenina, utilizando las mismas condiciones de ciclado que en HVR I pero con los cebadores: F: 5'-CCC TGG GCT CTG TAA AGA A-3' y R: 5'-ATC AGA GCT TAA ACT GGG AAA GAA-3' creados por el equipo de investigación y una temperatura de anidado de cebadores a 53°C.

Luego de la amplificación en una electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% se diferencian fragmentos de 106pb y 112pb de los cromosomas X e Y, respectivamente. Si el individuo es masculino se observan dos bandas cada una correspondiente al cromosoma X e Y, mientras que si la muestra es femenina, se observa una sola banda correspondiente al mismo segmento de los dos cromosomas X.

También para determinar el sexo de las muestras se procedió a realizar PCRs en tiempo real. Para tal fin se utilizaron los mismos cebadores que han sido mencionados arriba y una mezcla real lista para su uso (Biodinamics) y agua calidad biología molecular para lograr el volumen especificado en el instructivo de la mezcla. El fundamento de esta técnica es observar las diferencias en los picos máximos de la temperatura de fusión entre las muestras masculinas y las femeninas, los cuales varían debido al tamaño del segmento amplificado. Esa diferencia es de un grado centígrado, pero es fácilmente detectable. Las muestras

femeninas al poseer la delección de pares de bases presentan una temperatura de fusión de 73°C, mientras que la de las muestras masculinas es de 74°C.

El diagnóstico molecular del sexo es de suma importancia en aquellas muestras que presentan una gran degradación física y por lo tanto no puede realizarse un diagnóstico anatómico (Dominguez *et al.*, 2005)

5.6 Devolución del material arqueológico

Antes de comenzar con los análisis genéticos, previo a los lavados y procesos de descontaminación de las muestras, a cada una se le hizo una réplica utilizando una silicona de impresión Medium Thixoflex M (Zhermack clinical) para el molde y un acrílico autocurable para reparaciones Vaicel (Vaicril) que es un monómero similar a los utilizados en odontología convencional, para realizar la pieza. Luego de haber realizado todos los estudios pertinentes tal como se mencionó al principio de este capítulo, si la pieza no se fragmentó debido a su estado de preservación, la misma fue remontada para su devolución junto a la réplica utilizando el mismo material acrílico.

Capítulo 6: Resultados de los linajes maternos y análisis estadísticos

6.1 Comparación del rendimiento de los métodos de extracción empleados

Uno de los objetivos de esta tesis es realizar una comparación entre diferentes métodos de extracción de ADN para determinar cual demostraba poseer un mejor rendimiento en su obtención. Debe tenerse en cuenta que el porcentaje de material recuperado en cada grupo de muestras analizadas también depende de las características de preservación de cada una de las piezas óseas. Esta comparación puede servir para el empleo del protocolo más apropiado en investigaciones futuras.

En la tabla anexa 3 se muestran los 4 métodos empleados, los resultados obtenidos en su amplificación y la reproducibilidad en el éxito de la extracción. Cada una de las muestras fue procesada al menos 3 veces como se señaló anteriormente en los criterios de autenticación de los resultados obtenidos.

El protocolo con el cual se obtuvo mayor número de amplificaciones fue el de *Fenol-Cloroformo-Isoamílico*, con el cual fue posible amplificar 50 de las 55 muestras analizadas. Esto puede deberse a que es el método que tiene más flexibilidad para hacer ajustes en cada paso, a diferencia de los otros dos protocolos que al ser equipos comerciales están estandarizados y la posibilidad de modificaciones es menor.

Otro dato importante es que con el equipo *QIAamp DNA Investigator Kit* hay 3 muestras que resultaron estar inhibidas (Tabla anexa 3), pero sin embargo fue posible amplificarlas con el protocolo de *Fenol-Cloroformo-Isoamílico*. La utilización de solventes orgánicos en este último puede estar facilitando la eliminación de los posibles agentes inhibitorios para la taq polimerasa de la PCR, o al tratarse de un protocolo con mayor número de pasos en su procedimiento, se aumentaría la probabilidad de co-extraer inhibidores presentes en la muestra (Hummel, 2003).

6.2 *Análisis de RFLP en las muestras analizadas*

El primer estudio realizado sobre el total de las muestras fue el de RFLP (figura 20). De las 57 muestras analizadas se obtuvo resultado positivo en 24 de ellas (42,11%) detalladas en la tabla 11 (figura 21). En las 26 restantes no fue posible amplificar ninguno de los 4 haplogrupos amerindios.

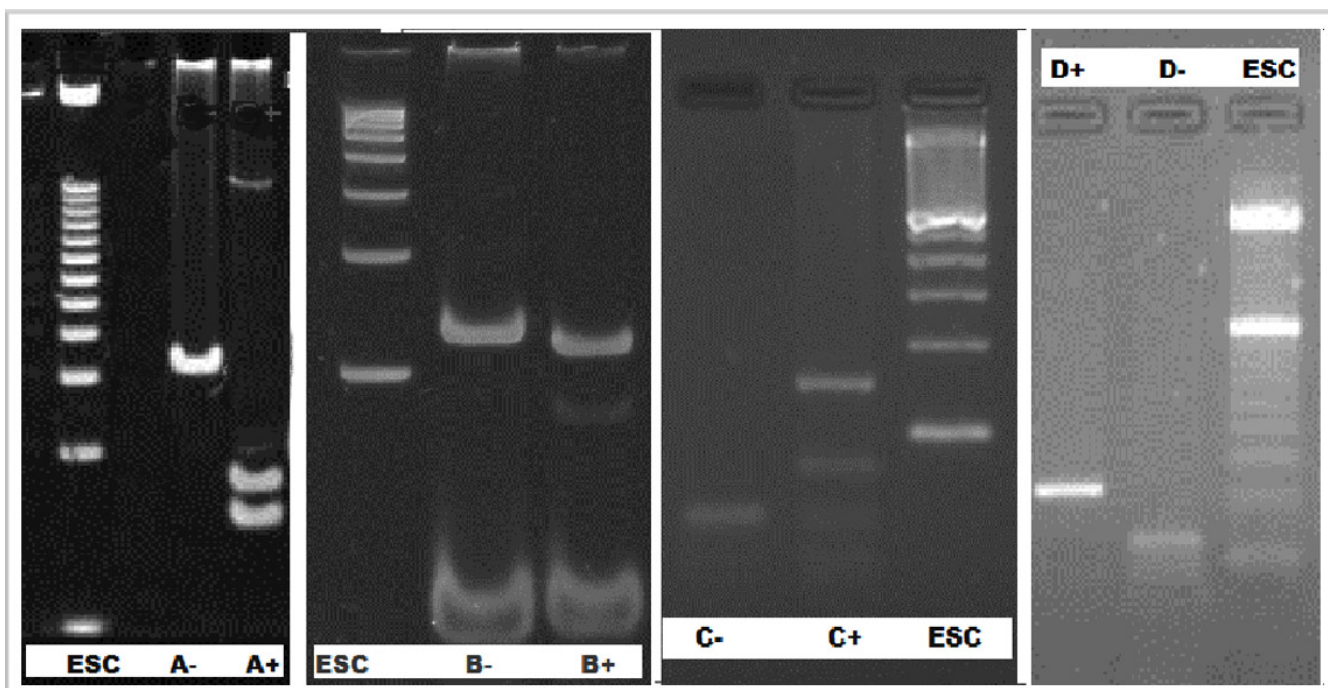


Figura 20: Representación de los distintos fragmentos obtenidos por RFLP para los 4 linajes amerindios. En el caso del A se usó una escalera de peso molecular de 20pb y en los otros 3 de 100bp.

El porcentaje de recuperación obtenido fue del 52,17% en Puna (12/23), 15% en Paso Alsina 1 (3/20), del 66,67% en Rada Tilly (4/6), del 100% en Los Alerces (2/2), del 50% en Alero Mazquiarán (1/2) y un 50% para Puesto El Rodeo (2/4).

Tabla 11. Tipificación de haplogrupos por RFLP

Muestra	Haplogrupo (RFLP)	Región	Muestra	Haplogrupo (RFLP)	Región	Muestra	Haplogrupo (RFLP)	Región
DC1	B	Puna Jujeña	DC20	----	Puna Jujeña	PA2	----	Paso Alsina 1
DC2	----	Puna Jujeña	DC21	D	Puna Jujeña	PA3	----	Paso Alsina 1
DC3	A	Puna Jujeña	DC22	----	Puna Jujeña	PA4	inhibida	Paso Alsina 1
DC4	A	Puna Jujeña	DC23	----	Puna Jujeña	PA5	----	Paso Alsina 1
DC5	C	Puna Jujeña	DB1	D	Rada Tilly	PA6	----	Paso Alsina 1
DC6	----	Puna Jujeña	DB2	----	Rada Tilly	PA7	----	Paso Alsina 1
DC7	A	Puna Jujeña	DB3	D	Rada Tilly	PA8	----	Paso Alsina 1
DC8	----	Puna Jujeña	DB4	D	Rada Tilly	PA9	C	Paso Alsina 1
DC9	A	Puna Jujeña	DB5	D	Rada Tilly	PA10	----	Paso Alsina 1
DC10	----	Puna Jujeña	DB6	----	Rada Tilly	PA11	D	Paso Alsina 1
DC11	C	Puna Jujeña	LA 1	D	Los Alerces	PA12	----	Paso Alsina 1
DC12	A	Puna Jujeña	LA 2	D	Los Alerces	PA13	----	Paso Alsina 1
DC13	inhibida	Puna Jujeña	AMZ1	inhibida	Alero Mazquiarán	PA14	----	Paso Alsina 1
DC14	B	Puna Jujeña	AMZ5	D	Alero Mazquiarán	PA15	----	Paso Alsina 1
DC15	inhibida	Puna Jujeña	RP1	D	El Rodeo	PA16	----	Paso Alsina 1
DC16	----	Puna Jujeña	RP2	----	El Rodeo	PA17	----	Paso Alsina 1
DC17	----	Puna Jujeña	RP3	inhibida	El Rodeo	PA18	----	Paso Alsina 1
DC18	D	Puna Jujeña	RP4	D	El Rodeo	PA19	C	Paso Alsina 1
DC19	D	Puna Jujeña	PA1	----	Paso Alsina 1	PA20	----	Paso Alsina 1

En las 24 muestras se pudo corroborar el Hg en al menos 2 extractos diferentes y no se obtuvo amplificación para el blanco de cada muestra, ni para el blanco de reacción.

Puede observarse que en la Puna Jujeña se obtuvo un 41,66% de A, 16,67% de B y de C y 25% de D. Para Paso Alsina 1 se obtuvo un 66,67% de C y un 33,33% de D. En los grupos muestrales patagónicos solo se obtuvieron tipificaciones correspondientes al Hg D.

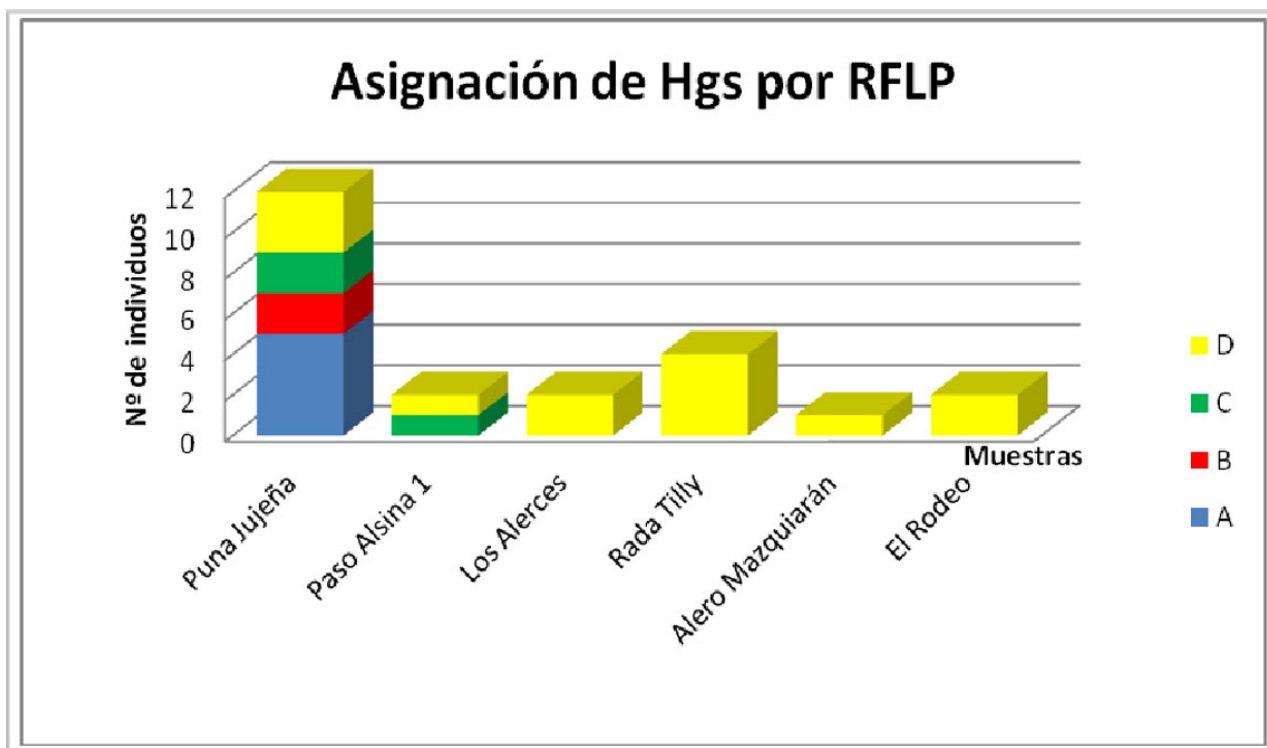


Figura 21: Valores absolutos de los Hgs registrados.

6.3 Resultados del análisis de la HVR I mitocondrial por grupos de muestras

El Hg definido por RFLP de la región codificante se ha correspondido en todos los casos con el haplotipo obtenido para la HVR I de la región control, lo que es relevante para la confiabilidad del dato producido. A continuación se desglosan los resultados obtenidos para los grupos de muestras estudiadas.

6.3.1 Muestras de la Puna Jujeña

A partir de la secuenciación de HVR I fue posible obtener datos para 17 de los 23 individuos analizados de Puna Jujeña, lo que da un porcentaje de recuperación del 73,91%. De las muestras amplificadas un 41,18% resultaron

corresponder al haplotipo A2, un 11,76% a B2 y un 23,53% a C1 y D1 respectivamente (Tabla 12).

Tabla 12. Resultados de la muestra de Puna Jujeña. Los sitios polimórficos resaltados en **negrita** son los adicionales al haplotipo nodal

Muestra	n° de catálogo	Sitio Arqueológico	Asignación a HAPLOTIPO*	Haplogrupo (RFLP)
DC1	13954	Doncellas	B2	B
DC2	13986	Doncellas	A2	-----
DC3	14071	Doncellas	A2	A
DC4	14091	Doncellas	A2@16111	A
DC5	13989	Doncellas	C1	C
DC6	14118	Agua Caliente	C1	-----
DC7	13955	Doncellas	A2q	A
DC8	13958	Doncellas	----	----
DC9	14136	Agua Caliente	A2a	A
DC10	15438	Agua Caliente	C1c	-----
DC11	13937	Doncellas	C1	C
DC12	14103	Doncellas	A2Z	A
DC13	14176	Sorcuyo	-----	inhibida
DC14	15421	Agua Caliente	B2	B
DC15	15418	Agua Caliente	-----	inhibida
DC16	15445	Agua Caliente	A2@16111	-----
DC17	15404	Agua Caliente	-----	-----
DC18	14040	Doncellas	D1g4@16325	D
DC19	14051	Doncellas	D1g5	D
DC20	15400	Agua Caliente	-----	----
DC21	15500	Agua Caliente	D1+16354	D
DC22	14173	Sorcuyo	D4b	-----
DC23	15410	Agua Caliente	-----	-----

* Se asignó el haplotipo según HaploGrep, Tamm et al., 2007; Achilli et al., 2008; Perego et al., 2010; Bodner et al., 2012; Cardoso et al., 2013

Es importante destacar que cada individuo presentó un linaje materno distinto con mutaciones adicionales para cada uno de los 4 haplotipos nodales

amerindios, lo que demuestra una gran variabilidad dentro de la muestra con una diversidad haplotípica (H_d) igual a 1 (Tabla 13).

Tabla 13. Estadísticos de variabilidad genética de la muestra de Puna Jujeña

Sitio	n	S	h	H_d	k	π
Puna Jujeña	17	32	17	$1 \pm 0,02$	7	$0,02047 \pm 0,00152$

n= número de secuencias analizadas; *S*=número total de sitios polimórficos; *h*=número de haplotipos; *H_d*=Diversidad Haplotípica; \pm desvío estandar; *k*=número promedio de diferencias entre pares de secuencias; π =Diversidad nucleotídica Tamura-Nei \pm desvío estandar

6.3.2 Muestras de la región de transición Pampa-Patagonia

De las 20 muestras analizadas se obtuvo secuencia para la HVR I en 13 de ellas (65%). Claramente el haplogrupo más representado fue el D, con un 92,3%, seguido por el C, con 7,7% (Tabla 14).

El linaje D1g fue el más representado con una gran variabilidad interna ya que se determinaron 9 haplotipos diferentes para el mismo. Al sumar al único representante del linaje C1, se obtiene una variabilidad haplotípica (H_d) para este grupo de muestras igual a 0,949 (Tabla 15) y al tratarse de un solo representante del linaje C1 no modificó la variabilidad nucleotídica, siendo esta muy baja ($\pi=0,02047$).

De las tres muestras que habían podido determinarse por RFLP, dos (PA11 y PA19) también pudieron tipificarse por secuenciación. De la muestra PA9, que había sido asignada al linaje C por RFLP, no se obtuvo secuenciación. Si se tiene en cuenta esa muestra, más todas las que fueron secuenciadas se obtiene un porcentaje de recuperación del 70%.

Tabla 14. Resultados de las muestras del sitio arqueológico Paso Alsina 1. Los sitios polimórficos resaltados en **negrita** son adicionales a los haplotipos nodales

Muestra	Descripción	Asignación a Haplotipo *	Haplogrupo (RFLP)
PA1	19-E4C6	----	----
PA2	18-E6C30	----	----
PA3	20-E7Ck	D1g2a	----
PA4	1-E2C4	----	inhibida
PA5	2-E5C17	D1	----
PA6	3-E7C12	-----	----
PA7	4-E10C8	D4a	----
PA8	5-E10C9	D1g	----
PA9	6-E10C26	----	C
PA10	7-E10C34	D1g	----
PA11	8-E1C18	D1g	D
PA12	9-E8C14	D1g 5 - 16189C	----
PA13	10-E4C20	D1g	----
PA14	11-E9C21	D1g2a	----
PA15	12-E10C24	D1g	----
PA16	13-E10C27	D1g4- 16355C	----
PA17	14-E10C35	-----	----
PA18	15-E1C42	D1g	----
PA19	16-E8C53	C1	C
PA20	17-E2C22	----	----

* Se asignó el haplotipo según HaploGrep, Tamm et al., 2007; Achilli et al., 2008; Perego et al., 2010; Bodner et al., 2012; de Sain Pierre et al., 2012

Tabla15. Estadísticos de variabilidad genética para la muestra del sitio Paso Alsina 1.

Sitio	n	S	h	Hd	k	π
Paso Alsina 1	13	13	10	0,949±0,051	3,051	0,00892±0,00167

n= número de secuencias analizadas; *S*=número total de sitios polimórficos; *h*=número de haplotipos; *Hd*=Diversidad Haplotípica \pm desvío estandar; *k*=número promedio de diferencias entre pares de secuencias; π =Diversidad nucleotídica Tamura-Nei \pm desvío estandar

6.3.3 Muestras de la Cordillera Patagónica

Este grupo está compuesto por 2 muestras que pudieron ser tipificadas para su linaje materno tanto en la región control como en la codificante, arrojando un porcentaje de recuperación del 100% (Tabla 16).

Tabla 16. Resultados de las muestras de Los Alerces. En **negrita** se muestran las mutaciones adicionales a los haplotipos nodales de cada linaje

Muestra	Código	Asignación a Haplotipo *	Haplogrupo (RFLP)
LA 1	RT9LA-1	D1g	D
LA 2	RT9AL-2	D1g5	D

* Se asignó el haplotipo según HaploGrep, Tamm et al., 2007; Achilli et al., 2008; Perego et al., 2010; Bodner et al., 2012; de Saint Pierre et al., 2012

Ambas muestras presentaron haplotipos D1g, diferenciándose por una única mutación (16209C) (Tabla 16), lo cual arroja un resultado en el número de sitios polimórficos (*s*) igual a 1. Al tratarse de dos muestras, cada una con un haplotipo distinto la diversidad haplotípica de este grupo muestral es máxima siendo $Hd= 1$. Al tratarse de dos variantes de un mismo linaje la diversidad nucleotídica es muy baja ($\pi = 0,00292$) (Tabla 17).

Tabla 17. Estadísticos de variabilidad genética para la muestra de Los Alerces

Sitio	n	S	h	Hd	k	π
Los Alerces	2	1	2	1±0,5	1	0,00292±0,00146

n= número de secuencias analizadas; *S*=número total de sitios polimórficos; *h*=número de haplotipos; *Hd*=Diversidad Haplotípica \pm desvío estandar; *k*=número promedio de diferencias entre pares de secuencias; π =Diversidad nucleotídica Tamura-Nei \pm desvío estandar

6.3.4 Muestras de La Costa Atlántica de Patagonia

En este grupo se obtuvo secuenciación de la región control para el total de las muestras (n=6) por lo que el porcentaje de recuperación del ADN fue del 100% (Tabla 18).

Tabla 18. Resultados de la secuenciación de HVR I de las muestras de Rada Tilly. Los sitios polimórficos resaltados corresponden a aquellos adicionales al haplotipo nodal

Muestra	Código	Asignación a Haplotipo *	Haplogrupo (RFLP)
DB1	RT3AA	D1g	D
DB2	RT8ESC.	C1	----
DB3	RT7BJ	D1g5	D
DB4	RT4MY	D1g5	D
DB5	RT2sg	D1	D
DB6	RT5BB	C1	----

* Se asignó el haplotipo según HaploGrep, Tamm et al., 2007; Achilli et al., 2008; Perego et al., 2010; Bodner et al., 2012; de Saint Pierre et al., 2012

Un 66,67% correspondió a D y un 33,33% a C. Todos los individuos eran portadores de un linaje único, por lo que la diversidad haplotípica (Hd) fue de 1 (Tabla 19).

Tabla 19. Estadísticos de variabilidad genética de la muestra de Rada Tilly.

Sitio	n	S	h	Hd	k	π
Rada Tilly	6	12	6	1±0,096	5,133	0,01501±0,00258

n= número de secuencias analizadas; *S*=número total de sitios polimórficos; *h*=número de haplotipos; *Hd*=Diversidad Haplotípica ± desvío estandar; *k*=número promedio de diferencias entre pares de secuencias; π =Diversidad nucleotídica Tamura-Nei ± desvío estandar

6.3.5 Muestras de la meseta patagónica

En este caso se tomaron como un solo grupo las muestras de los sitios arqueológicos Alero Mazquiarán y Puesto El Rodeo, debido a su proximidad geográfica, teniendo en cuenta el contexto arqueológico presentando anteriormente.

En 4 individuos de los 6 analizados pudo determinarse el linaje materno por secuenciación (Tabla 20).

Tabla. 20. Resultados de la secuenciación de HVR I para la región de la meseta patagónica. Los sitios polimórficos resaltados en negro son los adicionales al haplotipo nodal.

Muestra	Asignación	Asignación a Haplotipo *	Haplogrupo (RFLP)
AMZ1	Alero Mazquieran 1	----	inhibida
AMZ5	Alero Mazquieran 5	D1	D
RP1	El Rodeo individuo 1	D1g5	D
RP2	Alto Río Pinturas Individuo 2	D1g5	----
RP3	Santa Cruz Individuo 3	----	inhibida
RP4	Individuo de Perito Moreno	D1g5	D

* Se asignó el haplotipo según HaploGrep, Tamm et al., 2007; Achilli et al., 2008; Perego et al., 2010; Bodner et al., 2012; de Saint Pierre et al., 2012

El porcentaje de recuperación de ADNmt antiguo fue del 66,67% el 33,37% restante no pudo ser caracterizado y dió positivo para la prueba de inhibición. Las 4 muestras tipificadas presentaron un linaje D1 diferente entre sí, dando como resultado una diversidad haplotípica de la muestra de 1 (Tabla.21)

Tabla 21. Estadísticos de diversidad genética de la muestra de la meseta patagónica

Sitio	n	S	h	Hd	k	π
Meseta Patagónica	4	11	4	1±0,177	6	0,01754±0,00391

n= número de secuencias analizadas; S=número total de sitios polimórficos; h=número de haplotipos; Hd=Diversidad Haplotípica ± desvío estandar; k=número promedio de diferencias entre pares de secuencias; π =Diversidad nucleotídica Tamura-Nei ± desvío estandar

6.4 *Análisis de la variabilidad interpoblacional por región*

Se realizó una comparación de la composición de linajes maternos de las muestras prehispánicas estudiadas con otras de sitios arqueológicos cercanos geográficamente y/o que podrían haber estado relacionados con un posible flujo génico entre ellos y por redes de intercambios culturales según la evidencia arqueológica ya presentada (Tabla 10).

6.4.1 **Región de la Puna Jujeña**

Las 17 secuencias de HVR I obtenidas para la Puna Jujeña fueron comparadas con muestras de Perú, Norte de Chile, Quebrada de Humahuaca, (Jujuy), Valle Calchaquí y Pampa Grande (Salta) (Tabla 10, Figura 22). No fueron utilizados para los análisis las muestras de Lullailaco, Cuzco y Cortaderas Derecha, por su tamaño muestral reducido.

Dado el bajo número de individuos las muestras de Fuerte Alto y Tero se agruparon dentro de “Valle Calchaquí”. Las muestras de Banda de Perchel, Huacalera, San José y Los Amarillos se agruparon como “Quebrada de

Humahuaca centro”, y las muestras de Juella, Sarahuaico, Tilcara y Huichairas como “Quebrada de Humahuaca sur” siguiendo los criterios de Mendisco *et al.* (2014). Por otro lado, las muestras de la región de Palpa en la costa y la región de Tranca en los valles altos de Perú, se dividieron según los periodos temporales descritos por Fehren-Schmitz *et al.* 2014, en 3 y 2 grupos respectivamente (Tabla 22).

A la muestra de la Puna Jujeña se le agregaron los dos resultados publicados por Mendisco *et al.* (2014) para el sitio Doncellas. Ambas presentaban haplotipos diferentes entre sí y no coincidían con ninguno de los obtenidos en este estudio para Puna Jujeña con los que la variabilidad haplotípica se mantuvo.

Luego de realizar una comparación entre las secuencias de 329 individuos asignados a 16 grupos poblacionales (Tabla 22, Figura 22) se obtuvo como resultado que la variación genética promedio dentro de las poblaciones (87,04%) es mayor a la variación que existe entre las poblaciones (12,96%), a pesar de lo cual esta última resulta significativa indicando que al menos una de ellas difiere del resto ($p < 0,00001$) (Tabla 23).

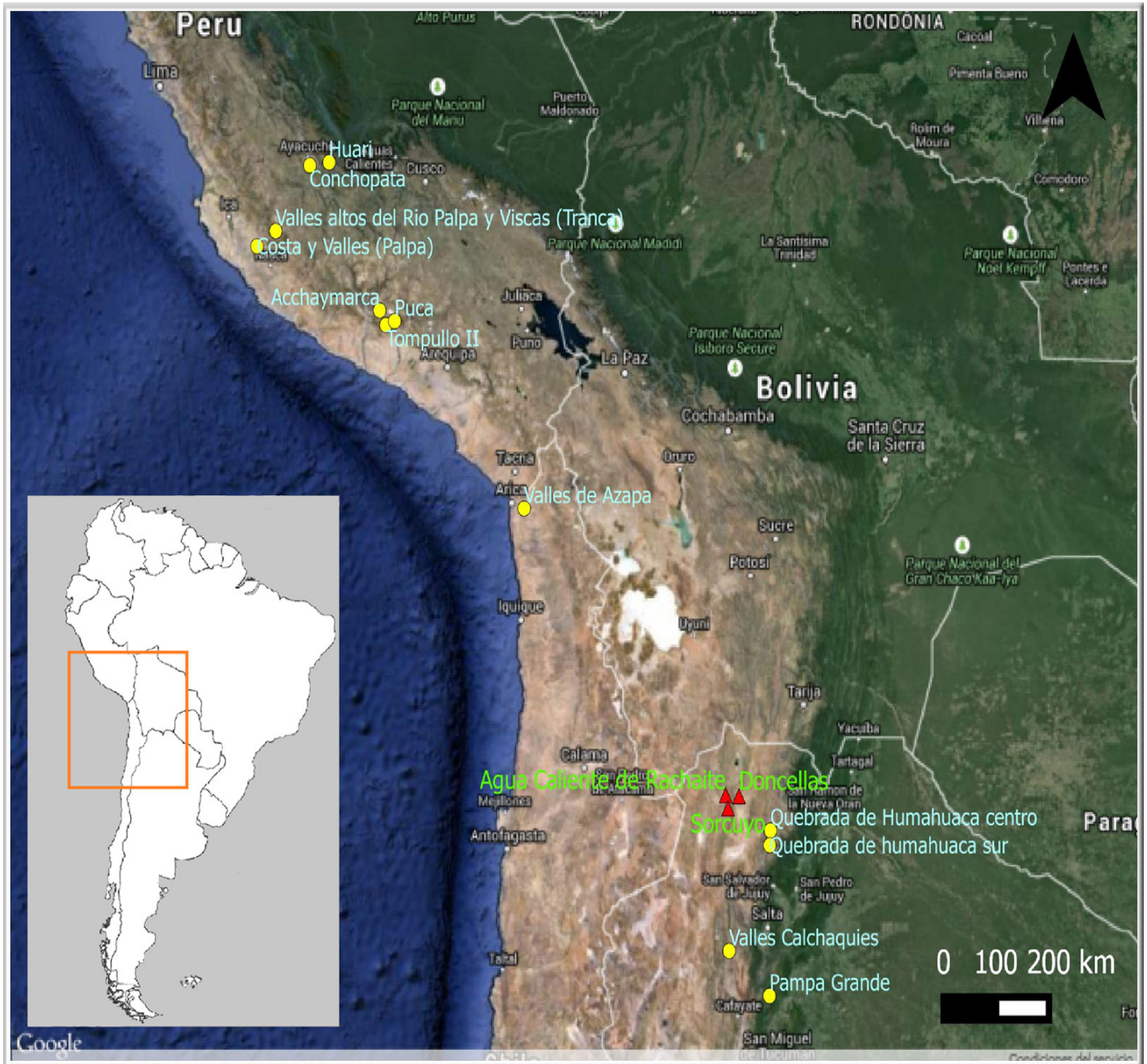


Figura 22. Posición geográfica de las muestras de la tabla.... Con triángulos rojos se marcan los sitios analizados y con círculos amarillos las muestras utilizadas para la comparación.

Tabla 22. Muestras prehispánicas utilizadas para el análisis de comparación de las poblaciones del norte

Muestra	Procedencia	n° de individuos	%A2	%B2	%C1	%D1	Bibliografía
Pampa Grande	Argentina	19	10,53	47,37	0,00	42,10	Carnese <i>et al.</i> 2010
Quebrada de Humahuaca centro	Argentina	16	62,50	6,25	12,50	18,75	Mendisco <i>et al.</i> 2011
Quebrada de Humahuaca sur	Argentina	10	20,00	60,00	10,00	10,00	Mendisco <i>et al.</i> 2014
Valle Calchaquí	Argentina	5	40,00	40,00	20,00	0,00	Mendisco <i>et al.</i> 2014
Puna Jujeña	Argentina	19	36,80	15,80	26,30	21,10	Este estudio*
Valles de Azapa	Chile	17	29,41	35,29	17,65	17,65	Moraga <i>et al.</i> 2005
Tompullo II	Perú	24	8,34	70,84	4,15	16,67	Baca <i>et al.</i> 2012
Acchaymarca	Perú	11	0,00	72,73	18,18	9,09	Baca <i>et al.</i> 2014
Puca	Perú	14	42,86	42,86	7,14	7,14	Baca <i>et al.</i> 2014
Costa y Valles (Palpa) EIP	Perú	63	1,59	14,28	34,92	49,21	Fehren-Schmitz <i>et al.</i> 2014
Costa y Valles (Palpa) LIP	Perú	23	8,70	56,52	26,08	8,70	Fehren-Schmitz <i>et al.</i> 2014
Costa y Valles (Palpa) MH	Perú	11	0,00	18,18	36,37	45,45	Fehren-Schmitz <i>et al.</i> 2014
Valles altos del Río Palpa y Viscas (Tranca) MH	Perú	46	4,35	63,04	23,91	8,70	Fehren-Schmitz <i>et al.</i> 2014
Valles altos del Río Palpa y Viscas (Tranca) LIP	Perú	31	6,45	41,94	38,71	12,90	Fehren-Schmitz <i>et al.</i> 2014
Huari	Perú	12	16,67	25,00	50,00	8,33	Kemp <i>et al.</i> 2009
Conchopata	Perú	8	25,00	50,00	12,50	12,50	Kemp <i>et al.</i> 2009
Totales		329	14,29	39,82	23,70	22,19	

* En esta muestra poblacional se incluyeron los dos individuos analizados por Mendisco et al. (2014) del Sitio arqueológico Doncellas

Tabla 23. Resultados AMOVA. Variabilidad inter e intrapoblacional

Tipo de variación	g. l.	Suma de cuadrados	Componentes de Varianza	Porcentaje de Variación
Entre Poblaciones	15	187,962	0,47139*	12,96*
Dentro de poblaciones	313	990,626	3,16494	87,04
Total	328	1.178,588	3,63633	100

Índice de Fijación FST: 0,12963*

* P-valor = <0,00001

La comparación de a pares (F_{ST}) mostró que la Puna jujeña se diferencia genéticamente de las siguientes muestras peruanas: Tompullo II ($p < 0,00001$), Acchaymarca ($p = 0,02051$), región de Palpa del Periodo Intermedio Temprano ($p < 0,00001$) y de la región de Tranca del Horizonte Medio ($p < 0,00001$) y del Periodo Intermedio Tardío ($p = 0,04883$). Además se diferencia de las dos muestras prehispánicas del NOA, Quebrada de Humahuaca centro ($p = 0,02832$) y Pampa Grande ($p = 0,01074$). Con el resto de las muestras poblacionales de la tabla 22, no hubo diferencias significativas (P-valores de los F_{ST} en Tabla 24).

Además, fueron calculadas las distancias genéticas a partir de las frecuencias de los 4 linajes amerindios fundadores A2, B2, C1 y D1 (obtenidos por secuenciación). La configuración final de las muestras dada por dos variables (Figura 23) parecería ser una buena representación de las diferencias reales que existen entre las muestras (Stress=0,06180).

Tabla 24. Resultados de F_{ST} y P-valores para las muestras del Norte. A la derecha de la diagonal se ubican los F_{ST} y a la izquierda los P-valores. En rojo se señalan las diferencias genéticas significativas con la Puna Jujeña.

	Quebrada Humahuaca centro	Valle Calchaquí	Quebrada de Humahuaca sur	Puna Jujeña	Tompullo II	Acchaymarca	Puca	Costa de Perú EIP	Costa de Perú LIP	Costa de Perú MH	Valles de Perú LIP	Valles de Perú MH	Conchopata	Huari	Pampa Grande	Valles de Azapa
Quebrada Humahuaca centro	0.00000	0.15985	0.24490	0.07679	0.39901	0.36458	0.08433	0.22159	0.27386	0.23622	0.23406	0.32829	0.27091	0.18523	0.25055	0.10145
Valle Calchaquí	0.06934	0.00000	0.00423	0.04012	0.19492	0.10985	0.03830	0.25189	0.08687	0.12905	0.09622	0.12582	<0.00001	0.04992	<0.00001	0.04794
Quebrada de Humahuaca sur	0.00586	0.38086	0.00000	0.04514	0.08766	0.03957	0.03849	0.23447	<0.00001	0.16228	0.03180	<0.00001	<0.00001	0.07387	0.04220	0.05265
Puna Jujeña	0.02832	0.18945	0.11816	0.00000	0.18230	0.0964	0.03523	0.09714	0.05762	0.03254	0.04465	0.12895	0.02541	0.00815	0.10245	0.01973
Tompullo II	0.00000	0.01953	0.04590	0.00000	0.00000	<0.00001	0.13626	0.31775	0.07985	0.27681	0.14525	0.10535	0.10681	0.20446	0.16578	0.15447
Acchaymarca	0.00098	0.13574	0.18262	0.02051	0.42383	0.00000	0.09932	0.23344	0.01367	0.16687	0.05387	0.04068	0.03503	0.08874	0.10562	0.08702
Puca	0.07324	0.23047	0.18848	0.12109	0.01660	0.06348	0.00000	0.22196	0.09468	0.17245	0.12368	0.15802	0.03292	0.09589	0.11714	<0.00001
Costa de Perú EIP	0.00000	0.00684	0.00195	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.19128	<0.00001	0.09766	0.24580	0.18310	0.04766	0.19980	0.14660
Costa de Perú LIP	0.00098	0.09863	0.64746	0.05762	0.02637	0.26074	0.02441	0.00000	0.00000	0.10713	0.00079	<0.00001	<0.00001	0.04550	0.08153	0.07928
Costa de Perú MH	0.00488	0.06445	0.02051	0.16699	0.00000	0.03125	0.00488	0.82324	0.05469	0.00000	0.01478	0.16782	0.09553	<0.00001	0.12157	0.07603
Valles de Perú LIP	0.00000	0.11035	0.18262	0.04883	0.00195	0.09570	0.01172	0.00000	0.36719	0.25000	0.00000	0.03886	<0.00001	<0.00001	0.09422	0.07603
Valles de Perú MH	0.00000	0.05859	0.45996	0.00000	0.00195	0.11035	0.00098	0.00000	0.38867	0.00293	0.04883	0.00000	<0.00001	0.10216	0.10788	0.15400
Conchopata	0.00488	0.42578	0.84375	0.21875	0.03711	0.18945	0.22461	0.00098	0.52637	0.06738	0.36914	0.45996	0.00000	0.01108	0.03848	0.04968
Huari	0.00879	0.24609	0.11133	0.28809	0.00000	0.06152	0.06543	0.06934	0.12598	0.64062	0.56738	0.02344	0.325205	0.0000	0.11112	0.04313
Pampa Grande	0.00195	0.40234	0.17773	0.01074	0.00293	0.05273	0.02344	0.00000	0.02734	0.05273	0.01855	0.00977	0.21191	0.03809	0.0000	0.1020
Valles de Azapa	0.01465	0.14746	0.08887	0.15527	0.00195	0.01758	0.35449	0.00000	0.02637	0.01855	0.01855	0.00098	0.09277	0.08887	0.01953	0.0000

El eje de coordenadas posicionó a las muestras según sus frecuencias de los Hgs A2, B2 y D1. Aquellas que presentaron mayor proporción de A2 se encuentran ubicados hacia los valores más altos del eje X y menores del Y, opuestas a las que presentaron mayor frecuencia del B2. Por su parte las muestras con alta proporción de D1 se encuentran en los valores más altos del eje Y. La muestra de la Puna Jujeña quedó posicionada hacia la derecha del gráfico, probablemente por su relativamente alta frecuencia de A2. Las distancias genéticas más significativas se encontraron con la Región de Palpa del periodo Intermedio Temprano, Pampa Grande, Tompullo II, Valles de Perú MH y Quebrada de Humahuaca centro. Esto es concordante con los resultados de F_{ST} ya señalados obtenidos a partir de las secuencias.

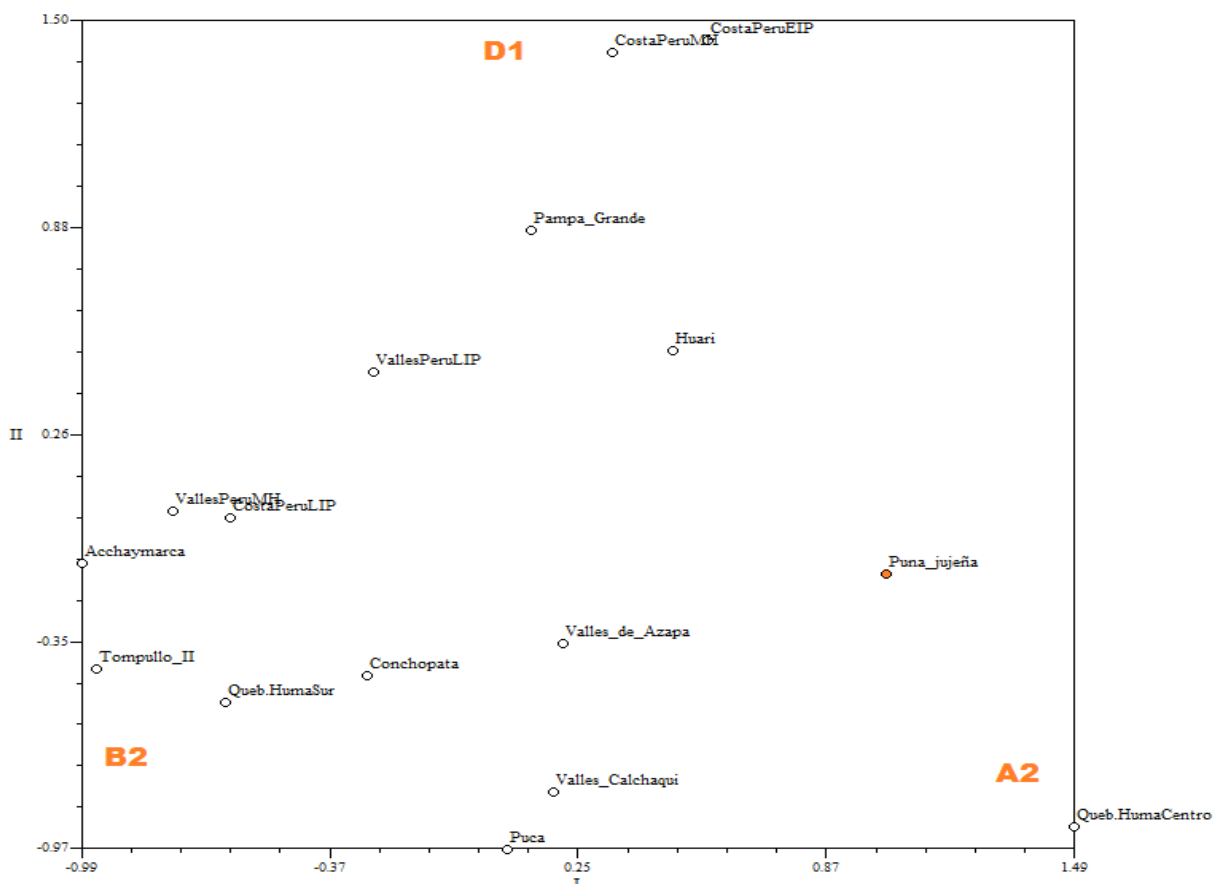


Figura 23. Escalamiento Multidimensional para las muestras comparadas con la Puna Jujeña (señalada en naranja).

6.4.2 Región de la Patagonia

El sitio arqueológico Paso Alsina 1 fue incluido para los análisis en la Región Patagónica, dado que no hay hasta el momento secuencias publicadas de la región Pampeana o de transición Pampa-Patagonía,.

Las secuencias obtenidas por García-Bour *et al.*, (2004) poseen 130 pb menos que el resto de las secuencias. Ese segmento faltante se ubica entre las 16024 y 16154 pb, región donde los haplotipos nodales de C1 y D1 no presentan ningún sitio polimórfico específico. Al ser muy escasos los trabajos en poblaciones antiguas del extremo sur del Cono Sur, se decidió completar ese segmento según la secuencia de referencia de cada uno de los nodales.

Las secuencias de la HVR I para Paso Alsina 1, Los Alerces, Rada Tilly y Puesto el Rodeo se utilizaron para realizar análisis de la varianza interpoblacional y relaciones de distancia genética junto con muestras del Canal de Beagle (Dejean *et al.*, 2008), de Fuego-Patagónicos de varios sitios del sur de Argentina y Chile (García-Bour *et al.*, 2004; Moraga *et al.*, 2010) tal como se indica en la tabla 10 (Figura 24).

Los Alerces, Alero Mazquiarán y Puesto El Rodeo fueron agrupados en “Patagonia centro- oeste”. Del grupo de Fuego-Patagónicos se extrajo la muestra de Punta León por ubicarse al norte en la Costa Atlántica y se la agrupó junto a las muestras de Rada Tilly en “Costa Atlántica patagónica”. Por otro lado, los dos individuos del Canal de Beagle se agruparon dentro del conjunto Fuego-Patagónicos. En consecuencia para el análisis de la viarianza y la estimación de las diferenciaciones genéticas por F_{ST} quedaron conformados 4 grupos de muestras: Paso Alsina 1, Costa Atlántica patagónica, Patagonia centro-oeste y Fuego-Patagónicos (Tabla 25).



Figura 24. Posición de las muestras del sur de Argentina y Chile utilizadas. Los triángulos rojos indican las muestras en estudio y los celestes las muestras a comparar.

Tabla 25. Frecuencia de Hgs C1 y D1 en los 4 grupos muestrales utilizados para la comparación de las muestras del sur del Cono Sur.

Muestra	n° de individuos	%C	%D	Bibliografía
Fuego- Patagónicos	28	57,1	42,9	García-Bour <i>et al.</i> , 2004; Moraga <i>et al.</i> , 2010
Costa Atlántica patagónica	7	28,6	71,4	Este estudio; García-Bour <i>et al.</i> , 2004
Patagonia centro-oeste	6	0	100	Este estudio
Paso Alsina 1	13	7,71	92,3	Este estudio
Total	54	35,19	64,81	

Las 54 secuencias correspondientes a las muestras arqueológicas del sur de Argentina y Chile se dividieron en 4 grupos poblacionales y se obtuvo como resultado que la variación genética promedio dentro de las poblaciones (80,97%) es mayor a la variación que existe entre las poblaciones (19,03%), a pesar de lo cual esta última resulta significativa indicando que al menos una de ellas difiere del resto ($p < 0,00001$) (Tabla 26).

Tabla 26. Resultado AMOVA para las muestras arqueológicas del sur.

Tipo de variación	g. l.	Suma de cuadrados	Componentes de Varianza	Porcentaje de Variación
Entre Poblaciones	3	21,793	0,45838*	19,03*
Dentro de poblaciones	50	97,522	1,95044	80,97
Total	53	119,315	2,40882	100

Indice de Fijación FST: 0,14766*

* P-valor = $< 0,00001$

En la comparación de F_{ST} de pares de poblaciones de los 4 grupos de muestras solo la Costa Atlántica patagónica no presentó diferencias genéticas significativas con la muestra de Patagonia centro-oeste ($p = 0,72754$) y la de Paso

Alsina 1($p = 0,11426$). El resto de las poblaciones se diferenciaron genéticamente entre sí (Tabla 27).

Tabla 27. P-Valores de los F_{ST} obtenido de la comparación de a pares de muestras. Distancia genética significativa ($p < 0,05$). A la derecha de la diagonal se ubican los F_{ST} y a la izquierda los P-valores. En rojo se muestran las distancias significativas para las muestras analizadas

	Fuego-Patagónicos	Costa Atlántica patagónica	Patagonia centro-oeste	Paso Alsina 1
Fuego-Patagónicos	<i>0.00000</i>	0.13374	0.29679	0.23134
Costa Atlántica patagónica	0.02637	<i>0.00000</i>	<0.00001	0.05644
Patagonia centro-oeste	0.00000	0.72754	<i>0.00000</i>	0.11727
Paso Alsina 1	0.00000	0.11426	0.01270	<i>0.00000</i>

En este caso no pudo realizarse un escalamiento multidimensional ya que no se cumple con el supuesto de número mínimo de muestras utilizadas.

6.5 Análisis de la variabilidad interpoblacional a nivel del actual territorio Argentino

Para este análisis se utilizaron todas las muestras prehispánicas de Argentina con resultados para la secuenciación de HVR I ya mencionadas. Hasta el momento, incluyendo las muestras presentadas en este estudio, se obtuvieron resultados favorables para la ancestría materna en 102 individuos. Para la estimación de la variabilidad genética, el análisis de la varianza y la diferenciación genética obtenida por comparación de secuencias y por frecuencia de

haplogrupos, fueron agrupados en 9 conjuntos de al menos 5 muestras cada uno (Tabla 28).

Tabla 28. Frecuencias de los 4 Hgs amerindios en las muestras de poblaciones prehispánicas de nuestro país

Muestra poblacional	n° de individuos con secuencias	% de Hg A2	% de Hg B2	% de Hg C1	% de Hg D1	Bibliografía
Puna Jujeña	19	36,84	15,79	26,32	21,05	este estudio*
Quebrada De Humahuaca centro	16	62,50	6,25	12,5	18,75	Mendisco <i>et al.</i> , 2014
Quebrada de Humahuaca sur	10	20,00	60,00	10,00	10,00	Mendisco <i>et al.</i> , 2014
Valle Calchaquí	5	40,00	40,00	20,00	0,00	Mendisco <i>et al.</i> , 2014
Pampa Grande	19	10,53	47,37	0,00	42,10	Carnese <i>et al.</i> , 2010
Paso Alsina I	13	0,00	0,00	7,69	92,31	este estudio
Costa Atlántica Patagónica	7	0,00	0,00	28,60	71,40	este estudio y García-Bour <i>et al.</i> , 2004
Patagonia centro-oeste	6	0,00	0,00	0,00	100,00	este estudio
Fuego-Patagónicos	7	0,00	0,00	57,14	42,86	Dejean <i>et al.</i> , 2008 y García-Bour <i>et al.</i> , 2004

* En esta muestra poblacional se incluyeron los dos individuos analizados por Mendisco *et al.* (2014) del Sitio arqueológico Doncellas

Los resultados del análisis de la variabilidad genética obtenida de la comparación de todas las muestras prehispánicas del actual territorio argentino muestran un gran número de haplotipos (h=61) si se tiene en cuenta que son 102 individuos analizados. La diversidad haplotípica fue también elevada (Hd=0,971) (Tabla 29). De ese total de haplotipos las muestras analizadas en este estudio comprenden un 63,9% (n=39) y solo comparten con otras muestras 4 linajes. Hay que tener en cuenta que las muestras estudiadas representan el 43,14% del total (n=44).

Tabla 29. Resultados de Variabilidad genética de todas las muestras precolombinas del actual territorio argentino por región y total.

Región	n	S	h	Hd	k	π
Norte de Argentina	69	46	37	0,950 \pm 0,000	6,79	0,01988 \pm 0,0001
Sur de Argentina	33	28	26	0,979 \pm 0,015	4,311	0,01260 \pm 0,0001
Argentina	102	59	61	0,971 \pm 0,008	6,5	0,01901 \pm 0,0009

n= número de secuencias analizadas; S=número total de sitios polimórficos; h=número de haplotipos; Hd=Diversidad Haplótica \pm desvío estándar; k=número promedio de diferencias entre pares de secuencias; π =Diversidad nucleotídica Tamura-Nei \pm desvío estándar.

Comparando la variabilidad genética de todas las muestras prehispánicas de Argentina, con la obtenida para las muestras del Norte y para las muestras del Sur, se observó que en el norte hay mayor número de sitios polimórficos ($s=46$) posiblemente debido a que en esta región las muestras poblacionales presentan diferentes linajes para los 4 Hg amerindios (A2, B2, C1 y D1), mientras que para las muestras del sur solo se observaron diversos linajes de C1 y D1. El número total de haplotipos ($h=61$) no coincide con la sumatoria de los haplotipos de cada región demostrando que hay linajes compartidos entre ambas. Estos haplotipos son el C1 nodal (16223T, 16198C, 16325C y 16327T) y el D1 nodal (16223T, 16325C y 16362C). Teniendo en cuenta el número de individuos analizados en cada región, la diversidad haplotípica es similar a la total (Tabla 30)

Tabla 30. Haplotipos mitocondriales de las muestras precolombinas de la actual Argentina. Resultados se encuentran los sitios polimórficos adicionales

Haplotipo	Sitios polimórficos (16024 - 16365 pb)	Muestras poblacionales que lo presentan
A2	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C	Quebrada de Humahuaca centro, Quebrada de Humahuaca sur, Valle Calchaquí, Pampa Grande
<u>A2</u>	16223T 16290T 16319A 16362C	Puna Jujeña
A2	16111T 16125A 16223T 16290T 16319A 16362C	Quebrada de Humahuaca centro
<u>A2</u>	16125A 16223T 16290T 16319A 16362C	Puna jujeña
A2	16111T 16188T 16193T 16223T 16290T 16319A 16362C	Quebrada de Humahuaca centro
A2	16111T 16223T 16266T 16290T 16319A 16362C	Valle Calchaquí
A2	16086C 16111T 16223T 16234G 16290T 16319A 16362C	Puna Jujeña
A2	16192T 16223T 16234G 16256T 16290T 16319A 16362C	Puna Jujeña
A2	16188T 16292T 16223T 16319A	Puna Jujeña
A2q	16111T 16162G 16189C 16209C 16223T 16290T 16362A	Puna Jujeña
A2z	16072T 16083T 16111T 16129A 16223T 16290T 16319A 16362C	Puna Jujeña
B2	16183C 16189C 16217C	Pampa Grande y Quebrada de Humahuaca sur
B2	16183C 16188T 16189C 16217C	Quebrada de Humahuaca sur y Puna Jujeña
B2	16183C 16189C 16217C 16253G 16286G	Puna Jujeña
B2	16179T 16183C 16189C 16217C	Quebrada de Humahuaca sur
B2	16183C 16189C 16217C 16289G	Puna Jujeña
B2	16182C 16183C 16189C 16217C	Los Amarillos, Quebrada de Humahuaca sur y Quebrada de Humahuaca centro
B2	16142C 16182C 16183C 16189C 16217C	Pampa Grande
B2	16145A 16156A 16157C 16183C 16189C 16217C	Pampa Grande
B2	16145A 16156A 16157C 16182C 16183C 16189C 16217C	Pampa Grande
B2	16145A 16156A 16157C 16183C 16189C 16217C 16278C	Pampa Grande
B2	16092C 16145A 16156A 16157C 16182C 16183C 16189C 16217C 16295T	Valle Calchaquí
B2	16111T 16126C 16183C 16189C 16217C	Quebrada de Humahuaca sur
C1	16153A 16223T 16298C	Puna Jujeña
C1	16223T 16298C 16325C 16327T	Fuego-Patagónico, Quebrada de Humahuaca sur, Puna Jujeña, Paso Alsina 1
C1	16156A 16223T 16291T 16298C 16325C 16327T	Fuego-Patagónico
C1	16145A 16223T 16298C 16325C 16327T	Canal de Beagle
C1	16223T 16266T 16298C 16325C 16327T	Rada Tilly

Continuación de la Tabla 30.

Haplotipo	Sitios polimorficos (16024 - 16365 pb)	Muestras poblacionales que lo presentan y n° de individuos
C1	16189C 16223T 16298C 16325C 16327T	Puna Jujeña
C1	16198C 16223T 16287T 16298C 16325C 16327T 16362C	Puna Jujeña
C1	16223T 16298C 16311C 16362C	Rada Tilly
C1b	16183C 16189C 16223T 16298C 16311C 16325C 16327T	Quebrada de Huamahuaca centro y Puna Jujeña
C1b	16223T 16292T 16298C 16325C 16327T	Quebrada de Humahuaca centro
C1b	16129A 16223T 16298C 16325C 16327T	Valle Calchaquí
D1	16223T 16362C	Rada Tilly
D1	16223T 16325C 16362C	Quebrada de Humahuaca centro, Quebrada de Humahuaca sur, Pampa Grande, Alero Mazquiarán, Canal de Beagle
D1	16129A 16223T 16325C 16362C	Pampa Grande
D1	16223T 16287T 16325C 16362C	Pampa Grande
D1	16223T 16325C 16354T 16362C	Puna Jujeña
D1	16030T- 16156A- 16208A- 16223T- 16325C- 16362C	Paso Alsina 1
D1g	16129A 16187T 16223T	Paso Alsina 1
D1g	16187T 16223T 16325C	Paso Alsina 1
D1g	16187T 16223T 16362C	Paso Alsina 1
D1g	16187T 16223T 16325C 16362C	Los Alerces y Paso Alsina 1
<u>D1g4</u>	16187T 16223T 16257T 16290T 16362C	Puna Jujeña
D1g	16072T 16187T 16189C 16223T 16325C 16362C	Rada Tilly
D1g	16187T 16223T 16248T 16295T 16362C	Paso Alsina 1
D1g	16187T 16223T 16290T 16362C	Paso Alsina 1
D1g5	16187T 16209C 16223T	Paso Alsina 1
D1g5	16187T 16209C 16223T 16325C	Fuego-Patagónico
D1g5	16187T 16209C 16223T 16325C 16362C	Los Alerces
<u>D1g5</u>	16187T 16189C 16209C 16223T 16325C	Fuego-Patagónico
D1g	16187T 16189C 16194G 16205T 16223T 16235G 16362C	Puesto el Rodeo
D1g5	16187T 16189C 16205T 16209C 16223T 16325C 16362C	Puesto el Rodeo
D1g5	16187T 16189C 16209C 16223T 16325C 16362C	Rada Tilly
D1g5	16187T 16189C 16209C 16223T 16250T 16325C 16362C	Fuego-Patagónico
D1g5	16174T 16187T 16189C 16209C 16223T 16232T 16325C 16362C	Rada Tilly
D1g5	16125A 16187T 16189C 16209C 16223T	Puna Jujeña
D1g5	16051G 16187T 16189C 16209C 16223T 16298C 16305G 16320T 16362C	Puesto el Rodeo
D4a	16129A - 16146R - 16223T - 16362C	Paso Alsina 1
D4b	16189C 16300G 16223T	Puna Jujeña

En un panorama general las muestras prehispánicas de Argentina presentaron un 41,18% de Hg D1, seguido del A2 con un 22,55%, el B2 con 20,59% y por último el C1 con un 15,68% de representatividad. Si se observan las proporciones de los haplotipos dentro de cada uno de los 4 haplogrupos amerindios, el que está presente en mayor proporción es el D1g y se encuentra representado en todas las muestras poblacionales evidenciando una gran distribución.

Para las 102 secuencias correspondientes a las muestras arqueológicas del actual territorio argentino divididas en 9 conjuntos de muestras poblacionales y dividido en dos grupos, uno con los 5 conjuntos del norte y otro con los 4 del sur, se obtuvo como resultado que el mayor porcentaje de variación se observó dentro de cada población (76,93%) y fue mayor entre los dos grupos (13,56%) que entre las poblaciones de cada grupo (9,51%) siendo ambas significativas (Tabla 31)

Tabla 31. Resultados de Amova para la comparación entre grupos del norte y sur de Argentina

Tipo de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Componentes de Varianza	Porcentaje de Variación
Entre grupos	1	33,054	0,57522*	14,26*
Entre poblaciones dentro de los grupos	7	50,529	0,37701**	9,35**
Dentro de las poblaciones	93	286,473	3,08036	76,39
Total	100	370,056	4,03258	100
Índice de Fijación F _{ST} : 0,23613				

* p =0,00880; ** p< 0,00001

En cuanto a las distancias genéticas obtenidas por los F_{ST} y con P-valores menores a 0,05, la mayoría de las muestras presentaron diferenciación genética (Tabla 32). No presentaron diferenciación genética significativa las comparaciones

de la muestra de la Costa Atlántica Patagónica con los Fuego Patagónicos ($p=0,22168$), con la Patagonia centro-oeste ($p=0,75488$) y con Paso Alsina 1 ($p=0,15234$). Tampoco hubo diferenciación entre Puna Jujeña y las muestras de Valle Calchaquí ($p=0,17578$) y de Quebrada de Humahuaca sur ($p=0,10742$), dentro de cada uno de los dos conjuntos (norte y sur). Estos resultados de la Puna Jujeña y de la Costa Atlántica Patagónica coinciden con los análisis de la varianza realizados por región (apartado 5.4.1 y 5.4.2), donde tampoco presentaron distancias genéticas significativas con las mismas muestras. Un dato importante a destacar es que entre la Puna Jujeña y la Costa Atlántica Patagónica no se observó diferenciación genética ($p=0,05078$).

Tabla 32. P-valores de FST obtenidos de la comparación de todas las muestras prehispánicas de Argentina

	Fuego-Patagónicos	Costa Atlántica Patagónica	Quebrada de Humahuaca centro	Valle Calchaquí	Quebrada de Humahuaca sur	Pampa Grande	Puna Jujeña	Patagonia centro-oeste	Paso Alsina 1
Fuego-Patagónicos	0.00000	0.03988	0.35920	0.21273	0.31110	0.23983	0.10337	0.22312	0.23999
Costa Atlántica Patagónica	0.22168	0.00000	0.28379	0.19783	0.26208	0.20400	0.07113	<0,00001	0.05037
Quebrada de Humahuaca centro	0.00000	0.00293	0.00000	0.15989	0.24489	0.25056	0.07680	0.36287	0.3095
Valle Calchaquí	0.02637	0.01758	0.07031	0.00000	0.00428	<0.00001	0.04015	0.26122	0.28893
Quebrada de Humahuaca sur	0.00195	0.00391	0.00684	0.39258	0.00000	0.04222	0.04513	0.34601	0.35405
Pampa Grande	0.01660	0.02441	0.00195	0.37793	0.16699	0.00000	0.10247	0.27406	0.25988
Puna Jujeña	0.02539	0.05078	0.04492	0.17578	0.10742	0.01270	0.00000	0.16837	0.13399
Patagonia centro-oeste	0.03125	0.75488	<0.00001	0.00488	0.00098	0.00293	0.00195	0.00000	0.12760
Paso Alsina 1	0.00293	0.15234	0.00098	0.00195	<0.00001	<0.00001	<0.00001	0.01270	0.00000

El escalamiento multidimensional realizado con 2 variables parece ser una buena representación de las distancias genéticas reales (stress= 0,17357) (Figura 25). Al igual que los resultados de F_{ST} las muestras analizadas en esta tesis se

encuentran ubicadas en una posición intermedia con la mayor distancia a la muestra de Quebrada de Humahuaca centro y de Pampa Grande.

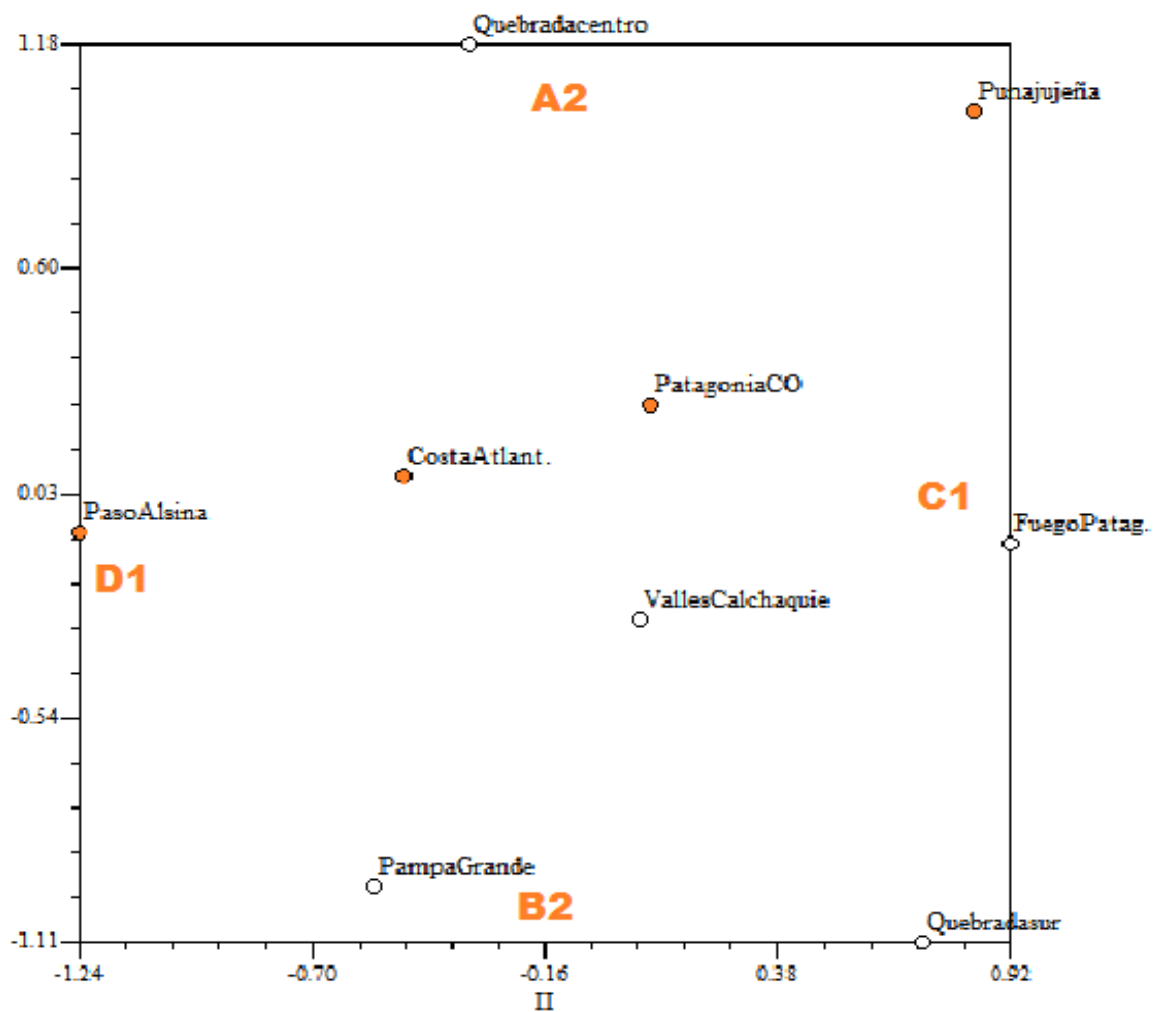


Figura 25. Representación gráfica del escalamiento multidimensional para todas las muestras precolombinas del actual territorio argentino. En naranja se señalan las muestras estudiadas.

6.6 Asociación entre la distancia genética y la geográfica del linaje

D1

Al realizar un análisis de comparación entre la distribución geográfica y la distancia genética rotada del linaje D1 no se observó una asociación significativa ($p=0,065$), observándose una correlación baja entre ambas distancias (0,2443). Puede apreciarse en la Figura 26 que las muestras tienden a situarse hacia el centro-sur del actual territorio argentino, posiblemente debido a la mayor frecuencia del linaje D1g en la porción austral del Cono Sur.

Este análisis no fue realizado para el resto de los haplogrupos ya que no presentaron la distribución y la frecuencia que se obtuvo para el D1 en toda la región. Existen haplotipos de D1 distintos al nodal, muy distribuidos entre muestras del norte y muestras del sur del actual territorio argentino. A2 y B2 por su parte, no están presentes en el sur y para C1 el único haplotipo compartido es el nodal, no presentando frecuencias considerables para una comparación en la región norte.



Figura 26. Ubicación geográfica de las muestras precolombinas con linaje D (triángulos rojos). En amarillo se indican las coordenadas genéticas rotadas para un mejor ajuste a las geográficas.

6.7 Redes de asociación de Haplotipos

A continuación se presentan las redes obtenidas para los haplotipos de cada uno de los 4 Hgs amerindios, considerando individuos actuales y antiguos e incluyendo muestras de Argentina, Chile, Perú, Bolivia y sur de Brasil.

- Haplotipos del A2

En la figura 27 se observa que A2 no posee una gran diversidad de haplotipos (n= 33) si se considera que se analizaron más de 300 individuos de 17 muestras poblacionales diferentes. La muestra de Guaraníes de Brasil es la que presentó una mayor frecuencia de estos linajes. La muestra DC4 de Puna Jujeña (color rojo) compartió el haplotipo con 2 individuos actuales de Puna, 4 Mapuches de la Patagonia y 1 Coya de Salta o Jujuy. Por otro lado, la DC7 mostró un haplotipo relacionado a los Guaraníes de Brasil, diferenciándose de estos por 3 mutaciones. Los haplotipos de DC2, DC3, DC9, DC12 y DC16 no han sido descritos para ninguna población antigua o actual hasta el momento, al menos según nuestro conocimiento. Por su parte, DC12 se caracteriza por estar cercanamente relacionado con un individuo prehispánico de Valles de Azapa, Chile (a sólo una mutación de distancia) y por diferenciarse del haplotipo nodal por más de 5 sitios polimórficos, lo cual estaría indicando cierta profundidad temporal en la región. Desde una perspectiva general, los haplotipos de Puna Jujeña estarían muy relacionados a otras poblaciones antiguas y actuales de la misma región andina, a excepción del individuo DC7 que se relaciona a una población actual del este.

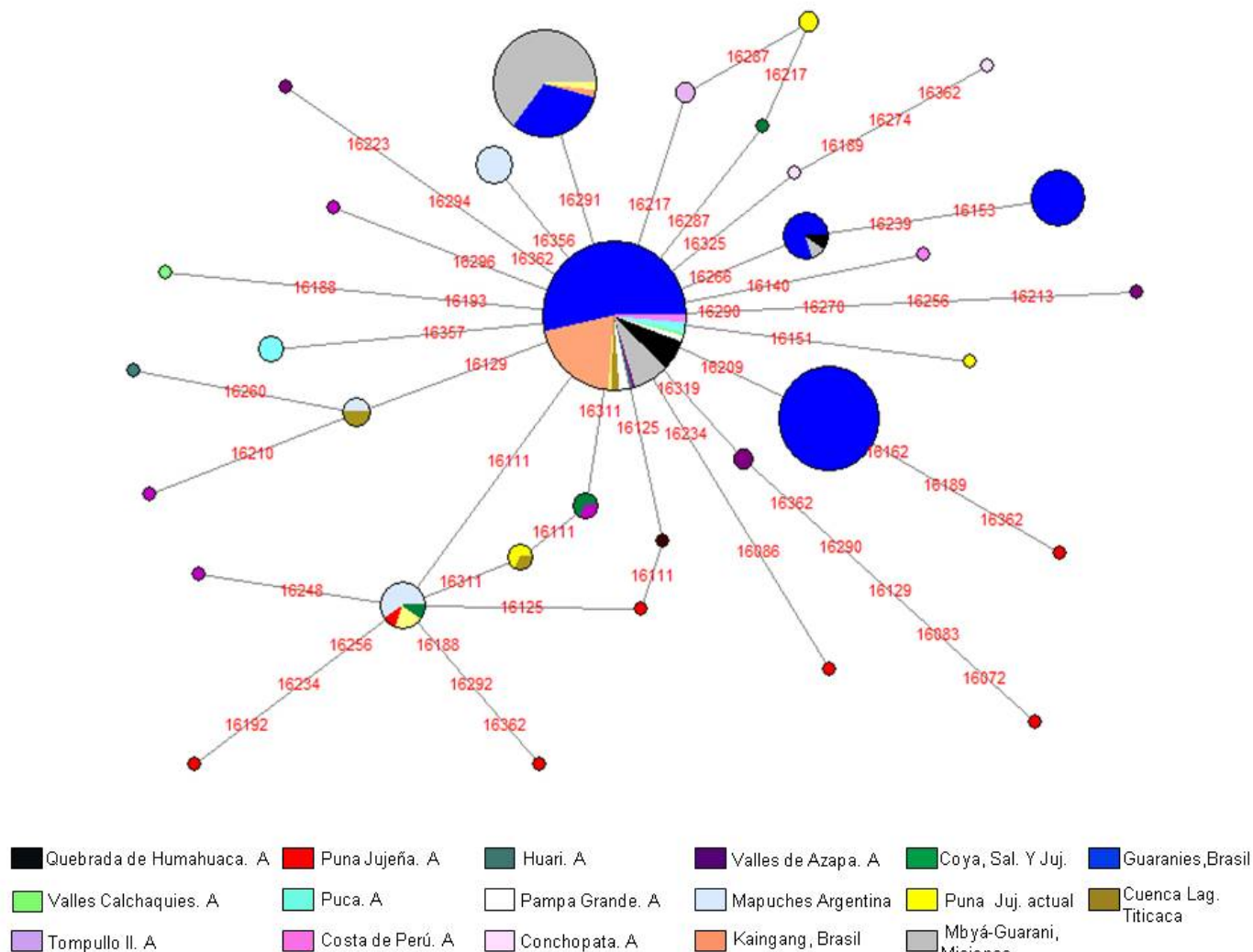


Figura 27. Red de haplotipos del linaje A2 presentes en diferentes muestras prehispánicas (señaladas con la letra A al final) y actuales de Sudamérica.

- Haplotipos de B2

Para este análisis se consideró un total de 303 individuos portadores del Haplogrupo B2, presentándose una gran diversidad de haplotipos (n=104). En el análisis inicial, al considerar todos los individuos se obtuvo una red de gran complejidad, que dificultaba su interpretación. Por lo tanto, sólo se incluyeron aquellos más relevantes para este estudio, considerando los haplotipos más relacionados a las muestras prehispánicas analizadas en la presente tesis, comprendiendo un total de 8 haplotipos y 102 individuos (Figura 28).

En la Figura 28 se observa que 2 haplotipos de la muestra de Puna Jujeña están compartidos con otras muestras poblacionales. El haplotipo B2 de Doncleas presentado por Mendisco *et al.*, (2014) también está presente en individuos precolombinos de los Valles altos de los Ríos Palpa y Viscas y Conchopata (Perú), y en muestras actuales de Coyas y de la cuenca del Lago Titicaca, Bolivia. Por su parte el haplotipo de DC14 se encuentra en muestras prehispánicas de Pampa Grande y Quebrada de Humahuaca y en individuos actuales de la Cuenca del Lago Titicaca, Coyas y Puna de Jujuy. Por último el haplotipo de DC1 no estuvo presente en ninguna otra muestra poblacional, existiendo la posibilidad de que sea un linaje propio de la Puna Jujeña.

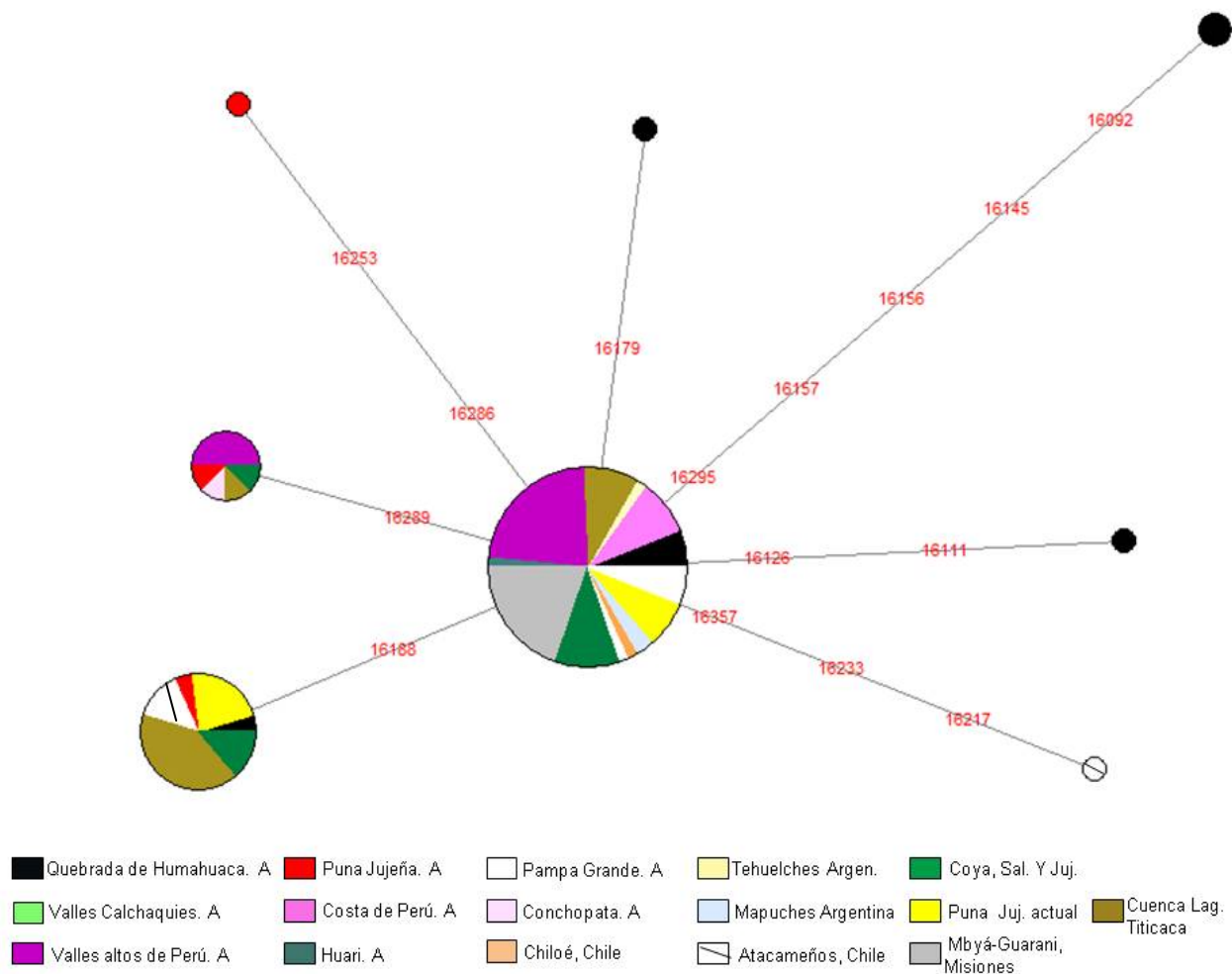


Figura 28. Red de haplotipos del linaje B2. La misma comprende 8 muestras prehispánicas (señaladas con una A al final) y 7 muestras poblacionales modernas de Sudamérica.

- Haplotipos de C1

Se utilizaron 232 individuos que definieron 71 haplotipos distintos, dando una diversidad haplotípica considerable. De los mismos, al igual que en el caso anterior, solo se eligieron aquellos relevantes para la comparación con las muestras en estudio. Los mismos comprendieron 13 haplotipos representados en 19 muestras poblacionales.

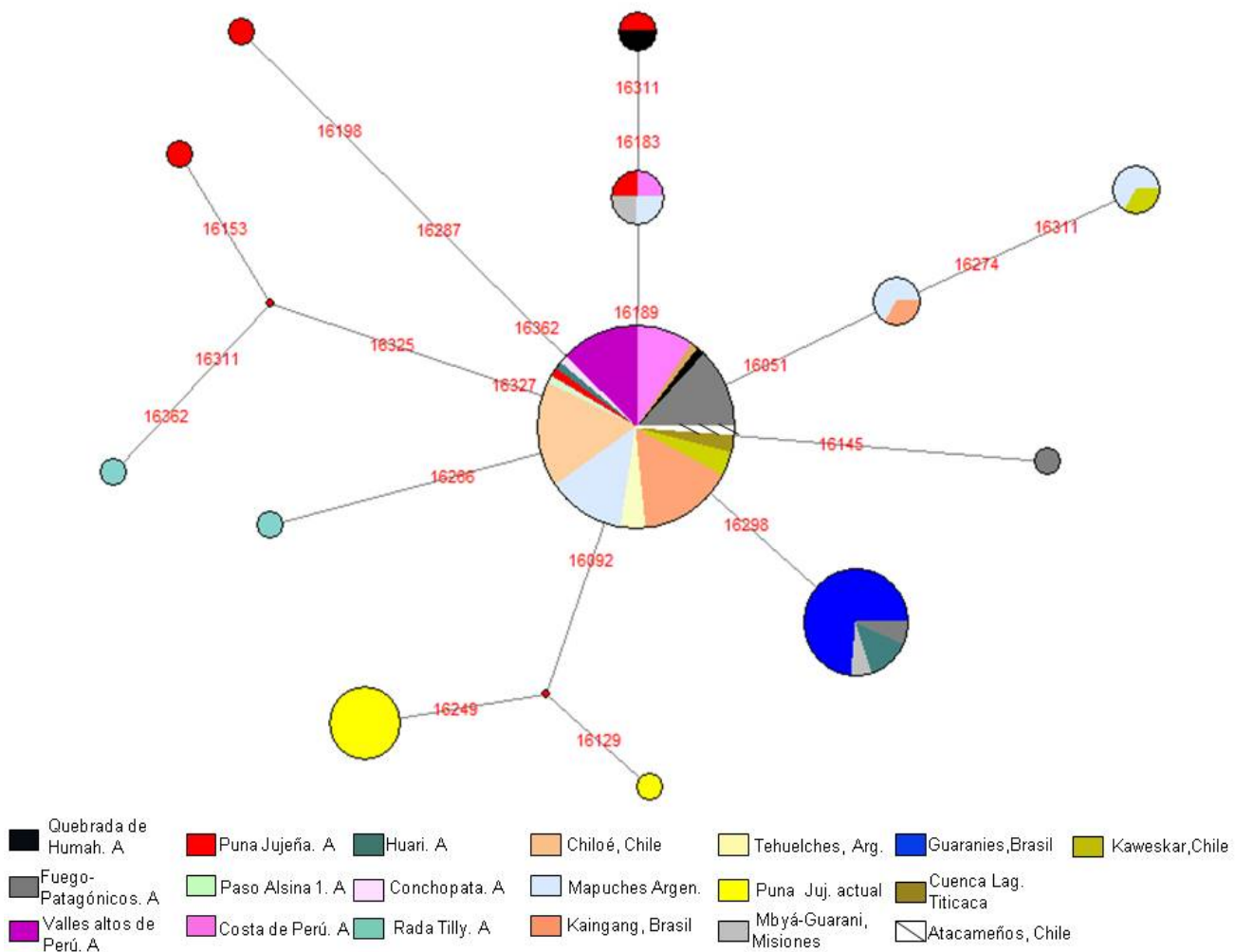


Figura 29. Red de haplotipos del linaje C1 en 9 muestras poblacionales prehispánicas (señaladas con la letra A alfinal) y 10 actuales de Sudamérica.

Como se muestra en la figura 29, en este linaje el haplotipo nodal estuvo presente en 16 de las 19 muestras poblacionales, con mayor representación en las muestras prehispánicas de los Valles altos de los Ríos Palpa y Viscas, y la Costa de Perú, y en las muestras actuales de Chiloé, los Kaingang de Brasil, los Mbyá-Guaraní de Misiones y los Mapuches de Argentina. Dentro de las muestras antiguas estudiadas, la Puna Jujeña fue la que presentó mayor diversidad de haplotipos. Uno de ellos fue el nodal (DC11) compartido con la muestra PA19 de Paso Alsina 1 y otros 76 individuos. El individuo DC5 presenta un haplotipo ampliamente representado en la muestra antigua de la Costa de Perú y en las muestras actuales de Mapuches y Mbyá-Guaraníes de Argentina. El haplotipo de C1 presentado por Mendisco *et al.*, (2014) para Doncellas, también ha sido descrito en muestras antiguas de la Quebrada de Humahuaca. De las muestras en estudio hubo 4 individuos portadores de haplotipos únicos, dos correspondían a la muestra de Puna (DC6 y DC10) y dos de Rada Tilly (DB6 y DB2).

- Haplotipos de D1

Al igual que los casos anteriores, dada la complejidad de la red obtenida con todas las muestras disponibles, se seleccionaron 36 de un total de 91 haplotipos, descritos en 332 individuos de grupos prehispánicos y actuales. Los 36 haplotipos seleccionados se encuentran presentes en 21 muestras poblacionales (Figura 30).

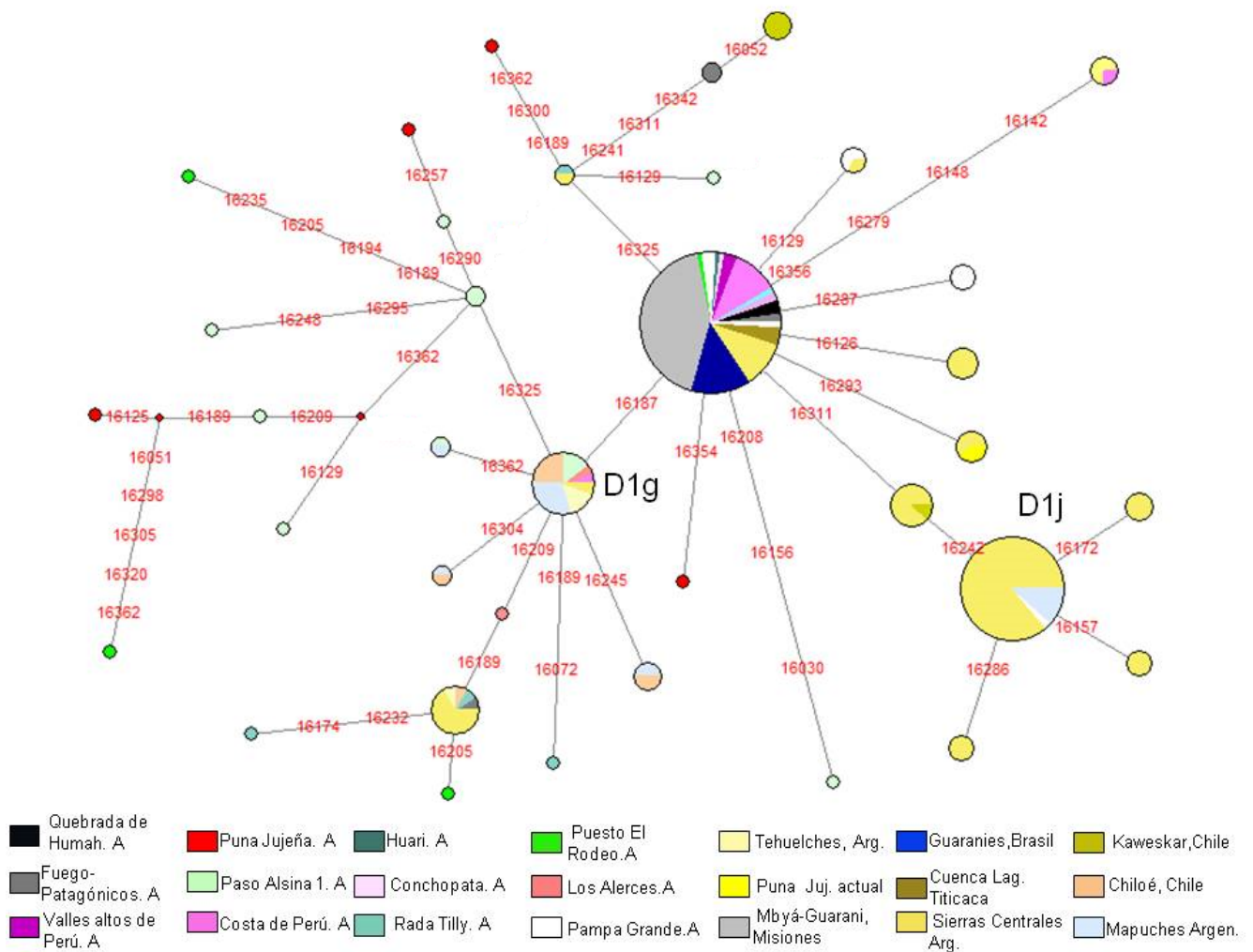


Figura 30. Red de haplotipos del linaje D1. La misma abarca 12 muestras poblacionales antiguas (señaladas con una A al final de su rótulo) y 9 actuales de Sudamérica

El haplotipo nodal se detectó en 15 de las muestras poblacionales siendo 10 de ellas prehispánicas. La muestra AMZ 5 dentro del grupo de muestras de Puesto El Rodeo es la única de todas las estudiadas que presenta ese linaje. El haplotipo de las muestra PA5 se diferencia del nodal por las mutaciones: 16030T, 16156A, 16208A, y el haplotipo de la muestra PA21 se diferencia del mismo por la mutación 16354T.

Un segundo haplotipo muy representado es el D1j determinado por las mutaciones 16311C y 16242T. El mismo se encontró con una alta frecuencia en

muestras actuales de las Sierras Centrales, seguido por los Mapuches modernos de Argentina y los Atacameños de Chile.

El tercer haplotipo más frecuente fue el D1g (16187T- 16223T- 16325C- 16362C) presente en muestras prehispánicas de la Costa de Perú, Los Alerces (LA1) y 3 de las muestras de Paso Alsina 1 (PA10, PA11 y PA15). También estuvo presente en muestras actuales de Chiloé, Chile, Mapuches, Tehuelches y Sierras Centrales de Argentina. De este haplotipo se desprendieron varias ramas, una de las cuales correspondió al de la muestra DB1, otra del haplotipo de la muestra LA 2. De este último se despliega un nodo que presenta la mutación 16189C y está presente en la muestra DB4 de Rada Tilly, en muestras antiguas de Fuego-Patagónicas, y en muestras actuales de Chiloé, Tehuelches y Sierras Centrales. La muestra RP2 de El Rodeo está relacionada con este último haplotipo diferenciándose del mismo por un solo evento mutacional, y parecería no estar presente en ninguna de las muestras comparadas. Lo mismo sucedió para el haplotipo DB3 (Rada Tilly), pero que se diferencia por dos mutaciones.

Los linajes restantes de D1 relacionados al D1g presentes en Paso Alsina 1, en la Puna Jujeña, en las muestras de Puesto El Rodeo y Rada Tilly están todos muy relacionados entre sí, ya que todos ellos comparten mutaciones. Los 3 haplotipos de Puna Jujeña se diferenciarían de las muestras de Patagonia y Paso Alsina 1 por al menos una mutación, pudiendo ser los primeros derivados de los segundos.

6.8 Análisis de la determinación del sexo por amplificación del gen de la amelogenina

De las 55 muestras estudiadas se logró establecer el sexo molecular de 4 de las muestras de la Puna jujeña, obteniendo dos individuos masculinos (DC3 y DC9) y dos femeninos (DC1 y DC4). Este resultado se obtuvo mediante la amplificación por PCR común y la posterior observación de la diferencia de 6 pb

entre ambos sexos (Figura 31). Teniendo en cuenta la comunicación personal de la Dra. Laura Fuchs, la determinación del sexo a partir de este marcador molecular coincidió con los sexos determinados por morfología para esos individuos.

El resto de las muestras se analizó más de 3 veces para este marcador molecular sin obtenerse resultados favorables tanto para el método de amplificación por PCR, como para el método de PCR en tiempo real utilizando las curvas de disociación.

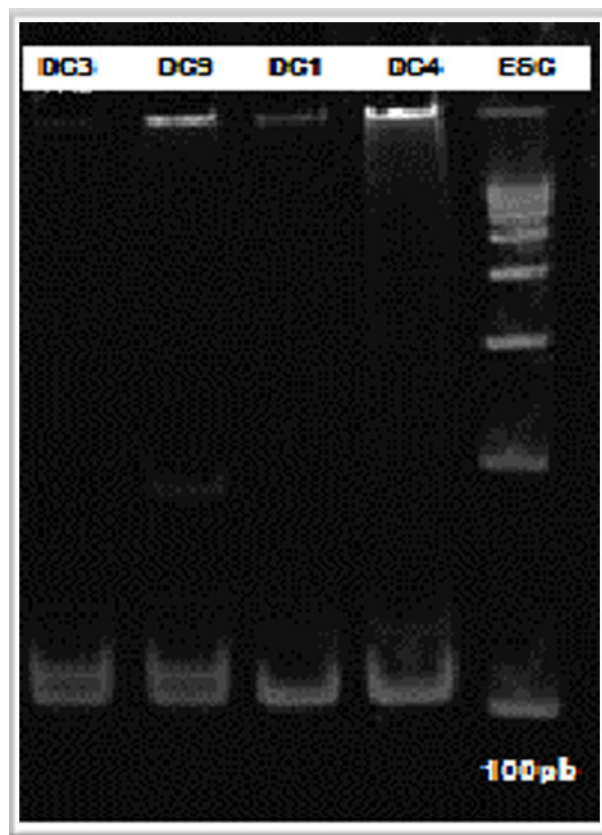


Figura 31. Resultados de la determinación del sexo de los individuos analizados. Los individuos varones muestran dos bandas y los femeninos una.

Capítulo 7: Discusión

7.1 Evaluación de los procedimientos llevados a cabo para la obtención del ADN

Uno de los objetivos de esta tesis doctoral fue evaluar los potenciales y las limitaciones que presenta el trabajo con material genético antiguo. A continuación se realiza un análisis sobre estos aspectos, y una comparación con la información disponible en la bibliografía sobre el tema.

7.1.1 Rendimiento del tipo de material óseo utilizado y condiciones de preservación

Las principales dificultades que se han encontrado en el procesamiento de extracción de material genético a partir de restos arqueológicos es el tamaño del material óseo o piezas dentales donde se extrajo el ADN. A causa de ello, antes de comenzar con las investigaciones fue necesario hacer una planificación de los pasos a realizar, como por ejemplo la estimación de la cantidad de polvo de dentina o hueso que es factible obtener y que se puede procesar cada vez, para poder realizar al menos tres extracciones diferentes.

Si bien la dentina y polvo de costilla obtenido fue similar en cantidad, fue notoria la diferencia en preservación del material genético observado entre ellos. De las 3 costillas analizadas solo se obtuvo resultados favorables para 1 de ellas. Esto además podría haber estado influenciado por la forma de conservación de la muestra (AMZ 5) descrita en la sección 4.2.3.3 y por la poca profundidad temporal de la misma la cual fue datada en 210-212 años AP, lo que llevaría a suponer una corta exposición a agentes tafonómicos.

Para las piezas dentales en general se obtuvo resultado para 42 de las 54 analizadas, demostrando que la cubierta de esmalte y cemento que recubre la cavidad de la pulpa, podría ser una protección ante los agentes de degradación autolítica y postmortem a los cuales está expuesto el material genético de los

restos arqueológicos y una protección ante los procesos tafonómicos ocurridos en los yacimientos donde se encontraban, generando un retardamiento en los efectos de la acción de dichos procesos (Pääbo et al., 2004).

Además observamos diferenciación en la obtención de material genético entre muestras de un mismo sitio arqueológico o una misma colección, por lo cual en base a estas observaciones coincidimos con otros autores en que la obtención de resultados positivos depende principalmente del estado de preservación individual de cada muestra y del tipo de muestra esquelética, más que de la antigüedad de las mismas (Stone y Stoneking et al., 1999; Poinar y Stankiewicz, 1998; Carnese et al., 2010). Por su Parte Kemp et al. (2007), al igual que en este estudio no obtuvieron resultados favorables en la extracción de ADN a partir de una costilla, pero si a partir de piezas molares.

7.1.2 Evaluación de los métodos de extracción de ADN utilizados

Además de la preservación diferencial del ADN en cada tipo de pieza esquelética utilizada, es importante la cantidad de ADN endógeno que puede estar disponible en cada una, siendo uno de los factores limitantes en los estudios arqueogenéticos al igual que en los forenses. Es de crucial importancia La utilización de protocolos que recuperen la mayor cantidad de ADN (Rohland y Hofreiter, 2007a y 2007b). Se han publicado varios trabajos con proposiciones de diferentes técnicas utilizando diferentes solventes orgánicos, suspensión de sílica, columnas con filtros donde está retenida la misma o equipos comerciales (Höss y Pääbo, 1994; Hänni *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1998; Kalmar *et al.*, 2000; Bouwman y Brown, 2002; Hummel, 2003). Sin embargo muy pocos son los que realizan comparaciones entre ellos para determinar cuál es el de mayor rendimiento (Rohland y Hofreiter, 2007a). Por esta razón uno de los objetivos de esta tesis era “Estimar el mejor rendimiento en la obtención de ADN utilizando diferentes métodos de extracción” disponibles.

Como pudimos observar en los resultados el protocolo que demostró la mayor recuperación de ADN, independientemente del tipo de muestra, fue el de *Fenol-Cloroformo-Alcohol-Isoamílico*. Además comprobamos que se pudo amplificar ADN de una muestra que fue extraída con este método, pero que por los otros protocolos utilizados presentaba agentes inhibitorios para la PCR. Acordamos con los trabajos que señalan que es uno de los métodos más apropiados para las muestras de una gran temporalidad y con una alta probabilidad de degradación (Kemp et al., 2007; Wilson, et al., 2007, Bolnick, et al., 2012, Jenkins, et al., 2012, Grier, et al., 2013), y no con Rohland y Hofreiter (2007b), quienes sostienen que la extracción con sílica en suspensión es más eficiente. Barta *et al.* (2014) realiza una crítica a los trabajos antes mencionados sosteniendo que ninguno presenta cuál es la cantidad de ADN existente en las muestras para luego determinar el rendimiento, sino que solo describen el que mejor le funcionó a cada investigador.

7.1.3 Planteo de las dificultades observadas durante la amplificación del material genético obtenido

En aquellas muestras en las que se pudo obtener ADN, otro de los problemas significativos que se observaron durante el procedimiento estuvo relacionado a la amplificación de los mismos. Al comienzo de esta investigación se utilizaban cebadores para la PCR de secuenciación de HVR I que amplificaban segmentos de más de 200 pb, por lo que la mayoría de los intentos de las reacciones realizadas eran fallidos. Posiblemente debido a que el material genético antiguo al estar degradado no se encuentra fragmentado en segmentos de menos de 180 pb. Por lo tanto, teniendo en cuenta que el material genético de los restos esqueléticos presentaba diferentes grados de degradación y posiblemente estaba muy fragmentado, decidimos reducir el tamaño de los fragmentos utilizando nuevos cebadores que permitieron amplificar segmentos de ADN más cortos. Este cambio permitió un mejoramiento del 70% en el rendimiento en las amplificaciones para su secuenciación.

Observando esa tasa de incremento en los resultados favorables, se decidió realizar lo mismo para los segmentos de amplificación del gen de la amelogenina, pero aún así no hubo resultados favorables suficientes. La diferencia en el número de resultados para el ADNmt y el gen de la amelogenina ubicado en el ADN nuclear, puede deberse a que el primero se encuentra en una mayor proporción por célula, con lo que es más probable la recuperación de algún segmento del tamaño deseado. Por esta razón posiblemente logramos obtener un 73,68% de recuperación para el ADNmt en las 57 muestras analizadas, mientras que para el sexado molecular solo obtuvimos un 7%.

Otra de las dificultades durante la amplificación fue la necesidad de realizar al menos tres extracciones independientes para cada muestra a fin de corroborar la autenticidad de los resultados obtenidos. En los análisis de ADN observamos que la probabilidad de obtener amplificaciones fue prácticamente aleatoria, posiblemente por el bajo número de copias de ADN que puede estar presente en la elución de las muestras luego de cada extracción. En consecuencia, la obtención de los resultados favorables fue un proceso arduo y con una importante prolongación en el tiempo, sobre todo teniendo en cuenta en todo el procedimiento los requerimientos básicos para evitar contaminación. Dado el grado de deterioro del ADN junto con el riesgo de contaminación con ADN exógeno contemporáneo, fue necesario llevar a cabo exhaustivos controles de contaminación a lo largo de todo el procedimiento, como fue detallados en el capítulo de Materiales y Métodos, así como también realizar múltiples comprobaciones del mismo resultado, tanto entre los diferentes extractos del mismo individuo como entre diferentes amplificaciones de alícuotas del mismo extracto. En las 57 muestras analizadas, para ser consideradas como datos válidos, el resultado obtenido debe lógicamente ser coincidente. Aquellas muestras que no pudieron ser autenticadas por no obtenerse al menos tres veces el mismo patrón polimórfico, fueron desestimadas.

Todas estas dificultades sumadas al bajo número de muestras arqueológicas disponibles para su estudio, propio de los estudios arqueológicos, son limitantes para este tipo de investigaciones. Sin embargo es de destacar que

aún así es posible obtener resultados de gran valor para diferentes líneas de investigación, como la evolución del hombre moderno, su dispersión, relaciones filogenéticas y poblamiento americano.

7.1.4 Estimaciones sobre los porcentajes de recuperación de ADN_a obtenidos

El porcentaje de recuperación obtenido para la tipificación de Hgs maternos amerindios por RFLP para las 24 muestras de un total de 57 analizadas fue del 42,1%. Si se analiza cada muestra por separado el porcentaje de Los Alerces fue del 100%, del 66,67% en Rada Tilly, del 52,17% en la Puna Jujeña, del 50% en Alero Mazquiarán Puesto El Rodeo respectivamente y del 15% en Paso Alsina 1.

En comparación con otras muestras prehispanicas analizadas, para muestras de todo el actual territorio chileno en las cuales se determinaron los linajes maternos por RFLP se obtuvo un porcentaje de recuperación de 62,5% (Manriquez *et al.*, 2011) el cual, es levemente mayor al obtenido en este estudio. En comparación con el porcentaje de recuperación obtenido para los resultados de RFLP en una muestra precolombina de Córdoba (90,57%) (Nores *et al.*, 2011) es bajo si no se considera que se están tomando muestras de diferentes regiones geográficas. Ahora bien, si ese porcentaje se compara con los de las muestras de Patagonia en particular, esos porcentajes de recuperación son similares. Como ya se ha señalado, la probabilidad de obtener resultados favorables de ADN_a depende directamente del estado de preservación de cada muestra, por ende de las condiciones climáticas y procesos tafonómicos a los cuales estuvo expuesto cada material arqueológico.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos para la secuenciación de HVR I, los porcentajes de recuperación son muy diferentes a los obtenidos por RFLP. Esta diferencia puede deberse a que luego de realizarse al menos dos intentos en la amplificación de la región codificante del ADN_{mt} y no obtenerse resultados que

puedan ser comparados, en algunas muestras se priorizó la secuenciación de la HVR I, teniendo en cuenta la mayor eficacia en el aprovechamiento del material genético obtenido para cada muestra. La secuenciación de la región control a diferencia de los RFLP, posee un mayor poder de resolución en la determinación del linaje materno de una muestra y en las comparaciones de sitios polimórficos realizadas con otros individuos.

Para la HVR I se obtuvo a nivel de todas las muestras analizadas un porcentaje de recuperación del 73,68% (42/57). Para cada muestra por separado el mismo fue: para Los Alerces y Rada Tilly del 100% respectivamente, para Puesto El Rodeo del 75%, para la Puna Jujeña del 73,91%, para Paso Alsina 1 del 65% y por último para Alero Mazquairán del 50%. Con estos porcentajes elevados en cada una de las regiones estudiadas no puede inferirse si las muestras estaban expuestas a procesos de degradación diferenciales o si las distintas condiciones ambientales que se fueron desarrollando en cada región a lo largo del Holoceno Tardío en cada región jugó un rol importante en la preservación del material genético arqueológico. Sin embargo, puede apreciarse que no se han analizados muestras en este trabajo de la zona de mayor problemática a nivel de recuperación de restos esqueléticos, como es la región litoral del actual territorio argentino, en la cual las condiciones de humedad y elevadas temperaturas influyen en la buena preservación de los restos arqueológicos, por la generación de suelos con grandes variaciones en su pH, producto de la relación entre la retención de agua y la descomposición del material orgánico y de eventos relacionados con la pedogénesis (Gaitán y López, 2007).

En comparación con otras poblaciones de Sudamérica como por ejemplo en la región de Palpa de la costa y valles de Perú (1200- 800 años AP), Fehren-Schmitz *et al.*, (2010) obtuvieron un porcentaje de recuperación del 59,9%, levemente menor al obtenido para este estudio. Para una la muestra de Pampa Grande, Salta, datada en 1310 años AP. Carnese *et al.*, (2010) obtuvieron un porcentaje de recuperación similar al de Puna Jujeña (80,95%), y al obtenido por Mendisco *et al.* (2014) del 80,39% para el análisis de muestras en conjunto de la

Quebrada de Humahuaca y Puna Jujeña y del Valle Calchaquí en Salta (todos pertenecientes al Periodo de Desarrollos Regionales). Por su parte, Moraga *et al.* (2010) obtuvieron resultados de tipificación de ADN en el total de las 7 muestras prehispánicas (1700 a 250 años AP) de la cultura Kawaskar analizadas del sur de Chile obteniendo un porcentaje de recuperación del 100%. Sin embargo para muestras Fuego-Patagónicas de Chile y Argentina datadas en 200 – 100 años AP, García-Bour *et al.* (2004) obtuvieron un porcentaje de recuperación de ADN del 40%, el cual es relativamente bajo si se compra con las muestras mencionadas. Por su parte Casas-Vargas *et al.* (2011) obtuvieron un 100% de recuperación en 17 individuos de 1090 ± 70 años AD de un sitio arqueológico ubicado en La Purnia, Santander, Colombia. Lewis Jr. *et al.* (2007) de un total de 94 individuos Chen Chen de diferentes regiones del sur de Perú, datados entre 7200- 1000 años AP obtuvieron resultados favorables para un 41,49% de las muestras. Estas comparaciones en las proporciones de obtención de resultados de ADN en diferentes regiones y de diferentes temporalidades, demuestra lo propuesto con anterioridad, que el estado de preservación está sujeto a la calidad de cada una de las muestras en particular, teniendo el tiempo de depositación una leve influencia.

Desde la perspectiva de los tipos de enterratorio de los cuales provienen cada una de las muestras analizadas del actual territorio argentino, no se observaron grandes diferencias en el grado de recuperación del material genético entre los entierros primarios descritos para la Puna Jujeña y los entierros secundarios propuestos para Paso Alsina 1 por ejemplo, siendo este último levemente menor, y en los cuales el número de individuos totales analizados se asemejó. Se observaron diferencias en la estructura morfológica de las piezas dentales de cada lugar, en donde las de Paso Alsina presentaban un gran deterioro físico ya que algunas se pulverizaban durante el procedimiento de desbaste de la pulpa dental. Por esta razón podría inferirse que el tratamiento que recibieron los restos esqueléticos previos a su depositación en fardos funerarios de entierros secundarios, como el descarte y tratamiento con tinturas, pudo no

haber tenido una gran influencia en la composición química de la muestra, manteniendo las condiciones de preservación del ADN.

Cabe señalar que el número de muestreos es pequeño aún, sobre todo para las muestras provenientes de la Patagonia por lo que las conclusiones en cuanto a la preservación expuestas y el grado de recuperación obtenidos para cada caso deben ser tomadas con precaución. Sería recomendable a futuro ampliar el número de individuos analizados para poder estimar el impacto del ambiente de cada región sobre la preservación del material genético contenido en los restos arqueológicos.

7.2 Interpretación de los linajes maternos obtenidos por secuenciación

La obtención de resultados positivos en los estudios de ancestría sobre genomas antiguos, adquieren una importante relevancia debido a que su obtención es bastante compleja y puede aportar información importante. La diversidad genética que estaba presente en amerindios precolombinos contribuiría al conocimiento sobre el origen de los primeros americanos, a la comprensión de su distribución demográfica a lo largo de todo el territorio americano y el eje temporal. El desarrollo de estudios de ADN en Argentina aportaría información novedosa echando luz sobre los intrincados procesos de poblamiento de nuestro territorio en el contexto de Sudamérica.

A continuación se enumeran los resultados obtenidos y conceptos relacionados a los mismos que permitieron alcanzar, en gran medida, los objetivos propuestos en esta tesis y contrastar las hipótesis planteadas. El primero de estos objetivos fue: *-Determinar los linajes maternos en varios grupos de muestras arqueológicas del Noroeste Argentino y Patagonia a partir del estudio de los haplogrupos mitocondriales en diversos sitios arqueológicos y muestras de colecciones de museo, y las hipótesis derivadas del mismos: "Las muestras del*

Noroeste argentino presentan mayor diversidad de linajes que las muestras de Patagonia” y “La diversidad de linajes encontrada en una muestra depende de la ubicación geográfica”.

Para lograr responder a estas cuestiones, se realizaron estudios de RFLP y secuenciación de la HVR I del ADNmt en muestras del noroeste, centro-sur y diversas regiones del sur del actual territorio argentino. La muestra de la Puna Jujeña comprendió individuos portadores de los 4 Hgs amerindios principales obteniéndose un mayor porcentaje de A2 (Tabla 33). En comparación, en las 4 muestras restantes solo se obtuvieron representantes de los Hg C1 y D1 (Tabla 33) tal como ya había sido propuesto para otros estudios de ancestría materna en la región (Lalueza *et al.*, 1997; García-Bour *et al.*, 2004; Moraga *et al.*, 2010; Dejean *et al.*, 2008). Parecería que a medida que los linajes de A2 y B2 se van diluyendo hacia el sur, la frecuencia y diversidad de C1 y D1 aumentan, posiblemente hasta fijarse en la región (Moarag *et al.*, 2010)

Como puede observarse en la tabla 33, la única muestra que presentó linajes compartidos entre sus individuos fue Paso Alsina 1 ya que el número de haplotipos presentes es menor al número de individuos analizados, por esta razón la diversidad haplotípica también es menor que en el resto de las muestras. Una conclusión que se desprende de estos resultados es que la variación genética mitocondrial intrerna de cada muestra fue elevada.

Tabla 33. Resultados de muestras analizadas obtenidos a partir de la secuenciación de HVR I

Muestra	nº de individuos	%A2	%B2	%C1	%D1	h	Hd	π
Puna Jujeña	17	41,18	11,76	23,53	23,53	17	1 ± 0,02	0,02047 ± 0,00152
Paso Alsina 1	13	0,00	0,00	7,70	92,30	10	0,949±0,051	0,00892±0,00167
Los Alerces	2	0,00	0,00	0,00	100,00	2	1±0,5	0,00292±0,00146
Rada Tilly	6	0,00	0,00	33,33	66,67	6	1±0,096	0,01501±0,00258
Puesto El Rodeo	4	0,00	0,00	0,00	100,00	4	1±0,177	0,01754±0,00391

Por su parte, la diversidad nucleotídica obtenidas para Paso Alsina 1 y Los Alerces es de un grado de magnitud menor que la presentada por las otras 3 muestras. Esto estaría indicando que los haplotipos de esas muestras se diferencian entre sí por pocos eventos mutacionales, teniendo en cuenta que en ambos casos el linaje más representado es el D1g.

Por otro lado, que las muestras de Rada Tilly y Puesto El Rodeo hayan presentado una diversidad nucleotídica cercana a la de la Puna Jujeña, no es un dato menor, ya que en las dos muestras de Patagonia solo se describieron linajes para los Hgs amerindios C1 y D1, mientras que para la muestra del NOA hubo representantes de los 4 Hgs (A2, B2, C1 y D1). Esto estaría indicando que la diversidad de C1 y D1 en ambas muestras de Patagonia sería elevada y que las secuencias de los haplotipos se diferencian entre sí por más de dos sitios polimórficos, como se mostró en las tablas 18 y 20. Se podría concluir que aunque hasta el momento, en la región sur de Argentina, solo se hayan encontrado linajes de C1 y D1 en muestras prehispánicas, los mismos pueden presentar una gran diversidad, dando indicios de que en esa región ambos Hgs podrían poseer la mayor antigüedad.

7.2.1 Análisis de los resultados obtenidos para cada muestra en comparación con otras poblaciones de la región

Otro de los objetivos planteados eran “Estimar los patrones de intra e intervariación poblacional en haplotipos mitocondriales” y “Comprender las posibles relaciones filogenéticas de las muestras estudiadas, considerando la existencia o no, de lazos filogeográficos entre ellas y con otras poblaciones sudamerindias extintas y actuales” por lo que a continuación se presentaron todos los análisis realizados y los datos recopilados para cumplir con tal fin.

- Puna Jujeña

En el caso de los análisis realizados para estimar la variación intrapoblacional se llevaron a cabo varias comparaciones. La primera de ellas fue la comparación de la varianza por AMOVA de cada una de las muestras analizadas con otras de la misma región. Para el caso de la Puna Jujeña la cual fue comparada con otras 15 muestras, se observó que la mayor variación se encuentra dentro de cada muestra entre los linajes de cada uno de sus individuos. Sin embargo, las diferencias entre las muestras fueron significativas indicando que al menos una de ellas se diferencia de las otras. Para identificar que muestras poseían una diferenciación genética significativa se realizaron comparaciones de pares de secuencia (F_{ST}). Estos resultados demostraron que la muestra de la Puna Jujeña analizada, se diferencia de otras muestras del NOA, como Pampa Grande (Carnese *et al.*, 2010) y Quebrada de Humahuaca centro (Mendisco *et al.*, 2014) y de ciertas muestras de Perú (Fehre-Schmitz *et al.*, 2014; Baca *et al.*, 2012, 2014). Estas diferencias pueden tener sustento en la evidencia arqueológica que sostiene que la Región Andina fue poblada por una sola oleada migratoria a través de la Cordillera (Rothhammer y Dilehay, 2009), pero el territorio del sur de los Andes Centrales ha sido influenciado por grupos genéticamente heterogéneos a lo largo del Holoceno, provenientes de poblaciones ubicadas más al norte de los Andes. Además algunas de ellas pudieron haber estado genéticamente aisladas o haber

recibido influencias desde otras regiones, como por ejemplo la región de Chaco, como se propone para el caso de la Quebrada de Humahuaca (Mendisco *et al.*, 2014) o de la región de Pampa Grande (Carnese *et al.*, 2010). El linaje B2 con la mutación 16142T de Pampa Grande fue descrito para poblaciones actuales de Mendoza, San Juan y La Rioja, con lo que podría suponerse que esta región de Salta habría estado relacionada con poblaciones ubicadas más al sur, en el centro-oeste del actual territorio argentino (Motti *et al.*, 2014). Debe tenerse en cuenta además la temporalidad de cada uno de las muestras que presentaron diferenciación, ya que las de Perú y Pampa Grande fueron asignadas a periodos anteriores a los de Puna Jujeña.

Es interesante destacar que la Puna Jujeña presentó un mayor porcentaje de linajes A2, el cual no se ha demostrado que haya tenido una gran dispersión entre los grupos andino. La mayoría de las poblaciones del sur de los Andes centrales prehispánicas se caracterizan por la presencia de una alta proporción de linajes de B2 (Lewis *et al.*, 2005; Kemp *et al.*, 2009; Fehren-Schmitz *et al.*, 2010; Carnese *et al.*, 2010; Baca *et al.*, 2012, 2014; Mendisco *et al.*, 2014). Tampoco se observó la frecuencia de linajes de A2 obtenida, en muestras actuales de la Puna Jujeña (Cardoso *et al.*, 2013). Solo las muestras actuales de Guaraníes de Brasil presentan una gran proporción de A2 (Marrero *et al.*, 2007). A partir de este último dato podría inferirse una asociación entre estos grupos del este con la Puna Jujeña, pero no hay evidencia suficiente que sustente esta hipótesis.

En el análisis de redes de haplotipos (figura 27) solo uno de los linajes presentados para la Puna Jujeña (DC7) parecería estar relacionado a los Guaraníes actuales de Brasil, pero el mismo presenta 3 eventos mutacionales de diferencia con los mismos, con lo cual puede suponerse un ancestro común para las poblaciones que poblaron ambas regiones, más que flujo génico entre ellos. El haplotipo de la DC9, presentó la mutación 16192T la cual solo fue descrita en poblaciones circumpolares Inuit de Groenlandia y nombrado como A2a (Achilli *et al.*, 2008). Ese sitio polimórfico también fue descrito para un individuo Mapuche actual de Argentina (de Saint Pierre *et al.*, 2012) y para otro de Chiloé, Chile (Horai

et al., 1993). Otros dos sitios polimórficos presentes en el mismo haplotipo de DC9, el 16234T y 16256A, sin embargo, no fueron descritas para esas muestras, ni en otras precolombinas, solo encontrándose en un Coya actual del NOA pero careciendo de la 16192T (Álvarez- Iglésias et al, 2007). Otro dato relevante para los otros 4 linajes A2 obtenidos, fue que se observó un relación con muestras antiguas y actuales de la Región Andina pero ningún de los haplotipos estuvo compartido con otras muestras, indicando que se podría tratar de linajes que evolucionaron específicamente en la Puna Jujeña.

Para los linajes de B2 de Puna Jujeña se observó que una de las muestras, DC 14, presenta una variante particular dada por la mutación 16188T que fue descrita para una muestra de Tilcara en la Quebrada de Humahuaca sur (Mednisco et al., 2014) y que está distribuida en varias muestras Andinas actuales como los Quecha y Aymara de Bolivia (Barbieri et al., 2011), Atacameños de Chile (de Saint Pierre et al., 2012), Coyas de Jujuy y Salta (Álvarez-Iglésias et al., 2007) y de la Puna Jujeña (Cardoso et al., 2013). Teniendo en cuenta este resultado y viendo que otras poblaciones prehispánicas antiguas no presentaron este linaje, podría hacerse alusión al concepto de homopatría, el cual refiere al hecho de que las poblaciones actualmente asentadas en la región donde habitó determinado grupo étnico, conservarían linajes propios de dicho grupo (Gonçalves et al., 2010).

Para el caso de los haplotipos de C1 obtenidos, uno de ellos presentó las mutaciones del nodal (DC11), y los otros dos (DC6 y DC10) fueron exclusivos de Puna Jujeña y al diferenciarse del haplotipo nodal por 3 mutaciones específicas, podría inferirse que los mismos poseen una gran temporalidad de establecimiento en la región. Sobre todo si se tiene en cuenta que los mismos no fueron hallados en ninguna muestra de Patagonia prehispánica o actual, donde se presupone que el linaje C1 se fijó y tuvo una mayor diversificación, al igual que los linajes de D1 (García et al., 2006).

En cuanto a los linajes de D1 encontrados, solo uno (DC21) presentó un haplotipo diferenciado del nodal por una sola mutación (16354T), el resto

siguiendo la red de haplotipos obtenida (figura 30), presentaron diferentes haplotipos de D1g y se encontraron muy relacionados a las muestras del sur de Argentina prehispánicas y actuales, por lo cual puede suponerse que los linajes específicos encontrados en la Puna Jujeña podrían ser derivados de aquellos.

Tabla 34. Linajes mitocondriales presentes en las 16 muestras utilizadas para la comparación interpoblacional de la región norte

Muestra	Linajes	nº de individuos	% linajes
Pampa Grande	9	19	0,47
Quebrada de Humahuaca centro	6	16	0,38
Quebrada de Humahuaca sur	9	10	0,9
Valle Calchaquí	4	5	0,8
Puna Jujeña	19	19	1,0
Valles de Azapa	16	17	0,94
Tompullo II	11	24	0,46
Acchaymarca	9	11	0,82

Muestra	Linajes	nº de individuos	% linajes
Puca	9	14	0,64
Costa y Valles (Palpa) EIP	40	63	0,63
Costa y Valles (Palpa) LIP	17	23	0,74
Costa y Valles (Palpa) MH	9	11	0,82
Valles altos del Río Palpa y Viscas (Tranca) MH	23	46	0,50
Valles altos del Río Palpa y Viscas (Tranca) LIP	20	31	0,65
Huari	12	12	1,0
Conchopata	8	8	1,0

Tal como se presentó hasta el momento, la Puna Jujeña posee una gran diversidad de haplotipos los cuales se vio que están poco compartidos o escasamente relacionados con otras muestras de otras regiones geográficas. De un total de 329 individuos precolombinos provenientes de 16 muestras diferentes del Sur de los Andes centrales se obtuvieron un total de 159 haplotipos, de los

cuales los 19 linajes de Puna Jujeña representaron un 11,95%, esta diversidad haplotípica. Este dato no es menor si se tienen en cuenta la representación de haplotipos de otras muestras, donde la diversidad encontrada solo fue superada por la presentada por las 3 muestras de Perú con mayor número de individuos (Tabla 34). Además la Puna Jujeña junto a la muestra de Conchopata y de Huari de Perú, fueron las únicas en presentar un haplotipo diferente para cada individuo, en el resto al menos dos individuos comparten el mismo haplotipo.

- Paso Alsina 1 y muestras patagónicas

Con respecto a la muestras analizadas para la porción sur del territorio argentino, no se publicaron hasta el momento un número de datos genéticos que puedan compararse con los dato obtenidos para la secuenciación del ADNmt (García-Bour *et al.*, 2004; Dejean *et al.*, 2008; Moraga *et al.*, 2010) y así contextualizar, proponer posibles patrón de dispersión e historia evolutiva de las muestras involucradas en este estudio. Las muestras utilizadas para la comparación comprendieron un total de 54 individuos distribuidos en 4 grupos de muestras (Tabla 25). Para los mismos, pudieron observarse 35 linajes maternos amerindios, en su mayoría C1 y D1, y dentro de este último el D1g. Los haplotipos correspondientes a las muestras de la presente tesis comprendieron un 57,14% (20 linajes maternos) y de ellos sólo tres fueron compartidos con individuos Fuego-Patagónicos. Uno fue el linaje nodal de C1 (figura 29), el otro fue el haplotipo nodal de D1 y uno de los linajes derivados de D1g (figura 30).

Para el AMOVA se observó una gran diversidad dentro de cada muestra(80,90%) mientras que la variación presente entre las mismas si bien fue baja (19,03%) con respecto a la anterior, dio significativa demostrando que al menos dos de las muestras presentan diferenciación genética. En apoyo a este resultado la comparación de diferenciación genética por F_{ST} demostró que tanto la muestra de Paso Alsina 1, la de la Costa Atlántica Patagónica como la de la Patagonia centro-oeste presentaron diferencias significativas con las muestras de

Fuego-Patagónicos (García-Bour *et al.*, 2004; Dejean *et al.*, 2008; Moraga *et al.*, 2010). Esto puede deberse a que los Fuego-Patagónicos presentan mayor número de linajes de C1, mientras que todas las muestras analizadas presentan mayor proporción de D1. De las muestras estudiadas solo Paso Alsina 1 presentó diferencias significativas con la Patagonia centro-oeste, posiblemente debido a que la primera posee representantes de C1 y D1 y la segunda solo de D1.

Las muestras analizadas sumadas a aquellas de Argentina tomadas de la bibliografía (García-Bour *et al.*, 2004; Dejean *et al.*, 2008) sumaron un total de 33 individuos precolombinos y presentaron 26 haplotipos de un total de 35 obtenidos entre las muestras prehispánicas de Argentina y Chile. De esos 26 un 19,2% corresponde a linajes de C1, mientras que el 80,8% restante corresponde a linajes de D1. Dentro de este último el 80,95% corresponden a haplotipos D1g y el resto fueron D1 nodales. Este resultado determinó la gran variabilidad de D1g en la Patagonia, no lográndose un discernimiento en un lugar específico de mayor prevalencia del mismo.

Tal como indica la figura 30, si bien en todas las muestras analizadas los linajes de D1g fueron diferentes, la mayor diversidad estuvo presente en Paso Alsina 1. De los linajes de esta muestra derivan, diferenciándose por al menos un evento mutacional, el resto de los linajes descritos para las muestras de Patagonia, y como ya fue mencionado, también los linajes presentados para el NOA. Dentro del territorio argentino los haplotipos D1g con la mutación adicional 16209C estuvieron presentes en al menos un individuo de cada una de las 6 muestras estudiadas y se describe en la filogenia como D1g5.

Por su parte, el linaje D1g de las muestras LA11, PA10 y PA11, fue descrito en una muestra del Periodo Intermedio Temprano para la costa del sur de Perú (Fehren-Schmitz *et al.*, 2010), determinando por un lado, que es un linaje muy diversificado y segundo que presenta una profundidad temporal elevada ya que la misma presentó una datación de 2.300 años AP aproximadamente. Este último supuesto también encuentra apoyo en la temporalidad de las muestras

analizadas ya que sí bien todas corresponden al periodo del Holoceno Tardío se diferencian por más de 1.000 años.

7.3 Análisis de los resultados obtenidos para la comparación entre las Muestras prehispánicas de todo el actual territorio Argentino

Para lograr contestar a las preguntas que fueron formulados antes de comenzar con este estudio, y para contrastar las hipótesis planteadas, los últimos análisis realizados fueron sobre el total de las muestras analizadas comparando la muestra del NOA con las de Patagonia. Una población que se genera a partir de un número reducido de fundadores, se espera que presente una variación baja de secuencias de ADNmt, es decir que la población sea relativamente homogénea, sin embargo, aunque el número de individuos analizados fue bajo para considerarlo como representativo de la población argentina del Holoceno Tardío, la variabilidad haplotípica que se presentó fue significativa, ya que de los 42 resultados positivos se obtuvieron un total de 37 haplotipos diferentes. Sólo uno de ellos, el C1 nodal (16223T, 16298C, 16325C, 16327T) estuvo compartido entre una muestra del NOA (DC11) y una de Paso Alsina 1 (PA19).

Se utilizaron otras muestras prehispánicas del actual territorio argentino descritas en la tabla 28 para enriquecer las comparaciones entre la porción del noroeste y la Patagonia. De las mismas se extrajo como resultado que hasta el momento se obtuvieron resultados favorables para 102 individuos precolombinos que abarcan una temporalidad de aproximadamente 3.000 a 200 años AP. Las mismas presentaron un 41,18% de Hg D1, seguido del A2 con un 22,55%, el B2 con 20,59% y por último el C1 con un 15,68% de representatividad. Es de destacar la proporción de linajes de D1 encontrada, ya que el mayor número de individuos analizados en total corresponde a muestras del norte de Argentina (n=69) y un 23,2% de estos presentó este linaje.

En total de los 4 Hgs amerindios se obtuvieron 61 linajes, indicando que hay muestras que compartieron alguno de estos tal como se indicó en la tabla 30. El que estuvo presente en mayor proporción fue el D1g y estuvo representado en todas las muestras poblacionales, evidenciando una gran distribución.

A partir de los análisis de la varianza se determinó que existe una mayor variación dentro de cada una de las poblaciones analizadas como sucede en la mayoría de los estudios de variación interpoblacional de muestras antiguas. Pero el dato más relevante fue que se obtuvo una variación genética significativa (Tabla 31) entre grupos tomando las 5 muestras del NOA en un conjunto y las 4 muestras del sur en otro. La mayoría de las muestras del NOA presentaron diferenciación genética significativa con las muestras del sur. Las únicas que no se diferenciaron fueron la muestra de la Costa Atlántica Patagónica y la muestra de Puna Jujeña ($p = 0.05078$).

Observando los resultados obtenidos para las diferenciaciones genéticas entre la comparación de secuencias (F_{ST}) y la comparación de frecuencias de haplogrupos, se observa que en esta última se pierde toda la variabilidad obtenida en la comparación de secuencias, ya que en el escalamiento multidimensional los diferentes linajes de un mismo Hg son tomados en conjunto diluyéndose la diversidad de linajes presentes en los mismos. Igualmente, la representación gráfica dada por dos variables de las distancias genéticas, parecería haber sido una buena representación de las distancias reales que existieron entre las muestras.

Finalmente, el análisis de procrustes solo fue realizado sobre el linaje que presentó mayor diversidad entre las muestras analizadas que fue el D1. Utilizando muestras del NOA, norte de Chile y sur de ambos países, este análisis determinó que existe una correlación baja entre la distancia geográfica y la distancia genética presente entre las muestras analizadas, sin embargo las coordenadas geográficas arrojadas por el programa a partir de la distancia genética agrupó a los linajes de D1 en el centro-sur de la Argentina. Estos resultados permiten inferir que la mayor diversidad de D1g se encontró en la región del norte de la Patagonia.

Para las muestras actuales de Argentina, sin tener en cuenta el resto de las utilizadas en la comparación y construcción de redes haplotípicas, se obtuvo una mayor proporción de individuos portadores de linajes de D1. Esto apoyaría lo planteado hasta el momento de una mayor diversidad y proporción de linajes maternos de este haplogrupo en Argentina con una gran profundidad temporal.

Según los resultados de las redes de haplotipos se observó que 14 de los mismos, presentes en las muestras prehispánicas del actual territorio argentino, también estuvieron presentes en muestras actuales de la misma región y de otras cercanas geográficamente (Tabla 35). Nuevamente se observó una mayor diversidad de linajes de D1 compartidos entre las muestras antiguas y actuales, y sobre todo entre las del norte y sur de nuestro país. Para el resto de los haplogrupos amerindios, a partir de la escasa variabilidad de haplotipos observada para el total de las muestras analizadas, y viendo que los únicos compartidos entre ellas son linajes nodales de los haplogrupos, no puede estimarse si los individuos están relacionados entre sí o si provienen de una población ancestral en común, sobre todo teniendo en cuenta que en todo Sudamérica existe una gran distribución de los linajes amerindios fundadores. No se encontró en ninguna de las muestras prehispánicas analizadas el linaje D4h3.

Tabla 35. Haplotipos compartidos entre muestras antiguas y actuales de Argentina

Haplotipo	Sitios polimórficos	Muestras precolombinas	Muestras modernas
A2	16111T- 16223T- 16290T- 16319A- 16362C	Quebrada de Humahuaca centro y sur, Valle Calchaquí, Pampa Grande	Mbyá-Guaraní (Formosa), Puna (Jujuy), Guaraníes y Kaingang (Brasil), Atacameños (Chile), Aymara y Quechuas (Bolivia)
A2	16111T- 16223T- 16266T- 16290T- 16319A- 16362C	Quebrada de Humahuaca sur	Mbyá-Guaraní (Formosa), Guaraníes (Brasil)
A2	16223T- 16290T- 16319A- 16362C	Puna Jujeña	Puna (Jujuy), Coyas, Mapuches
B2	16182C- 16183C- 16189C- 16217C	Quebrada de Humahuaca centro y sur, Pampa Grande	Mapuches, Mbyá-Guaraní (Formosa), Puna (Jujuy), Coyas, Atacameños (Chile), Aymará y Quechuas (Bolivia)
B2	16183C- 16188T- 16189C- 16217C	Quebrada de Humahuaca sur	Puna (Jujuy), Coyas, Atacameños (Chile), Aymará y Quechuas (Bolivia)
B2	16183C- 16189C- 16217C- 16289G	Puna Jujeña	Coyas, Aymará y Quechuas (Bolivia)
C1	16189C- 16223T- 16298C- 16325C- 16327T	Puna Jujeña	Mbyá-Guaraní (Formosa), Mapuches
D1	16223T- 16325C- 16362C	Fuego-Patagónicos, Quebrada de Humahuaca centro y sur, Pampa Grande, Patagonia centro-oeste	Mbyá-Guaraní (Formosa), Sierras centrales, Guaraníes (Brasil), Aymará y Quechuas (Bolivia), Atacameños (Chile)
D1	16223T- 16362C	Costa Atlántica Patagónica	Sierras Centrales
D1	16129A- 16223T- 16325C- 16362C	Pampa Grande	Sierras Centrales
D1g @ 16362	16187T- 16223T- 16325C	Paso Alsina 1	Mapuches
D1g	16187T- 16223T- 16325C- 16362C	Patagonia centro-oeste, Paso Alsina 1	Chiloé (Chile), Mapuches, Tehuelches, Sierras Centrales
D1g5 @ 16362	16187T- 16189C- 16209C- 16223T- 16325C	Fuego-Patagónicos	Mapuches
D1g5	16187T- 16189C- 16209C- 16223T- 16325C - 16362C	Fuego-Patagónicos, Rada Tilly	Chiloé (Chile), Tehuelches, Sierras Centrales

Los linajes de D1 están presentes en 21 muestras poblacionales desde el Sur de Perú, Bolivia, Sur de Brasil, hasta Tierra del Fuego y parecería ser el que se dispersó más rápidamente durante el Holoceno Tardío ya que en comparación con los otros 3 Hgs, está presente en 12 muestras prehispánicas, mientras que el resto está presente como máximo en 9. Esto puede deberse a que los grupos portadores de linajes de D1, sobre todo D1g, eran muy dinámicos socialmente y posiblemente poseyeran sistemas de intercambio de información y bienes con otros grupos ubicados a grandes distancias, siendo proclive la formación de grupos culturales mezclados con un cierto grado de flujo génico entre ellos. Esto posiblemente no puede inferirse a partir de estudios genéticos en muestras poblacionales actuales, determinando el gran valor que poseen los resultados de ADN_a por más que sean escasos, ya que aportan el eje temporal a los mismos y no generan una instantánea de un momento dado en la dispersión de linajes maternos. Sin embargo, ambos tipos de investigación junto estudios de disciplinas como la arqueología, y la historia deben llevarse a cabo para interpretar la compleja red de las movilidades e intercambios entre grupos de individuos que fueron poblando nuestro territorio.

Puede concluirse entonces que la dispersión de los linajes de D1 es un dato relevante para la comprensión de la historia evolutiva de los pobladores del Holoceno Tardío del sur de Sudamérica. La filogeografía contempla que a mayor diversidad de un linaje, mayor antigüedad del mismo en la región. Si bien un linaje no es equivalente a una población, puede considerarse la frecuencia y distribución del mismo como indicio de una determinada historia poblacional (Motti, 2012).

Otra hipótesis que asume la filogeografía es que el lugar donde actualmente se observa mayor variabilidad de un linaje, es el lugar de origen del mismo. Entonces a partir de la mayor diversidad de linajes D1g observados en las muestras analizadas de la región sur de Argentina, sumado a las coordenadas geográficas obtenidas para el análisis de Procrustes, y la observación de que la mayoría de los haplotipos D1g derivan de aquellos presentados en las muestras demuestras de esa región, podría proponerse un posible lugar de incubación de

estos linajes y una re expansión hacia el norte y el sur desde la región norpatagónica. Esta proposición concuerda con el modelo de poblamiento para la parte sur de Sudamérica Propuesta por Bodner *et al.*, (2012). Para Sudamérica se ha propuesto la presencia de dos clados particulares importantes derivados del linaje D1 (D1g y D1j) tal como se evidenció en la red de haplotipos, los cuales serían fundantes como indican su tiempos de coalescencia y su distribución casi exclusivamente pacífica (Bodner *et al.* 2012). En dicho modelo, la dispersión de estos linajes habría sido primero por el corredor costero, para ingresar luego al sur del continente mediante migraciones transcordilleranas que posteriormente involucraron flujo génico bidireccional. El flujo migratorio, por ende, pudo haber sido en la región norpatagónica de oeste a este más que en sentido norte a sur. Además de Saint Pierre *et al.* (2012) propusieron que las poblaciones habrían quedado aisladas con un débil intercambio genético con poblaciones localizadas más al norte, por lo menos hasta la llegada de los europeos. Sin embargo, el registro arqueológico demostró amplios radios de movilidad logística (Miotti y Salemme, 2003; Miotti; 2003) avalados por las diferentes evidencias arqueológicas de contacto entre sectores costeros e interiores (Gómez Otero *et al.*, 1998; Orquera y Gómez Otero, 2007), por lo que es difícil sostener que muchos de estos grupos se mantuvieran completamente aislados el tiempo suficiente como para generar una diferenciación biológica de magnitud. Hacia el Holoceno Tardío, que es cuando el registro arqueológico demuestra indicios de crecimiento poblacional, comienzan a registrarse contactos entre muchos sectores patagónicos y con regiones más al norte (Martinez *et al.*, 2008-2009).

Desde una perspectiva bioantropológica, para Sudamérica aún no hay un consenso acerca del modo de poblamiento. Pueden haber sucedido dos posibles escenarios: El grupo que se expandió desde el norte sólo pudo haber progresado en el lado costero de los Andes posiblemente mediante el uso de canoas y luego haber cruzado la Cordillera en diferentes latitudes (Bodner *et al.*, 2012), tal como se propone a través de los resultados obtenidos. La otra alternativa propone que se pudo haber dado una separación de la población en el norte de Sudamérica, resultando en dos grupos poblacionales separados, uno costero y el otro

continental (Rothhammer y Dillehay, 2009). Esta última no puede ser probada a partir de los resultados obtenidos ya que las muestras analizadas parecerían estar relacionadas a muestras del oeste de la Cordillera. Por lo tanto a futuro es necesario incorporar muestras prehispánicas de diferentes temporalidades de regiones más hacia el este como la región de Chaco que permitan contrastar esa propuesta de poblamiento.

Según las redes de haplotipos obtenidas la mayoría de los linajes presentes en las poblaciones del Holoceno Tardío no estaban compartidos con las muestras actuales, por lo que se infiere que podría haber existido una mayor variabilidad genética dentro de las poblaciones que habitaron el actual territorio argentino, que la estimada a partir de estudios sobre los linajes maternos de poblaciones actuales. Esto podría deberse a la acción de mecanismos microevolutivos, como el flujo génico producido por el movimiento de gente en la actualidad entre países limítrofes y de distancias mayores tratándose de grupos de diferentes orígenes, como se evidencia en el estudio de Moraga *et al.* (2005), cuando se analizaron grupos que habitaron entre el 6.000 y el 500 A.P. los valles del norte de Chile, comparándolos con las poblaciones actuales. Como se menciono anteriormente, mediante inferencias en las historia poblacional de una región realizadas a partir de la variabilidad observada en muestras modernas, se estaría perdiendo información relevante sobre los complejo escenarios de relaciones entre las poblaciones del pasado (Reich *et al.* 2012).

Diferentes estudios han analizado la diversidad genética y los niveles de heterocigosidad a través de microsatelites (ADN nuclear) y marcadores uniparentales de las poblaciones nativas americanas detectando una reducción de la misma en sentido Norte-Sur en todo el continente (Wang *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2010). El mecanismo que habría primado para explicar este patrón es el “efecto fundador serial”, en donde la diversidad genética comienza a disminuir a partir del distanciamiento del lugar de origen de la o las poblaciones analizadas (Ramachandran *et al.*, 2005; Lewis Jr *et al.*, 2010). Sin embargo, esto solo es cierto para el caso de los linajes de A2 y B2, donde sus frecuencias se reducen

hasta desaparecer en algunas regiones del sur del Cono Sur y para algunas muestras precolombinas. En las muestras actuales de Mapuches y Tehuelches de Argentina y Chile (Ghinter *et al.*, 1993; Moraga *et al.*, 2010, de Saint Pierre *et al.*, 2012; Sala y Corach, 2014) se han descrito linajes de ambos haplogrupos por secuenciación del ADNmt. Estas diferencias podrían estar dadas por movimiento de personas desde regiones más al norte de la zona cordillerana en tiempos de contacto hispánico, como por ejemplo, durante el proceso de araucanización (Casamiquela, 1990).

La gran diversidad de linajes amerindios observada para nuestro territorio, mayor a la observada para algunas muestras del sur de Perú, indicaría completamente lo opuesto a esos estudios, sobre todo como fue planteó para el D1g, abriendo un nuevo panorama para continuar con estudios en genética de poblaciones con aportes desde otras disciplinas que se acoplen para el entendimiento de la intrincada historia del poblamiento de Sudamérica, especialmente de la Argentina.

Capítulo 8: Conclusiones

El material para muestreo en este tipo de investigaciones es valioso, raro y novedoso, lo cual lleva a que el número de muestras sea pequeño, con distribuciones geográficas y temporalidades irregulares. Además el trabajo con ADN presenta algunas limitaciones, con lo que la obtención de algún resultado posee aún más valor que la muestra en sí. Algunas de las limitaciones que presenta incluyen el bajo número de intentos exitosos al detectar ADN y la necesidad del uso continuo de criterios rigurosos para la autenticación de dichos resultados.

Los datos obtenidos para el ADN constituyen la investigación directa de eventos y procesos genéticos que tuvieron lugar en la prehistoria, aportando profundidad temporal a los análisis de la historia evolutiva de la humanidad. Sin embargo, la utilización de la información arqueológica y su contexto, el cuál puede ser crucial a la hora de realizar y poner a prueba hipótesis es indispensable, y las investigaciones en arqueogenética deben ser cuidadosamente planeadas abarcando una estrecha colaboración entre arqueólogos, antropólogos y genetistas.

En esta tesis se demostró la presencia de un alto porcentaje de linajes nativos en la región de la Puna Jujeña, la zona de transición entre pampa y Patagonia y varios sectores del sur del actual territorio argentino, determinando la gran proporción del linaje D1g y su distribución. En las muestras analizadas, todas correspondientes al Holoceno Tardío, además del D1g, se describieron otros de los linajes propuestos como fundadores para Sudamérica.

Si bien se realizaron análisis para la identificación de linajes particulares al interior de cada región, logrando este objetivo, no pudo establecerse una estructuración poblacional válida, posiblemente por el número de muestras analizadas y para la gran porción geográfica en estudio. Esto evidencia la complejidad en los procesos de poblamiento del actual territorio argentino, y la posible variabilidad genética que poseían los primeros pobladores. La comparación con muestras del Holoceno Tardío y muestras actuales de diversas regiones, fue posible determinar la presencia de linajes que posiblemente tuvieron

una evolución local en cada región analizada. Sin embargo, para corroborar esta información es necesario ampliar los estudios de ADN.

El uso de datos de secuencia de HVR I del ADNmt, si bien es un solo marcador utilizado para genética de poblaciones, y no está completo, - en el orden de que puede utilizarse HVR II y la región control-, permite distinguir entre linajes maternos específicos, así como generar modelos demográficos utilizando material antiguo. Con el advenimiento de nuevas metodologías que permitan obtener mayor y mejor calidad de secuencias de ADN y mejores estrategias de muestreo, sumada a una cooperación interdisciplinaria, se llegará a un mejor entendimiento y abordaje del poblamiento del continente y del territorio de nuestro país, así como los hechos sucesivos de su historia poblacional. En lo que concierne a la parte genética y molecular de los estudios de antropología biológica es requisito que se incremente el tamaño de las muestras antiguas, que se amplíe su cobertura espacial y temporal, y que se incremente la resolución de los datos por medio del análisis no solo de linajes mitocondriales, sino de genoma completo mitocondrial y en el caso que sea posible nuclear, como el caso del marcador molecular SRY para la determinación de linajes paternos.

Capítulo 9: Bibliografía

- **Achilli** A., Perego U., Bravi C., Coble M., Kong Q., Woodward S., Salas A., Torroni A., Bandelt, H. *The phylogeny of the four pan-american mtDNA haplogroups: implications for evolutionary disease studies*. Plos One, 3: e1764 (2008).
- **Achilli** A. Perego U., Lancioni H., Oliveri A., Gandini F., Anger Hofer N., Rogers M., Herrera R., Woodward S., Labuda D., Glenn Smith D., Cybulski J., Semino O., Malhi R., Torroni A. *Reconciling migration models to the Americas with the variation of North American native mitogenomes*. Proceeding of the National Academy of Science, 110: 14308-15313 (2013).
- **Adachi** N, Umetsu K, Takigawa W, Sakaue K. *Phylogenetic analysis of the human ancient mitochondrial DNA*. J Archaeol Sci 31:1339–1348 (2004).
- **Adovasio** J.M. y Pedler D.R. *Monte Verde and the antiquity of humankind in the Americas*. Antiquity 71, 573-580 (1997).
- **Albeck** M.E. y Ruiz M.S. *El Tardío en la Puna de Jujuy: Poblados, Etnias y Territorios*. Cuadernos FHyCS-UNJu 20: 199-221 (2003).
- **Albeck** M.E. *El Intermedio Tardío: Interacciones económicas y políticas de la Puna de Jujuy*. En: Sociedades Precolombinas Surandinas: Temporalidad, Interacción y Dinámica Cultural del NOA en el ámbito de los Andes Centro-Sur. Williams V., Ventura B., Callegari A., Yacobaccio H. editores, Buenos Aires, pp: 125-145 (2007).
- **Alberts** B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter. *Biología Molecular de La Célula*. Cuarta edición. ISBN 84-282-1351-8. Ediciones Omega S.A., Barcelo España (2004).
- **Alfaro** L.C. *Investigación arqueológica en la Cuenca del Río Doncellas (Provincia de Jujuy). Integración de la Puna Jujeña a los centro cúlticos andinos*. Relaciones de la Sociedad Argentina de Antropología XV (s):25-47 (1983).
- **Alfaro**, L. *Investigación en la Cuenca del Río Doncellas. Dpto. de Cochinoca Pcia. de Jujuy. Reconstrucción de una Cultura olvidada en la Puna Jujeña*.

Departamento de Antropología y Folklore. Pcia. de Jujuy. (1988)

- **Álvarez-Iglesias V.**, Jaime J., Carracedo A., Salas A. *Coding region mitochondrial DNA SNP's: Targeting East Asian and Native American haplogroups*. Forensic Science International: Genetics, 1: 44-55 (2007).
- **Alves-Silva J.**, da Silva Santos M., Guimaraes P., Ferreira A., Bandelt H., Pena S., Ferreira Prado V. *The ancestry of brazilian mtDNA lineages*. American Journal of Human Genetic, 67: 444-461 (2000).
- **Anderson D.G.** y Gillam J.C. *Paleoindian Colonization of thr Americas: Implications from an Examination of Physiography, Demography, and Artifact Distribution*. Jstor, American Antiquity 65 (1), 43-66 (2000).
- **Anderson S**, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J y Eperon IC, Nierlich DP, Roe RA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJH, Staden R, Young IG. *Sequence and organization of the human mitochondrial genome*. Nature 290:457-65 (1981).
- **Andersson S. G. E.**, A. Zomorodipour, J. O. Andersson, T. Sicheritz-Pontén, U. C. M. Alsmark, R. M. Podowski, A. K. Näslund, A-S. Eriksson, H. H. Winkler, C. G. kurland. *The Genome sequence of Rickettsia prowazekii and the origin of mitochondria*. Nature vol. 396, pp.133- 143 (1998).
- **Andrews RM**, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. *Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA*. Nature Genet 23:147(1999).
- **Ankel-Simons F** y Cummins JM. *Misconceptions about mitochondria and mammalian fertilization: implications for theories on human evolution*. Proc Natl Acad Sci USA 93:13859-63 (1996).
- **Álvarez-Iglesias V.**, Jaime J., Carracedo A., Salas A. *Coding region mitochondrial DNA SNP's: Targeting East Asian and Native American haplogroups*. Forensic Science International: Genetics, 1: 44-55 (2007).

- **Avena** S.A., Goicoechea AS, Dugoujon JM, Rey J, Dejean CB, Carnese FR. *Mezcla génica en la Región Metropolitana de Buenos Aires*. Medicina 66:113-118. (2006).
- **Avena** S.A., Goicoechea AS, Bartomioli M, Fernández V, Cabrera A, Dugoujon JM, Dejean CB, Fabrykant G, Carnese FR. *Mestizaje en el sur de la región pampeana (Argentina). Su estimación mediante el análisis de marcadores proteicos y moleculares uniparentales*. Revista Argentina de Antropología Biológica 9(2):59-76 (2007).
- **Avena** S.A., Parolin ML, Dejean CB, Ríos Part MC, Fabrikant G, Goicoechea AS, Dugoujon JM, Carnese FR. *Mezcla génica y linajes uniparentales en Comodoro Rivadavia Prov. de Chubut, Argentina*. Revista Argentina de Antropología Biológica. 11(1):25-42 (2009).
- **Avena** S.A., Parolina ML, Boquet M, Dejean CB, Postillone MB, Alvarez Trentini Y, Di Fabio Rocca F, Mansilla F, Jones L, Dugoujon JM, Carnese FR. *Mezcla génica y linajes uniparentales en Esquel (Pcia. Chubut). Su comparación con otras muestras poblacionales argentinas*. Journal of Basic and Applied Genetics 21 (1): 1-14 (2010).
- **Avena** S.A., Fejerman L, Via M, Dejean CB, Beckman KB, Pérez-Stable E, Gonzalez Burchard E, Ziv E, Parolin ML, Acreche N, Boquet M, Rios Part MC, Fernández V, Rey J, Carnese FR. *Ancestría, mezcla génica y estructuración poblacional en muestras cosmopolitas de Argentina*. Simposio de Genética de Poblaciones Neoamericanas. XI Congreso de la Asociación Latinoamericana de Antropología Biológica. Bogotá (2010).
- **Awadella** P, Eyre-Walker A, Maynard Smith J. *Linkage disequilibrium and recombination in hominid mitochondrial DNA*. Science 286, 2524-25 (1999).
- **Baca** M., Doan K., Sobczyk M., Stankovic A., Weglenski P. *Ancient DNA reveals kinship burial patterns of a pre-Columbian Andean community*. BMC Genetics 13: 30 (2012).
- **Baca** M., Molak M., Sobczyk M., Weglenski P., Stankovic A. *Locals, Resettlers,*

- and Pilgrims: A Genetic Portrait of Three Pre-Columbian Andean Populations. American Journal of Physical Anthropology (2014).*
- **Bandelt H.**, Herrnstadt C., Yao Y., Kong Q., Kivisild T., Rengo C., Scozzari R., Richards M., Villems R., Macaulay V., Howell N., Torroni A., Zhang Y. *Identification of Native American founder mtDNAs through the analysis of complete mtDNA sequences: some caveats. Annals of Human Genetics, 67: 512-524 (2003).*
 - **Bandelt H-j**, Kong Q-P, Parson W, Salas A. *More evidence for non-maternal inheritance of mitochondrial DNA? J Med genet 42, 957-960 (2005).*
 - **Barberena R.**, Prates L., De Porras M. *The human occupation of North Western Patagonia (Argentina): paleoecological and chronological trends. Quaternary International, 356: 111-126 (2015).*
 - **Barbieri C.**, Heggarty P., Castri L., Luiselli D., Petterner D. *Mitochondrial DNA variability in the Titicaca basin: matches and mismatches with linguistics and ethnohistory. American Journal of Human Biology, 23: 89-99 (2011).*
 - **Barta J.**, Monroe C., Teisberg J., Winters M., Flanigan K., Kemp B. *One of the key characteristics of ancient DNA, low copy number, may be product of its extraction. Journal of Archaeological Science, 46: 281-289 (2014).*
 - **Beguelin M.** *Tamaño corporal y temperatura ambiental en poblaciones cazadoras-recolectoras del Holoceno Tardío de Pampa y Patagonia. Revista Argentina de Antropología Biológica, 12: 27-36 (2010).*
 - **Bernal V.** *Procesos de diferenciación biológica entre poblaciones humanas del Holoceno tardío de Patagonia. Una aproximación desde la variación morfométrica dental. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de La Plata, La Plata (2008).*
 - **Bernal V.** y Aguerre A.M. *Investigaciones Bioarqueológicas en Río Mayo, Aleros Mazquiarán y Manantiales 2 (SO de la Provincia de Chubut). Capítulo 4 En: Imágenes desde un alero: investigaciones multidiciplinarias en Río Mayo, Chubut Patagonia argentina. Pérez de Micou C., Trivi de Mandri M., Burry L.S.*

- editoras. Buenos Aires pp:43-60 (2009).
- **Bernal V.**, Perez S.I., Gonzalez P.N., Sardi M.L., Pucciarelli H.M. *Spatial Patterns and Evolution Processes in Southern South America: A Study of Dental Morphometric Variation*. American Journal of Physical Anthropology 142, 95-104 (2010).
 - **Bisso-Machado R.**, Bortolonia MC., Salzano FM. *Uniparental genetic markers in South Amerindians*. Genetics and Molecular Biology 35 (2): 365-387 (2012).
 - **Bodner M.**, Perego U.A., Huber G., Fendt L., Röck A.W., Zimmermann B., Olivieri A., Gómez-Carballa A., Lancioni H., Angerhofer N., Bobillo M.C., Corach D., Woodward S.R., Salas A., Achilli A., Torroni A., Bandelt H.J., Parson W. *Rapid coastal spread of First Americans: Novel insights from South America's Southern Cone mitochondrial Genomes*. Genome Research, 1-10 (2012).
 - **Bolnick D.**, Bonine H., Mata-Miguez J., Kemp B., Snow M., LeBlanc S. *Nondestructive sampling of human skeletal remains yields ancient nuclear and mitochondrial DNA*. American Journal of Physical Anthropology, 147: 293-300 (2012).
 - **Bonato S.L.** y Salzano F.M. *A single and early migration for the peopling of the Americas supported by mitochondrial DNA sequence data*. The National Academy of Science of the USA 94, 1866—1871 (1997).
 - **Borrero L.A.** *Early Occupations in the Southern Cone*. Capítulo 4, Handbook of South America Archaeology, editado por Silverman H. y Isbell W.H., Springer, Nueva York (2008).
 - **Bradley B.** y Stanford D. *The North Atlantic ice-edge corridor: a possible Palaeolithic route to the New World*. World Archaeology 36 (4), 459-478 (2004).
 - **Brigham-Grette J.**, Anderson P.M., Lozhkin A.V. y Glushkova O.Y. *Paleoenvironmental Conditions in Western Beringia before and during the Last Glacial Maximum*. In *Entering America Northeast Asia and The Beringia Before the Last Glacial Maximum*, editors: Madsen D.B. The University of Utah Press,

- 1-57 (2004).
- **Brown** WM. *Polymorphism in mitochondrial DNA of humans as revealed by restriction endonuclease analysis*. Proc Natl Acad Sci USA 77:3605-9 (1980).
 - **Cardoso** S., Palencia-Madrid L., Valverde L., Alfonso-Sánchez M., Gómez-Pérez L., Alfaro E., Bravi C., Dipierri J., Peña J., de Pancorbo M. *Mitochondrial DNA control region data reveal high prevalence of Native American lineages in Jujuy Province, NW Argentina*. Forensic Science International: Genetics, 7: e52-e55 (2013).
 - **Cardozo** D., Crespo C., Russo G., Postillones MB. *Análisis y conservación de ADN antiguo en restos esqueléticos humanos de sitios arqueológicos y colecciones de museos de Argentina*. In: Esnal, A. Funes, M. Grosso, M. Kuperszmit, N. Murgó, A. y Romero, G. (Comp). Entre Pasados y Presentes IV. Estudios Contemporáneos en Ciencias Antropológicas. C.A.B.A. ISBN: 978-987-25575-3-9. Pp: 313-330 (2014).
 - **Carnese** F. Mendisco, F. Keyser, C. Dejean, B. Dugounjon, J. Bravi, C. Ludes, B. y Crubezy, E. *Paleogenetical study of pre-columbian samples from Pampa Grande (Salta, Argentina)*. American Journal of Physical Anthropology, 141:452-462 (2010).
 - **Casas** M.J. *El estudio de ADN humano de época almohade y actual revela la influencia migratoria norteafricana en Priego de Córdoba*. Antiquitas N° 17 pp. 139-141 (2005).
 - **Casas-Vargas** A., Gómez A., Briceño I., Diaz-Matallana M., Bernal J., Rodríguez J. *High genetic diversity on a sample of pre-columbian bone remains from Guane territories in Northwestern Colombia*. American Journal of Physical Anthropology, 146: 637-649 (2011).
 - **Case** JT y Wallace DC. *Maternal inheritance of mitochondrial DNA polymorphisms in cultured human fibroblasts*. Somatic Cell Genet 7:103-8 (1981).
 - **Castro** A., Moreno J.E., Andolfo M., Gimenez R., Peña C., Mazzitelli L.,

- Ambrústolo P. *Análisis distribucionales en la costa de Santa Cruz (Patagonia Argentina): Alcances y Resultados*.MAGALLANIA 31: 69-94 (2003).
- **Cavalli-Sforza** L.L., Menozzi P., y Piazza A. *The History and Geography of Human Genes*. Princeton University Press (1994).
 - **Chatters** J.C. *The Recovery and First Analysis of an Early Holocene Skeleton from Kennewick, Washington*. American Antiquity 65 (2), 291-316 (2000).
 - **Chen** X, Prosser R, Simonetti S, Sadlock J, Jagiello G, Schon EA. "Rearranged mitochondrial genomes are present in human oocytes" Am J Hum Genet 57:239-47 (1995).
 - **Crespo** C.M., Dejean C.B., Postillone M.B., Lanata J.L., Carnese R.F., *Historias en código genético. Los aportes de los estudios de ADN antiguo en Antropología y sus implicancias éticas*.Runa XXXI (2) (2010).
 - **Damgaard** P.B., Margaryan A., Schroeder H., Orlando L., Willerslev E. Allentoft M.E. *Improving access to endogenous DNA in ancient bones and teeth*. Scientific Reports, Nature 5:11184 (2015).
 - **De Azevedo** S., Nocera A., Paschetta C., Castillo L., González M., González-José R. *Evaluating microevolutionary Models for the Early Settlement of the New World: The Importance of Recurrent Gene Flow with Asia*. American Journal of Physical Anthropology 146, 539-552 (2011).
 - **De Necochea** **Campion** R., Canul Tec JC. *Métodos Físicoquímicos en Biotecnología:Secuencias de Ácidos Nucleicos*. Cuernav, Mor. (2004).
 - **de Saint Pierre** M., Bravi C.M., Motti J.M.B., Fuku N., Tanaka M., Llop E., Bonatto S.L., Moraga M. *An Alternative Model for the Early Peopling of Southern South America Revealed by Analyses of Three Mitochondrial DNA Haplogroups*. Plos One 7 (9), 1-12 (2012).
 - **De Luca** SZ y O'Farrell PH. *Barriers to Male Transmission of Mitochondrial DNA in Sperm Development*.Developmental Cell 22, 660-668 (2012).
 - **Dejean** C., Keyser-Tracqui C., Crubezy E., Blandin P., Luna L., Aranda C.,

- Acuto F., Dugoujon J., Ludes B., Carnese F. *Análisis paleogenético de tres individuos provenientes del sitio Cartaderas Derecha, Salta 185 (Argentina)*. Trabajo presentado en el IX Congreso de la Asociación Latinoamericana de Antropología Biológica, Ouro Preto, Brasil (2006).
- **Dejean C.**, Keyser C., Avena A., Dugoujon F., Ludes B., Crubezy E., Carnese F. *Análisis genético de muestras esqueléticas provenientes del Canal de Beagle*. Trabajo presentado en el X Congreso de la Asociación Latinoamericana de Antropología Biológica, La Plata, Argentina (2008).
 - **Dejean C.B.**, Seldes V., Russo M.G., Mendisco F., keyser C., Ludes B. Carnese F.R. *Variabilidad Genética Mitocondrial: comparación de muestras de dos sitios arqueológicos del Noroeste Argentino*. Revista Argentina de Antropología Biológica 16 (1), 5-16 (2014).
 - **Demarchi D.** Panzetta-Dutari, G. Colantonio, S. y Marcelino, A. *Absence of the 9-bp deletion of mitochondrial DNA in pre-historic inhabitants of Argentina*. Human Biology 73:575-582 (2001).
 - **Dillehay T.D.** *Monte Verde: A Late Pleistocene Settlement in Chile*. Vol. 2: The Archaeological Context and Interpretation. Washington, Smithsonian Institute Press (1997).
 - **Dillehay T.D.** *The Settlement of the Americas. A New Prehistory*. Nueva York, Basic Books (2000).
 - **Dixon E.J.** *Human Colonization of the Americas: timing, technology and process*. Quaternary Science Reviews 20, 277-299 (2001).
 - **Donoghue H.D.**, Marcsik A., Matherson C., Veron K., Nuorala E., Molto J.E., Greenblatt C.L., Spigelman M. *Co-infection of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium leprae in human archaeological samples: a possible explanation for historical decline of leprosy*. Proc. Biol. Sci. 272 (1561): 389-394 (2005).
 - **Drancourt M.**, Aboudharam G., Signoli M., Dutour O., Raoult D. *Detection of 400-year-old Yersinia pestis DNA in human dental pulp: An approach to the*

- diagnostic of ancient septicemia*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 12637-12640 (1998).
- **Excoffier L.** *ARLEQUIN 3.01. An Integrated Software Package for Population Genetics* (1995-2006).
 - **Fagundes N.J.R.**, Kanitz R., Eckert R., Valls ACS., Bogo MR., Salzano FM., Glenn Smith D., Silva Jr. WA., Zago MA., Ribeiro-dos-Santos AK., Santos SEB., Petz-Erler ML., Bonatto SL. *Mitochondrial population genomics supports a single pre-Clovis origin with a coastal route for the peopling of the Americas*. Journal of Human Genetics 82: 583-592 (2008).
 - **Favier Dubois C.**, Stern C., Cardillo M. *Caracterización de la distribución y tipos de obsidiana presentes en la costa rionegrina, Argentina*. En: Salemme M, Santiago F, Alvarez M, Piana E, Vázquez M, Mansur ME, editores. *Arqueología de Patagonia: una mirada desde el último confín*. Ushuaia: Editorial Utopías , Pp: 349-360 (2009).
 - **Favier Dubois C.** *Hacia una cronología del uso del espacio en la costa Norte del Golfo de San Matías (Río Negro, Argentina: sesgos geológicos e indicadores temporales*. En: Zangrando, A. Barberena, R. Gil, A. Neme, C. Giardina, M. Luna, L. Otaola, C. Paulides, S. Salgan, C. y Tívoli, A. *Tendencias Teórico-Metodológicas y casos de estudio en la Arqueología de la Patagonia*. 1ra Ed. San Rafael: Museo de Historia Natural de San Rafael (2013).
 - **Fehren-Schmitz L.** Reindel, M. Cacigao, E. Hummel, S. y Herrmann, B. *Pre-columbian population dynamics in coastal Southern Peru: a diachronic investigation of mtDNA patterns in the Palpa region by ancient DNA analysis*. American Journal of Physical Anthropology, 141:208-221 (2010).
 - **Fehren-Schmitz L.**, Llamas B., Tomasto E. Haak W. *El ADN antiguo y La Historia del Poblamiento Temprano del Oeste de Sudamérica: lo que Hemos Aprendido y Hacia Dónde Vamos*. Boletín de Arqueología PUCP nº 15, 17-41 (2011).
 - **Fehren-Schmitz L.**, Haak W, Mächtel B, Masch F, Llamas B, Tomasto Cagigao E, Sossna V, Schitteck K, Isla Cuadrado J, Eitel B, Reindel M. *Climate*

- change underlies global demographic, genetic and cultural transitions in pre-Columbian southern Peru.* PNAS Direct Submission (2014).
- **Fernández Domínguez E.**, Arroyo-Pardo E., Turbón D. *Aplicacions de l' ADN antic en arqueologia. La nova <<arqueologia molecular>>.* >Cota Zero 20:123-128 (2005).
 - **Flensburg G.**, Martínez G., Bayala P.D. *Mortality Profiles of Hunter-Gatherer Societies: A Case Study from the Eastern Pampa-Patagonia Transition (Argentina) During the Final Late Holocene.* International Journal of Osteoarchaeology (2013).
 - **Foster P.**, Harding R., Torroni A., y Bandelt H-J. *Origin and Evolution of Native American mtDNA Variation: a Reappraisal.* American Journal of Human genetics 59, 935-945 (1996).
 - **Fuchs M.L.** y Varela H. *Fechados Radiocarbónicos de colecciones osteológicas de la Puna de Jujuy, Argentina.* Relaciones de la Sociedad Argentina de Antropología XXXVIII (2): 553-558 (2013).
 - **Gabriel MN**, Huffine EF, Ryan JH, Holland MM, Parsons TJ. *Improved mtDNA sequence analysis of forensic remains using "mini-primer set" amplification strategy.* J Forensic Sci 46:247–253 (2001).
 - **Gaitán J.** y López C. *Análisis de gradiente edáfico en la región andinopatagónica.* Ciencias del Suelo, 25: 53- 63 (2007).
 - **García F.**, Moraga M., Vera S., Henríquez H., Llop E., Aspillaga E., Rothhammer F. *mtDNA microevolution in Southern Chile's archipelagos.* American Journal of Physical Anthropology, 129: 473-481 (2006).
 - **García A.**, Demarchi D. *Incidence and distribution of Native American mtDNA haplogroups in central Argentina.* Human Biology 1: 59-69 (2009).
 - **García A.**, Pauro M., Bravi C., Demarchi D. *Phylogeography of mitochondrial haplogroup D1: an early spread of subhaplogroup D1j from Central Argentina.* American Journal of Physical Anthropology, 149: 583-590 (2012).

- **García-Bour** J., Pérez-Pérez A., Álvarez S., Fernández E., López-Parra A., Arroyo-Pardo E., Turbón D. *Early population differentiation in extinc aborignes from Tierra del Fuego-Patagonia: ancient mtDNA sequence and Ychromosome STR characterization*. American Journal of Physical Anthropology, 123:361-370 (2004).
- **Gilbert** T., Hansen A., Willerslev E., Rudbeck L., Barnes R., Lynnerup N., Cooper A. *Characterization of genetic miscoding lesions caused by post-mortem damage*. American Journal of Human Genetics, 72: 48-61 (2003).
- **Gilbert** M.T., Cuccui J., White W., Lynnerup N., Titball RW., Cooper A., Prentice M.B. *Absence of Yersinia pestis-specific DNA in human teeth from five European excavations of putative plague victims*. Microbiology 150 (2): 341-354 (2004).
- **Giles** RE, Blanc H, Cann HM, Wallace DC. *Maternal inheritance of human mitochondrial DNA*. Proc Natl Acad Sci USA 77:6715-9 (1980).
- **Ginther** C., Corach D., Penacino GA, Rey JA., Carnese FR., Hutz MH., Anderson A., Just J., Salzano FM., King MC. *Genetic variation among Mapuche Indians from the Patagonia region of Argentina: Mitochondrial DNA sequence variation and allele frequencies of several nuclear genes*. En: Pena SDJ, Chakraborty R, Epplen JT, Jeffreys AJ (Eds) DNA fringerprinting: state of the science. Birkhauser Verlag, Basel. Pp. 211-219 (1993).
- **Goebel** T., Waters M.R., O'Rourke D.H. *The Late Pleistocene Dispersal of Modern Humans In the Americas*. Science 319, 1497. 1502 (2008).
- **Gómez-Otero** J., Lanata J., Prieto A. *Arqueología de la costa atlántica patagónica*. Revista de Arqueología Americana, 15: 107-185 (1998).
- **Gómez Otero** J. *Movilidad y contactos en la costa centro-norte de patagonia argentina en tiempos pre y posthispánicos*. En: Las fronteras hispanocriollas del mundo indígena latinoamericano en los siglos XVIII-XIX. Un estudio comparativo, Compilado por R. Mandrini y C. D. Paz, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires/Universidad Nacional Arqueología de

- la costa patagónica 80 del Comahue/Universidad Nacional del Sur, Artes Gráficas Limay, Neuquén, pp. 287-312 (2003).
- **Gonçalves** C., Parra F., Gonçalves-Dornellas H., Rodriguez-Carvalho C., Silvia H., Pena S. *Recovering mitochondrial DNA lineages of extinct amerindian nations in extant homopatric brazilian populations*. Investigative Genetics 1: 13 (2010).
 - **González-José** R., Bortolini M.C., Santos F.R. Y Bonatto S.L. *The Peopling of America: Craniofacial Shape Variation on a Continental Scale and its Interpretations From an Interdisciplinary View*. American Journal of Physical Anthropology 137, 175-187 (2008).
 - **Goñi** R.A. *Arqueología de momentos históricos fuera de los centros de conquista y colonización: un análisis de caso en el sur de la Patagonia*. En: *Desde el País de los Gigantes. Perspectivas Arqueológicas en Patagonia*, pp. 283-296. UNPA, Río Gallegos (2000).
 - **Gordón** F., Tessone A., Béguelin M., Arrigoni G., Guichón R. *Paleodietas humanas en la costa patagónica durante el Holoceno tardío. Nuevos datos para la costa centro-sur* Interacciones en Antropología pp:1-22 (2014).
 - **Gradín** C., Aschero CA., Aguerre A. *Investigaciones arqueológicas en la Cueva de Las Manos estancia Ato Río Pinturas (Provincia de Santa Cruz)*. Relaciones de la Sociedad Argentina de Antropología X (s): 201-250 (1976).
 - **Gradín** C., Aschero CA., Aguerre A. *Arqueología del área Río Pinturas (Provincia de Santa Cruz)*. Relaciones de la SAA XIII: 183-227 (1979).
 - **Gradín** C. y Aguerre A. *Noticias del Alero Alejandro: Un Nuevo Componente de la Cueva de Las Manos (Río Pinturas, Provincia de Santa Cruz)*. Relaciones de la Sociedad Argentina de Antropología XXIV: 343-347 (1999).
 - **Green** R.E., Krause J., Ptak SE., Briggs AW., Ronan MT., Simons JF., Du L., Egholm M., Rothberg JM., Paunovic M., Pääbo S. *Analysis of one million base pairs of Neanderthal DNA*. Nature 444: 330-336 (2006).
 - **Green** MR., Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 4º Edición

- (2012).
- **Greenberg** J.H., Turner II C.G., y Zegura S.L. *The Settlement of the Americas: A Comparison of the Linguistic, Dental, and Genetic Evidence (and Comments and Reply)*. *Current Anthropology* 27 (5), 477-497 (1986).
 - **Greenwood** A., Capelli C., Possnert G., Pääbo S. *Nuclear DNA sequences from late Pleistocene megafauna*. *Molecular Biology and Evolution* 16:1466-1473 (1999).
 - **Grier** C., Flanigan K., Winters M., Jordan L., Lukowski S., Kemp B. *Using ancient DNA identification and osteometric measures of archaeological pacific salmon vertebrae for reconstructing salmon fisheries and sites seasonality at Dionisio Point, British Columbia*. *Journal of Archaeological Science*, 40: 544-555 (2013).
 - **Hagelberg** E., Sykes B., Hedges R. *Ancient bone DNA amplified*. *Nature* 342: 485 (1989).
 - **Hagelberg** E., Kayser M, Nagy M, Roewer L, Zimdahl H, Krawczak M y otros. *Molecular genetic evidence for the human settlement of the Pacific: analysis of mitochondrial DNA, Y chromosome and HLA markers*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354:141-52 (1999).
 - **Hagelberg** E. *Recombination or mutation rate heterogeneity? Implications for Mitochondrial Eve*. *Trends Genet.* 19, 84-90 (2003).
 - **Hall** T. *BioEdit: Biological sequence alignment aditor for Win 95/98/NT/2k/XP/7*. Ibis Biosciences (2013).
 - **Hanni** C., Brousseau T., Laudet V., Stehelin D. *Isopropanol precipitation removes PCR inhibitors from ancient bone extracts*. *Nucleic Acids Research*, 5:881-882 (1995).
 - **Hayashi** JI, Yonekawa H, Gotoh O, Watanabe J, Tagashira Y. *Strictly maternal inheritance of rat mitochondrial DNA*. *Biochem Biophys Res Commun* 83:1032-8 (1978).

- **Higuchi** R., Bowman B., Freiberger M. et al. *DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family*. Nature 312, 282–284 (1984).
- **Hoffecker** J.F., Elias S.A., O'Rourke D.H. *Out of Beringia?* Science 343, 979-980 (2014).
- **Hofreiter** M., Serre D., Poinar H., Kuch M., Pääbo S. *Ancient DNA*. Nature, 2:353-359 (2001).
- **Horai** S., Kondo R., Muruyama K., Hayashi S., Koike H., Nakai, N. *Phylogenetic affiliation of ancient and contemporary humans inferred from mitochondrial DNA*. Philosophical Transaction of the Royal Society London Biology 333:409-417 (1991).
- **Höss** M., Pääbo S., Vereshchagin N. *Mammoth DNA sequences*. Nature, 370:333 (1994).
- **Howell** N, Smejkal CB, Mackey DA, Chinnery PF, Turnbull DM, Herrnstadt C. *The pedigree rate of sequence divergence in the human mitochondrial genome: There is a difference between phylogenetics and pedigree rate*. Am. J. Hum. Genet. 72, 659-70 (2003).
- **Hubbe** M., Neves W.A., y Harvati K. *Testing Evolutionary and Dispersion Scenarios for the Settlement of the New World*. PLoS One 5(6): e11105 (2010).
- **Hummel** S. *Ancient DNA typing. Methods, strategies and applications*. Springer-Verlag. Berlin Heidelber. New York (2003).
- **Hummel** S. *Ancient DNA*. En: Henke, W. y Tattersall, I. Handbook of Paleoanthropology. pp: 1-24. SpringerVerlag Berlin Heidelberg (2014).
- **Innan** H. y Nordborg M. *Recombination or Mutational Hot Spots in Human mtDNA?* Mol. Biol. Evol. 19 (7), 1122-1127 (2002).
- **Ivanov** PL, Wadhams MJ, Holland MM, Weedn VW, Parsons TJ. *Mitochondrial DNA sequence heteroplasmy in the Grand Duke of Russia Georgij Romanov establishes the authenticity of the remains of Tsar Nicholas*

- II. Nat Genet* 12: 417–420 (1996).
- **Izaguirre** N. y De La Rúa C. *Aportación de la biología molecular al estudio antropológico de las poblaciones humanas del pasado: análisis del ADN mitocondrial*. *Revista Española de Antropología Biológica* 21: 1-10 (2000).
 - **Jenkins** D., Davis L., Stafford Jr T., Campos P., Hockett B., Jones G., Cummings L., Yost C., Connolly T., Yohe II R., Gibbons S., Raghavan M., Rasmussen M., Pajmans J., Hofreiter M., Kemp B., Barta J., Monroe C., Gilbert M., Willerslev E. *Clovis age Western stemmed projectile points and human coprolites at the Paisley Caves*. *Science*, 337: 223-228 (2012).
 - **Johnson** M.J., Wallace D.C. Ferris S.D., Rattazzi M.C., Cavalli- Sforza L.L. *Radiation of human mitochondria DNA types analyzed by restriction endonuclease cleavage patterns*. *J.Molec. Evol.* 19:255–271 (1983).
 - **Kaestle** F.A, Smith D.G. *Ancient mitochondrial DNA evidence for prehistoric population movement: The Numic expansión*. *Am J Phys Anthropol* 115:1-12 (2001).
 - **Kalmár** T., Csanád ZB., Marcsik A., Raskó I. *A simple and efficient method for PCR amplifiable DNA extraction from ancient bones*. *Nucleic Acid Research* 28 (12): e67 (2000).
 - **Kemp** B.M., Malhi R.S., McDonough J., Bolnick D.A., Eshleman J.A., Rickards O., Martinez-Labarga C., Johnson J.R., Lorenz J.G., Dixon E.J., Fifield T., Heaton T.H., Worl R., y Smith D.G. *Genetic Analysis of Early Holocene Skeletal Remains From Alaska and its Implications for the Settlement of the Americas*. *American ournal of Physical Anthropology* 132, 605-621 (2007).
 - **Kemp** B., Tung T., Summar M. *The collapse of the Wari empire: mitochondrial DNA profiles from Wari and post-Wari populations in ancient Andes*. *American Journal of Physical Anthropology*, 140:80-91 (2009).
 - **Kemp** B., y Glenn-Smith D. *Ancient DNA methodology: thoughts from Brian M. Kemp and David Glenn Smith on “mitochondrial DNA of protohistoric remains of an Arikara population from South Dakota”*. *Human Biology*, 82: 227-238

(2010).

- **Kitchen** A., Miyamoto M.M., y Mulligan C.J. *A Three-Stage Colonization Model for the Peopling of the Americas*. PloS ONE 3(2), e1596 (2008).
- **Kivisild** T. y Villems R. *Questioning Evidence for Recombination in Human Mitochondrial DNA*. Science, Technical Commente 288, 1931a (2000).
- **Krings** M, Stone A, Schmitz RW, Krainitzki H, Stoneking M, Paabo S. *Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans*. Cell 90:19-30 (1997).
- **Klöss-Brandstätter** A. Pacher D. Schönherr S. Weissensteiner H. Binna, R. Specht, G y Kronenberg, F. *HaploGrep: a fast and reliable algorithm for automatic classification of mitochondrial DNA haplogroups*. Human Mutation, 32: 25-32 (2011).
- **Kumar** S. Bellis, C. Zlojutro, M. Melton, P. Blangero, J. y Curran, J. *Large scale mitochondrial sequencing in Mexican Americans suggests a reappraisal of Native American origins*. BMC Evolutionary Biology, 11: 293-312 (2011).
- **Lalueza** C., Perez-Perez A., Prats E., Cornudella L., Turbón D. *Lack of founding amerindian mitochondrial DNA in extinct aborigines from Tierra del Fuego-Patagonia*. Human Molecular Genetics, 6:41-46 (1997).
- **Lalueza-Fox** C., Luna-Calderon F., Calafell F., Morera B., Bertrantpetit J. *mtDNA from extinct Tainos and the peopling of the caribbean*. Annuals Human Genetics, 65:137-151 (2001).
- **Lane** N. *Bioenergetic Constraints on the Evolution of Complex Life*. Cold Spring Harb Perspect Biol 6:a015982: 1 -18 (2014).
- **Lewis** Jr C.M., Buikstra J.E., y Stone A.C. *Ancient DNA and genetic continuity in the South Central Andes*. Latin American Antiquity 18(2), 145-160 (2007).
- **Librado** P. y Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics 25: 1451-1452 (2009).
- **Lodish** H., Berk A., Matsudaira P., Jaiser C., Krieger M., Scott M., Zipursky S.L., Darnell J. *Biología Celular y Molecular*. 5º Edición, Editorial Médica

- Panamericana, Buenos Aires (2005).
- **López Pérez** M.J. Y Montoya J. *Sistema genético mitocondrial humano*. Capítulo II de la Monografía XXXVI: Sistema mitocondrial: un reto en la medicina humana. Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia, Madrid, España, 31-46 (2012).
 - **Lawlor** D.A., Dickel CD., Hauswirth WW., Parham P. *Ancient HLA genes from 7,500 year old Archaeological Remains*. Nature 349:785-788 (1991).
 - **Luciani** S., Fornaciari G., Rickards O., Labarga C., Rollo F. *Molecular characterization of a pre-columbian mummy and in situ coprolite*. American Journal of Physical Anthropology, 129:620-629 (2006).
 - **Malhi** R. Cybulski, J. Tito, R. Johnson, J. Harry, H. y Dan, C. *Brief communication: mitochondrial haplotype C4c confirmed as a founding genome in the Americas*. American Journal of Physical Anthropology, 141: 191-497 (2010).
 - **Manfredi** G, Thyagarajan D, Papadopoulou LC, Pallotti F, Schon EA. *The fate of human sperm-derived mtDNA in somatic cells*. Am. J. Hum. Genet. 61:953-60 (1997).
 - **Manríquez** G., Moraga M., Santoro C., Aspillaga E., Arriaza B., Rothhammer F. *Morphometric and ADNmt analyses of archaic skeletal remains from Southwestern South America*. Chúnagara, 43: 283-292 (2011).
 - **Marangoni** A., Caramelli D. y Manzi G. *Homo Sapiens in the Americas. Overview of the earliest human expansion in the New World*. Journal of Anthropological Sciences 91, 1-19 (2013).
 - **Margulis**, L. *Origin of Eukaryotic Cells*. Yale University Press, New Haven, USA (1970).
 - **Marrero** AR., Bravi CM., Stuart S., Long JC., Pereira das Veves Leite F., Kommers T., Carvalho CMB., Junho Pena SD., Ruiz-Linares A., Salzano FM., Bortoloni MC. *Pre- and Post- Columbian gene and cultural continuity: the case of the Gaucho from Southern Brazil*. Human Heredity 64(3): 160-171 (2007).

- **Martínez G.**, Bayala P., Flensburg G., López R. *Análisis preliminar de los entierros humanos del sitio Paso Alsina 1 (Partido de Patagones, Provincia de Buenos Aires)*. *Intersecciones en Antropología* 7: 95-108 (2006).
- **Martínez G.** *Arqueología del curso inferior del Río Colorado: estado actual del conocimiento e implicaciones para la dinámica poblacional de cazadores-recolectores Pampeano-Patagónicos. Cazadores Recolectores del Cono Sur*. *Revista de Arqueología*, 3: 71-92 (2008-2009).
- **Martínez G.**, Flensburg G., Bayala P. *Chronology and human settlement in Northeastern Patagonia (Argentina): patterns of site destruction, intensity of archaeological signal and population dynamics*. *Quaternary International*, 301: 123-134 (2013).
- **Martínez-Labarga C.** y Rickards O.; *La utilización del DNA antiguo en la investigación de la historia evolutiva humana*. *Rev. Esp. Antrop. Biol.*, 20:195-213 (1999).
- **Mendisco F.**, Keyser C., Hollard C., Seldes V., Nielsen A., Crubezy E., Ludes B. *Application of the iPLEX Gold SNP genotyping method for the analysis of Amerindian ancient DNA samples: benefits for ancient population studies*. *Electrophoresis*, 32:1-8 (2011).
- **Mendisco F.**, Keyser C., Seldes V., Rivolta C., Marcolli P., Cruz P., Nielsen A., Crubezy E., Ludes B. *Genetic diversity of a late prehispanic group of the Quebrada de Humaahuaca, northwestern Argentina*. *Annals of Human Genetics* (2014).
- **Merriwether D.A.**, Hall W.W., Vahlne A. y Ferrell R.E. *mtDNA Variation Indicates Mongolia May Have Been the Source for the Founding Population for the New World*. *American Journal of Human Genetics* 59, 204-212 (1996).
- **Merriwether D.A.**, Rothhammer F. y Ferrell R.E. *Distribution of the Four Founding Lineage Haplotypes in Native Americans Suggests a Single Wave of Migration for the New World*. *American Journal of Physical Anthropology* 98, 411-430 (1995).

- **Miotti** L. 2003. *Patagonia: a paradox for building images of the first Americans during the Pleistocene/Holocene transition*. Quaternary International, 109-110: 147-173.
- **Miotti** L. y Salemme M. *When Patagonia was colonized: people mobility at high latitudes during Pleistocene/Holocene transition*. Quaternary International, 109-110: 95-111 (2003).
- **Monsalve** M., Cardenas F., Guhl F., Delaney A., Devine D. *Phylogenetic analysis of mtDNA lineages in south American mummies*. American Journal of Human Genetics 60:293-303 (1996).
- **Moraga** M., Rocco P., Miquel J., Nervi F., Llop E., Chakraborty R., Rothhammer F., Carvalho P. *Mitochondrial DNA polymorphisms in Chilean aboriginal populations: implications for the peopling of the Southern Cone of the continent*. American Journal of Physical Anthropology, 113: 19-29 (2000).
- **Moraga** M., Santoro C., Standen V., Carvalho P., Rothhammer F. *Microevolution in prehistoric Andean population: chronologic mtDNA variation in the desert Valleys of Northern Chile*. American Journal of Physical Anthropology, 127:170-181 (2005).
- **Moraga** M., de Saint Pierre M., Torres F., Ríos J. *Vínculos de parentesco por vía materna entre los últimos descendientes de la etnia Kawesqar y algunos entierros en los canales patagónicos: evidencia desde el estudio de linajes mitocondriales*. Magallania, 38: 103-114 (2010).
- **Morales** M., Barberena R., Belardi J., Borrero L., Cortegoso V., Duran V., Guerci A., Goñi R., Gil A., Neme G., Yacobaccio H., Zarate M. *Reviewing human-environment interactions in arid regions of Southern South America during the past 3.000 years*. Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology, 281: 283-295 (2009).
- **Motti** J.M.B. *Caracterización de linajes maternosen la población actual del Noroeste y Centro-oeste argentinos*. Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata (2012).

- **Motti** JMB., Ramallo V., Muzzio M., Bailliet G., Bravi C. *El AND Mitochondrial como indicador de Relaciones Biológicas entre Poblaciones Antiguas y Actuales del NOA*. Capítulo 13 en: Avances Recientes de la Bioarqueología Latinoamericana, Luna L., Aranda C., Suby J. Editores, Buenos Aires pp:267-283 (2014).
- **Mulligan** C.J., Kitchen A., y Miyamoto M.M. *Updated Three-Stage Model for the Peopling of the Americas*. PloS One 3(9): e3199 (2008).
- **Mullis** K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 51: 263-273 (1987).
- **Nass** M.M., Nass S, Afzelius BA. *The general occurrence of mtDNA*. Exp Cell Res 37:516-39 (1965).
- **Nei** M. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press (1987).
- **Nei** M. y Li J. *Variances of average numbers of nucleotide substitution within and between population*. Molecular Biology Evolution, 3: 290-300 (1989).
- **Neves** W.A. y Hubbe M. *Cranial morphology of early Americans from Lagoa Santa, Brazil: Implications for the settlement of the New World*. PNAS 102 (51), 18309-18314 (2005).
- **Neves** W.A. Y Pucciarelli H.M. *Morphological affinities of the first Americans: an exploratory analysis based on early South American human remains*. Journal of Human Evolution 21, 261-273 (1991).
- **Nores** R. y Demarchi D. *Análisis de haplogrupos mitocondriales en restos humanos de sitios arqueológicos de la Provincia de Córdoba*. Revista Argentina de Antropología Biológica 13: 43-54 (2011).
- **Nores** R., Fabra M., Demarchi D. *Variación temporal y espacial en poblaciones pre-hispánicas de Córdoba*. Revista del Museo de Antropología 4: 187-194 (2011).
- **Núñez Atencio** L. *Reflexiones sobre el tráfico de caravanas y*

- complementariedad circumpuneña*. En: *Sociedades Precolombinas Surandinas: Temporalidad, Interacción y Dinámica Cultural del NOA en el ámbito de los Andes Centro-Sur*. Williams V., Ventura B., Callegari A., Yacobaccio H. editores, Buenos Aires, pp: 33-57 (2007).
- **O`Rourke** D.H. y Raff J.A. *The Human Genetics History of the Americas: The Final Frontier*. *Current Biology* 20(4), 202-207 (2010).
 - **Orquera** L. y Gómez Otero J. *Los cazadores-recolectores de las costas de Pampa, Patagonia y Tierra del Fuego*. *Relaciones de la Sociedad Argentina de Antropología*, 32: 75-99 (2007).
 - **Pääbo** S. *Molecular cloning of ancient Egyptian mummy DNA*. *Nature* 314:644– 45 (1985).
 - **Pakendorf** B. y Stoneking M. *Mitochondrial DNA and Human Evolution*. *Annu. Rev. Genom. Human. Genet.* 6, 165- 183 (2005).
 - **Perego**, U. Achilli, A. Angerhofer, N. Accetturo, M. Pala, M. Olivieri, A. Kashani, B. Ritchie, K. Scozzari, R. Kong, Q. Myres, N. Salas, A. Semino, O. Bandelt, H. Woodward, S. y Torroni, A. *Distinctive paleo-indian migration routes from Beringia marked by two rare mtDNA haplogroups*. *Current Biology*, 19: 1-8 (2009).
 - **Perego** U.A., Angerhofer N., Pala M., Olivieri A., Lancioni H., Kashani B.H., Carossa V., Ekins J.E., Gómez-Carballa A., Huber G., Zimmermann B., Corach D., Babudri N., Panara F., Myres N.M., Parson W., Semino O., Salas A., Woodward S.R., Achilli A., Torroni A. *The Initial peopling of the Americas: A growing number of founding mitochondrial genomes from Beringia*. *Genome Research* 20, 1174-1179 (2010).
 - **Pérez** M. y Killian Galván V.A. *Doncellas (Puna Septentrional, Jujuy, Argentina): Nuevos Enfoques a partir del Estudio Cerámico y del Análisis Paleodietario*. *Estudios Atacameños* 42:79-100 (2011).
 - **Pérez** S.I. *Poblamiento Humano, Diferenciación Ecológica y Diversificación Fenotípica en América*. *Runa* XXXII (1), 83- 104 (2011).

- **Pérez S.I.**, Bernal V., Gonzalez P.N., Sardi M., Politis G.G. *Discrepancy between Cranial and DNA Data of Early Americans: Implications for American Peopling*. Plos One 4 (5), 1-11 (2009).
- **Pérez S.I.**, Lema V., Felizola Diniz-Filho J.A., Bernal V., Gonzalez P.N., Gobbo D., Pucciarelli H.M. *The role of diet and temperatura in shaping cranial diversification of South American human populations: an approach based on spatial regression and divergence rate tests*. Journal of Biogeography 38, 148-163 (2011).
- **Pérez de Micou C.**, *El sitio Alero Mazquiarán, Chubut*. Capítulo 3 En: *Imágenes desde un alero: investigaciones multidiciplinarias en Río Mayo, Chubut Patagonia argentina*. Pérez de Micou C., Trivi de Mandri M., Burry L.S. editoras. Buenos Aires pp: 33-41 (2009).
- **Pickrell J.** y Reich D. *Towards a new history and geography of human genes informed by ancient DNA*. bioRxiv online (2014).
- **Pilli E.**, Modi A., Serpico C., Achilli A., Lancioni H., Lippi B., Bertoldi F., Gelicich S., Lari M. Caramelli D. *Monitoring DNA contamination in handled Vs. directly excavated ancient human skeletal remains*. Plos One, 8: e52524 (2013).
- **Poinar H.** y Stankiewicz A. *Protein preservation and DNA retrieval from ancient tissues*. Proceeding of National Academy of Science, USA, 96:8426-8431 (1998)
- **Poinar H.**, Kuch M., Sobolk K., Barnes I., Stankiewicz A., Kuder T., Spaulding W., Bryant V., Cooper A., Pääbo S. *A molecular analysis of dietary diversity for three archaic Native Americans*. Proceeding of National Academic of Science, 98:4317-4322 (2001).
- **Politis G.G.**, Messineo P.G., Kaufmann C.A. *El Poblamiento temprano de las llanuras pampeanas de Argentina y Uruguay*. Complutum 15, 207-224 (2004).
- **Politis G.G.**, Prates L., Perez S. I. *El Poblamiento de América. Arqueología y bio-antropología de los primeros americanos*. Colección Ciencia Joven nº 35, Editorial Eudeba, Buenos Aires (2009).

- **Postillone** M.B., Crespo CM., Russo G., Cardozo DG. *Distribución de haplogrupos mitocondriales amerindios en muestras arqueológicas de Sudamérica*. En: Esnal, A. Funes, M. Grosso, M. Kuperszmit, N. Murgu, A. y Romero, G. (Comp). *Entre Pasados y Presentes IV. Estudios Contemporáneos en Ciencias Antropológicas*. C.A.B.A. ISBN: 978-987-25575-3-9. Pp: 347-363 (2014a).
- **Postillone** M.B., Dejean CB., Fuchs ML., Varela HH., Avena SA., Carnese FR. *Evidencia de contacto entre poblaciones prehispánicas de la Puna Jujeña y el Norte de Chile. Nuevas Aproximaciones Biológicas*. En: *Antropología biológica y estudios del comportamiento mortuario de los pueblos prehispánicos del noroeste Argentino*" Gheggi MS. Y Seldes V. Editorial es la Fundación Azara, ISBN: 978-987-3781-09-4: 95-110 (2014b).
- **Powell** J.F. y Neves W.A. *Craniofacial Morphology of the First Americans: Pattern and Process in the Peopling of the New World*. *Yearbook of Physical Anthropology* 42, 153-188 (1999).
- **Prates** L., Politis G., Steele J. *Radiocarbon chronology of the early human occupation of Argentina*. *Quaternary International* 301, 104-122 (2013).
- **Pucciarelli** H.M., Neves W.A., González-José R., Sardi M.L., Ramírez Rozzi F., Struck A., y Bonilla M.Y. *East-West cranial differentiation in pre-Columbian human populations of South America*. *HOMO – Journal of Comparative human Biology* 57, 133-150 (2006).
- **Rademaker** K., Hodgins G., Moor K., Zarrillo S., Miller C., Bromley G.R.M., Leach P., Reid D.A., Álvarez W.Y., Sandweiss D.H. *Paleoindian settlement of the high-altitude Peruvian Andes*. *Science* 346, 466-469 (2014).
- **Ramachandran** S., Deshpande O., Roseman C., Rosenberg N., Feldman M., Cavalli-Sforza L. *Support from the relationship of genetic and geographic distance in human populations for a serial founder effect originating in Africa*. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, 102: 15942-15947 (2005).

- **Rasmussen M.**, Anzick S., Waters M., Skoglund P., De Giorgio M., Stafford Jr T., Rasmussen S., Moltke I., Albrechtsen A., Doyle S., Poznik D., Gusmundsdottir V., Yadav R., Malaspina A., White S., Alentoft M., Cornejo O., Tambets K., Eriksson A., Heintzman P., Kermin M., Korneliussen T., Meltser D., Pierre T., Stenderup J., Saag L., Warmuth V., Lopes M., Malhi R., Brunak S., Sicheritz-Ponten T., Barnes I., Collins M., Orlando L., Balloux F., Manica A., Gupta R., Metspalu M., Bustamante C., Jakobsson M., Nielsen R., y Willerslev E. *The genome of a late pleistocene human from a Clovis burial site in Western Montana*. *Nature* 506: 225-239 (2014).
- **Ray N.**, Wegmann D., Fagundes N., Wang S., Ruiz-Linares A., Excoffier L. *A statistical evaluation of models for the initial settlement of the American continent emphasizes the importance of gene flow with Asia*. *Molecular Biology Evolution*, 27: 337-345 (2010).
- **Reich D.**, Green R., Kircher M., Krause J., Patterson N., Durand E., Viola B., Briggs A., Stenzel U., Johnson P., Maricic T., Good J., Marques-Bonet T., Alkan C., Fu Q., Mallick S., Li H., Meyer M., Eichler E., Stoneking M., Richards M., Talamo S., Shunkov M., Derevianko A., Hublin J., Kelso J., Slatkin M., Pääbo S. *Genetic history of an archaic hominin group from Denisova Cave in Siberia*. *Nature* 468: 1053-1060 (2010).
- **Reich D.**, Patterson N., Campbell D., Tandon A., Mazieres S., Ray N., Parra M., Rojas W., Duque C., Mesa N., García L., Trienan O., Blair S., Mestre A., Dib J., Bravi C., Baillel G., Corach D., Hunemeier T., Bortolini M., Salzano F., Petzl-Erler M., De Acuña-Añonso V., Aguilar-Luna C., Canizales-Quinteros S., Tusie-Luna T., Riba L., Rodriguez Cruz M., López-Alarcón M., Zolezzi I., Fernández-López J., Contreras A., Jimenez-Sanchez G., Gomez-Vásquez M., Molina J., Carracedo A., Salas A., Gallo C., Poletti G., Witonsky D., Alkorta-Aranburu G., Sukernik R., Osipova L., Fedorova S., Vasquez R., Villena M., Moreau C., Barrantes R., Pauls D., Excoffier L., Bedoya G., Ronthhammer F., Dugoujon J., Larrouy G., Klinta E., Labuda D., Kidd J., Kudd K., Di Rienzo A., Freimer N., Price A., Ruiz-Linares A. *Reconstructing Native*

- American population history*. Nature, 488: 370-374 (2012).
- **Renfrew C.** *Archaeogenetics: towards a population prehistory of Europe*. En: Renfrew, C. y Boyle, K (Eds.). *Archaeogenetics: DNA and the population prehistory of Europe*. McDonald Institute Monographs (2000).
 - **Rey Fraile I.** *Utilización del AND antiguo en estudios bioarqueológicos*. Notas Técnicas dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/2982290.pdf (2007).
 - **Ribeiros-dos-Santos A., Santos S., Machado A., Guapindaia V., Zago M.** *Heterogeneity of mitochondrial DNA haplotypes in pre-Columbian natives of the Amazon region*. American Journal of Physical Anthropology 101: 29-37 (1996).
 - **Ricaut F.X., Kolodessnikov S., Keyser_tracqui C., Alekseev AN., Crubézy E., Ludes B.** *Genetic analysis of human remains found in two eighteenth century Yakut graves at At-Dabaan*. International Journal of Legal Medicine 118: 24-31 (2004).
 - **Rickards O., Martinez-Labarga C., Lum J., De Stefano G., Cann R.** *mtDNA history of the Cayapa Amerinds of Ecuador: detection of additional founding lineages for the Native American populations*. American Journal of Human Genetics, 65: 519-530 (1999).
 - **Rohland N. y Hofreiter M.** *Ancient DNA extraction from bones as teeth*. Nature protocols, 7: 1756-1762 (2007a).
 - **Rohland N. y Hofreiter M.** *Comparison and optimization of ancient DNA extraction*. Biotechniques, 3: 343- 352 (2007b).
 - **Rohlf F.J.** *NTSYSpc, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System 2.0*. Applied Biostatistic Inc. Exeter Software (1998).
 - **Rothhammer F. y Dillehay T.D.** *The Late Pleistocene Colonization of South America: An Interdisciplinary Perspective*. Annals of Human Genetics 73, 540-549 (2009).
 - **Rothhammer F., y Silva C.** *Craniometrical variation among South American*

- prehistoric populations: Climatic, altitudinal, chronological and geographic contributions.* American Journal of Physical Anthropology 82, 9-17 (1990).
- **Russo** MG., Seldes V., Rivolta MC., Zigarán MF., Avena S., Dejean C. *Aportes de la genética al estudio de la dinámica poblacional del NOA en tiempos prehispánicos.* En: Antropología Biológica y Estudios del Comportamiento Mortuorio de los Pueblos Prehispánicos del Noroeste Argentino. Gheggi MS. Y Seldes V. editoras, Buenos Aires pp: 83-93 (2014).
 - **Sala** A., Argüelles CF., Marino ME., Bobillo mC., Fenocchio A., Corach D. *Genetic analysis of six communities of Mbyá-Guaraní inhabiting Northeastern Argentina by means of nuclear and mitochondrial polymorphic markers.* Human biology 82 (4):433- 456 (2010).
 - **Sala** A. y Corach D. *Analysis of admixture and genetic structure of two Native American groups of Southern Argentinean Patagonia.* Molecular Biology Reports, 41: 1533-1543 (2014).
 - **Salas** A., Jaime J., Álvarez-Iglesias V., Carracedo A. *Gender bias in the multiethnic genetic composition of Central Argentina.* Journal of Human Genetics, 53: 662-674 (2008).
 - **Salas** A., Lovo-Gómez J., Álvarez-Iglesias V., Cerezo M., Lareu MV., Macaulay V., Richards MB., Carracedo Á. *Mitochondrial Echoes of First Settlement and Genetic Continuity in El Salvador.* PLoS ONE 4(9): e6882 (2009).
 - **Sanger** F., Nicklen S., Coulson AR. *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.* Proc Natl Acad Sci USA 74:5463-7(1977).
 - **Schurr** T.G. *The Peopling of the New World: Perspectives from Molecular Anthropology.* Annual Review of Anthropology 33, 551-583 (2004).
 - **Schurr** T.G. y Sherry S.T. *Mitochondrial DNA and Y Chromosome Diversity and the Peopling of the Americas: Evolutionary and Demographic Evidence.* American Journal of Human Biology 16, 420-439 (2004).
 - **Schurr** T.G., Ballinger S.W., Gan Y-Y., Hodge J.A., Merriwether D.A.,

- Lawrence D.N., Knowler W.C., Weiss K.M. Y Wallace D.C. *Amerindian Mitochondrial DNAs Have Rare Asian Mutations at High Frequencies, Suggesting They Derived from Four Primary Maternal Lineages*. American Journal of Human Genetics 46, 613-623 (1990).
- **Silva J.**, Bonatto S., Holanda A., Ribeiro-Dos-Santos K., Paixao B., Goldman G., Abe-Sandes K., Rodriguez-Delfin L., Barboza M., Paco-Larson M., Pertzl-Erler M., Valente V., Santos S., Zago M. *Mitochondrial genome diversity of Native Americans supports a single early entry of founder populations into America*. American Journal of Human Genetics, 71: 187-192 (2002).
 - **Solórzano Navarro E.**, *De la Mesoamérica Prehispánica a la Colonial: La huella del DNA antiguo*. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España (2006).
 - **Spigelman M.**, MATHeson C., Lev G., greenblatt C., Donoghue H.D. *Confirmation of the presence of Mycobacterium tuberculosis complex-specific DNA in three archaeological specimens*. Int. J. Osteoarchaeol. 12: 393-400 (2002)
 - **St. John J.C.** y De Jonge C.J. *A Hypothesis for transmission of paternal mitochondrial DNA*. Reproductive Medicine Review 8, 73-85 (2000).
 - **Stoessel L.** y Martínez G. *El proceso de intensificación en la transición Pampeano-Patagonica oriental, discusión y perspectivas comparativas con regiones aledañas*. Comechingonia 18: 65-94 (2014).
 - **Stone A.** y Stoneking M. *Ancient DNA from a pre-Columbian Amerindian population*. American Journal of Physical Anthropology, 92: 463-471 (1993).
 - **Stoneking M.**, Soodyall H. *Human evolution and the mitochondrial genome*. Curr. Opin. Genet. Dev.6:731–36 (1996).
 - **Stoneking M.** *Hypervariable sites in the mtDNA control region are mutational hotspots*. Am. J. Hum. Genet.67:1029–32 (2000).
 - **Sutovsky P.**, Moreno RD, Ramalho-Santos J, Dominko T, Simerly C, Schatten G. *Ubiquitinated sperm mitochondria, selective proteolysis, and the regulation*

- of mitochondrial inheritance in mammalian embryos*. Biol Reprod 63:582-90 (2000).
- **Tamm** E., kivisild T., Reidla M., Metspalu M., Smith D.G., Mulligan C.J., Bravi C.M., rickards O., Martinez-Labarga C., Khusnutdinova E.K., Fedorova S.A., golubenko M.V., Stepanov V.A., Gubina M.A., Zhadanov S.I., Ossipov L.P., Damba L., Voevoda M.I., Dipierri J.E., Villems R., Malhi R.S. *Beringian Sandstill and Spread of Native American Founders*. Plos One 9, 1-6 (2007).
 - **Tamura** K. y Nei M. *Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees*. Molecular Biology and Evolution 10:512-526 (1993).
 - **Tarragó** M. *La historia de los pueblos circumpuneños en relación con el altiplano y los Andes Meridionales*. Estudios Atacameños nº 7, 93-104 (1984).
 - **Torres-Rouff** C., Pimentel G., Ugarte M. *¿Quiénes viajaban? Investigando la muerte de viajeros prehispánicos en el desierto de Atacama (ca. 800 AC – 1536 DC)*. Estudios Atacameños 43:167-186 (2012).
 - **Torróni** A., Schurr T.G., Cabell M.F., Brown M.D., Neel J.V., Larsen M., Smith D.G., Vullo C.M. Y Wallace D.C. *Asian Affinities and Continental Radiation of the Four Founding Native American mtDNAs*. American Journal of Human Genetics 53, 563-590 (1993).
 - **Torróni** A., Schurr T.G., Yang C-C., Szathmary E.J.E., Williams R.C., Schanfield M.S., Troup G.A., Knowler W.C., Lawrence D.N., Weiss K.M., y Wallace D.C. *Native American Mitochondrial DNA Analysys Indicates That the Amerind and the Nadene Populations Were Founded by Two Independent Migrations*. Genetics 130, 153-162 (1992).
 - **Turner II** C.G. *Sinodonty and Sundadonty: A dental anthropological view of Mongoloid microevolution, origin, and dispersal into the Pacific Basin, Siberia, and the Americas*. En Late Pleistocene and early Holocene cultural connection of Asia and America. Editado por Vasilievsky R.S., Novosibirsk, USSR, Academy of Sciences, Siberian Branch, 72-76 (1983).

- **Vigilant** L, Pennington R, Harpending H, Kocher TD, Wilson AC. *Mitochondrial DNA sequences in single hairs from a southern African population*. Proc Natl Acad Sci USA 86:9350-4 (1989).
- **Wallace** DC, Brown MD, Lott MT. *Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease*. Gene 238:211-30 (1999).
- **Wallace** DC. *Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease*. Proc Natl Acad Sci USA 91:8739-46 (1994).
- **Willerslev** E. y Cooper, A. *Ancient DNA*. Proceeding of the Royal Society of Biology, 272:3-16. (2005).
- **Wilson** A., Taylor T., Ceruti M., Chavez J., Reinhard J., Grimes V., Meier-Augenstein W., Cartmell L., Stern B., Richards M., Worobey M., Barnes I., Gilbert T. *Stable isotopes and DNA evidence for ritual sequence in Inca child sacrifice*. Proceeding of the National Academy of Science, 104:16456-16461 (2007).
- **Witas** HK. Y Zawicki P. *Mitochondrial DNA and human evolution: A review*. Przegląd Antropologiczny- Anthropological Review, Vol. 67, 97-110 (2004).
- **Yang** D., Eng B., Wayne J., Dудар J., Saunders S. *Technical note: improved DNA extraction from ancient bones using silica-based spin columns*. American Journal of Physical Anthropology, 105:539-543 (1998).

Anexo: Material suplementario.

1. Introducción

Tabla anexa 1. Muestras Precolombinas estudiadas en Sudamérica para los 4 Hgs amerindios

Muestra	n	A%	B%	C%	D%	Indet%	Localización	Temporalidad (años)	Referencia
Boyacá	6	50,0	16,0	34,0	0,0	0,0	Depto. Boyacá, Colombia	1543- 213 AP	Monsalve <i>et al.</i> (1996)
Madrid 2-41 (Sabana de Bogotá)	11	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	Dist. Cap. Bogotá, Colombia	2000 AP	Silva <i>et al.</i> (2008)
La Purnia (Santander)	17	35,0	41,0	0,0	24,0	0,0	Depto. Santander, Colombia	1090 AP	Casas-Vargas <i>et al.</i> (2011)
Cuzco	1	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	Depto. Cuzco, Perú.	1033- 840 AP	Luciani <i>et al.</i> (2006)
Patallacta, Paucarcancha y Huata	57	5,0	40,0	14,0	2,0	39,0	Depto. Cuzco, Perú	400 - 500 AP	Shinoda <i>et al.</i> (2006)
Lambayeque	28	21,0	25,0	4,0	25,0	25,0	Depto. Lambayeque, Perú.	1200- 575 AP	Shimada <i>et al.</i> (2004)
Conchopata	16	29,0	50,0	14,0	7,0	0,0	Depto. Ayacucho, Perú	1400- 1200 AP	Kemp <i>et al.</i> (2009)
Huari	18	17,0	22,0	55,0	6,0	0,0	Depto. Ayacucho, Perú	900- 600 AP	Kemp <i>et al.</i> (2009)
Palpa	130	2,3	17,7	27,7	52,3	0,0	Depto. Ica, Perú	1200- 800 AP	Fehren-Schmitz <i>et al.</i> (2010)
Chen Chen (Valle de Moquegua)	27	33,3	33,3	14,8	3,7	14,8	Depto. de Moquegua, Perú	7200- 1000 AP	Lewis, Buikstra y Stone (2007)
Valles altos del Río Palpa y Viscas	56	7,1	51,8	33,9	7,1	0,0	Depto. Ica, Perú	1200- 800 AP	Fehren-Schmitz <i>et al.</i> (2011)
Tiwanacu	13	8,0	15,0	23,0	23,0	31,0	Depto. La Paz, Bolivia	1000- 2300 AP	Rothhammer <i>et al.</i> (2003)
Tompullo 2 (Cora Cora)	24	8,3	70,8	4,2	16,7	0,0	Depto. Arequipa, Perú	siglo XV- XVI	Baca <i>et al.</i> (2012)
Valle de Azapa, Camarones y Lluta, (Arcaico tardío)	14	50,0	36,0	7,0	7,0	0,0	Prov. Arica, Chile	3900 AP	Moraga <i>et al.</i> (2005)
Valle de Azapa, Camarones y Lluta, (Horizonte Medio)	19	32,0	42,0	26,0	0,0	0,0	Prov. Arica, Chile	1000 AP	Moraga <i>et al.</i> (2005)
Valle de Azapa, Camarones y Lluta, (Intermed. tardío)	15	20,0	53,0	20,0	7,0	0,0	Prov. Arica, Chile	500 AP	Moraga <i>et al.</i> (2005)
Quebrada de Acha	4	25,0	0,0	50,0	25,0	0,0	Prov. Arica, Chile	9000 - 7500 AP	Manríquez <i>et al.</i> (2011)
Camarones 14	4	25,0	50,0	25,0	0,0	0,0	Prov. Arica, Chile	7500 AP	Manríquez <i>et al.</i> (2011)
Tagua Tagua	4	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	Prov. Biobío, Chile	8000 AP	Manríquez <i>et al.</i> (2011)
Baño Nuevo	4	0,0	75,0	25,0	0,0	0,0	Prov. Coyhaique, Chile	9000 AP	Manríquez <i>et al.</i> (2011)
Región Amazónica	18	28,0	6,0	22,0	5,0	39,0	Estados de Pará, Amapá y Amazonas, Brasil	500 - 4000 AP	Ribeiro dos Santos <i>et al.</i> (1996)

Continuación tabla anexa 1

Muestras	n	A%	B%	C%	D%	Indet%	Localización	Temporalidad (años)	Referencia
Queixadinha (Vale do Jaquitinhonha)	14	0,0	14,3	85,7	0,0	0,0	Unid. Federal de Minas Gerais, Brasil	antes del siglo XIX	Gonçalves <i>et al.</i> (2010)
Los Amarillos	18	72,0	6,0	6,0	16,0	0,0	Prov. Jujuy, Argentina	1000 -500 AP	Mendisco <i>et al.</i> (2011)
Cortaderas Derecha	3	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	Prov. Salta, Argentina	1300 AP	Dejean <i>et al.</i> (2006)
Llullaillaco	3	0,0	0,0	33,0	67,0	0,0	Prov. Salta, Argentina	520- 430 AP	Wilson <i>et al.</i> (2007)
Pampa Grande	21	11,0	47,0	0,0	42,0	0,0	Prov. Salta, Argentina	1310 AP	Carnese <i>et al.</i> (2010)
Sierras centrales	35	23,0	26,0	34,0	17,0	0,0	Museos de la Prov. de Córdoba, Argentina	3360 - 345 AP	Nores y Demarchi (2011)
Sierras y Llanuras	48	16,7	22,9	39,6	20,8	0,0	Museos de la Prov. De Córdoba, Argentina	4525 - 345 AP	Nores <i>et al.</i> (2011)
Arroyo seco 2	8	0,0	37,0	50,0	13,0	0,0	Prov. Buenos Aires, Argentina	Desde 7800 AP	Figueiro y Sans (2007)
“Aonikenk”	15	0,0	0,0	26,7	73,3	0,0	Patagonia de Chile y Argentina	150 AP	Lalueza <i>et al.</i> (1997)
Canal de Beagle	2	0,0	0,0	50,0	50,0	0,0	Tierra del Fuego, Chile	150 AP	Dejean <i>et al.</i> (2008)
“Yámana, Kaweskar, Selknam”	45	0,0	0,0	42,2	55,6	2,2	Tierra del Fuego, Chile y Argentina	150 AP	Lalueza <i>et al.</i> (1997)

2. Materiales y Métodos

2.1. Descripción de protocolos

2.1.1. Protocolo Kit QIAamp[®] DNA Investigator Kit (QIAGEN)

Este equipo comercial se basa en la extracción de ADN utilizando columnas de sílica:

1. Al polvo de cada muestra se le agregó 360 ul del buffer ATL y 20 ul de Proteinasa K (20 mg/ml, Promega). Se incubó toda la noche a 56°C.
2. Al segundo día se añadió 20 ul de la Proteinasa K y se dejó hasta el día siguiente en las mismas condiciones.

3. Luego de centrifugar las muestras a 800 revoluciones por minuto (rpm), se agregó 300 ul de buffer AL. Se agitó durante 10 min. para homogeneizar.
4. Las muestras se expusieron a 70°C durante un baño térmico a 12 min., agitando cada intervalos de 3 min. para mejorar la lisis.
5. Se centrifugaron a 14000 rpm durante 1 min. y el sobrenadante obtenido se transfirió a un nuevo tubo eppendorf de 1,5 ml.
6. 150 ul de etanol absoluto fueron agregados al sobrenadante y se mezcló con vortex por 15 segundos (seg.).
7. Se preparó una columna MiniElute QIAamp con un tubo colector de 2 ml y se transfirió toda la solución del paso 5.
8. Se centrifugó a 8000 rpm durante 1 min.
9. Se agregó 600 ul de buffer AW1 a la columna y se centrifugó bajo las mismas condiciones del paso 7. Se descartó el tubo colector y la columna fue pasada a un nuevo tubo.
10. Se agregaron 700 ul de buffer AW2 y la centrifugación fue ídem paso 8.
11. 700 ul de etanol absoluto fueron agregados y se procedió ídem paso 8.
12. La columna vacía se puso en un tubo nuevo y se centrifugó durante 3 min. a 14000 rpm. Para terminar de eliminar el excedente de etanol.
13. Como tubo colector esta vez utilizamos un tubo eppendorf de 1,5 ml, se colocó la columna y se la llevo a 56°C en calor seco por 5 min.
14. Se agregaron 40 ul de agua calidad biología molecular a 60°C para eluir la muestra y se lo dejó incubando a temperatura ambiente por 5 min. Luego se centrifugó 1 min. a 14000 rpm. Este paso se realizó dos veces utilizando el mismo tubo colector para aumentar el volumen final donde está disuelto el ADN.

2.1.2. Protocolo Kit Geneclean (MP Biomedicals)

Como segundo método se utilizó este equipo comercial también basado en la purificación de ADN a partir de columnas de sílica:

- 1) Partimos de 100 mg de polvo, se le agregaron 500ul de EDTA (0,5M) + 25 ul de Proteinasa K (20mg/ml, Promega) y se incubó toda la noche a 55°C.
- 2) Se adicionaron 100 ul de la misma Proteinasa K y se la dejó hasta el día siguiente. Los pasos 1 y 2 se realizan para descalcificar el polvo de dentina y hueso a tratar, ayudando a la eliminación del calcio y la obtención del material genético retenido en la matriz mineral (degradando el material sólido queda expuesta mayor superficie de contacto para favorecer a que los reactivos que se utilizarán con posterioridad se unan al ADN).
- 3) Se centrifugó por 10 min. y se pasó el sobrenadante a un nuevo tubo.
- 4) Se agregaron 500 ul de solución DeHyb A y 150 ul de Glassmilk y se dejó incubando durante 2 hs a 55°C.
- 5) Se transfirió toda la muestra a una columna de filtrado y se centrifugó por 1 min. a 14000 rpm. Este paso se realizó las veces necesarias para filtrar toda la muestra, eliminando cada vez el eluato.
- 6) Se agregó 250ul de Salton Wash 1 y centrifugó 1 min. A 14000 rpm, se descartó el eluato.
- 7) Ídem condiciones del paso 6 pero en este caso se agregó Salton Wash 2
- 8) Se agregaron 250ul de aDNA Alcohol Wash a la columna y se centrifugó 1 min. a 14000 rpm. Descartamos el eluato.
- 9) Se centrifugó nuevamente (con el tubo de captura vacío) durante 2min. para secar el filtro de los restos de alcohol.

- 10) Se ubicó el filtro en un tubo de captura nuevo y se agregaron 50ul de DNA free Elution Solution y se resuspendió el pellet de la columna para disolverlo. Se dejó incubar por 15 min. a temperatura ambiente.
- 11) Por último se centrifugó 1min. a 14000 rpm y se guardó el eluato del tubo de captura.
- 12) Se realizó una segunda elución ídem paso 10 y 11 pero utilizando un volumen de 25 ul de DNA free Elution Solution.

2.1.3. Protocolo de extracción con Fenol – Cloroformo- Alcohol Isoamílico

Por otro lado, se extrajo el ADN con modificaciones en el método de Green y Sambrook, 2012:

1. Primero se realizó la descalcificación del polvo de hueso y diente obtenido como se describió en el paso 1 del protocolo del GeneClean: Se agregó al polvo de cada muestra 1ml de EDTA 0,5M (pH 8) a temperatura ambiente y se las dejó con agitación durante dos días.
2. Se extrajo el sobrenadante de EDTA y se preservó a -20°C. Al precipitado se lo digirió con 1 ml de solución conteniendo: Tris-HCl 10 mM, EDTA 5mM, Acetato de Sodio 4% y SDS 2%, y 25 ul de Proteinasa K (Promega). Las muestras se incubaron toda la noche a 55°C en agitador.
3. Se agregaron 500 ul de fenol y 500 ul de la solución 24:1 de Cloroformo - Alcohol Isoamílico.
4. La muestra se centrifugó a 14000 rpm por 1° min.
5. Se retiró el sobrenadante, se colocó en un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 ml y se le agregaron 500 ul de Cloroformo – Alcohol Isoamílico en las mismas proporciones que el paso 3.

6. Ídem paso 4.
7. El sobrenadante fue retirado a otro tubo eppendorf de 1,5 ml.
8. La fase acuosa se purificó mediante columnas de sílica utilizando el equipo AccuPrep[®] PCR Purification Kit (BIONEER), siguiendo el protocolo especificado por el fabricante.

2.1.4. Protocolo de extracción a partir del EDTA obtenido en el primer paso del protocolo de extracción de fenol-clorofomo-isoamílico

cada tubo del EDTA de las muestras se le agregó 25 ul de Proteinasa K (Promega).

2. Se dejó agitando a 56° C durante 48 hs.
3. Sobre el tubo anterior se realizó la purificación de ADN utilizando el equipo AccuPrep[®] PCR Purification Kit (BIONEER), siguiendo el protocolo especificado por el fabricante.

4. Resultados

Tabla anexa 2. Muestras modernas utilizadas para generar las redes de haplotipos

Haplotipo	Asignación de Haplotipo	n	Sitios polimórficos de HVR I (16024 a 16365)																Cita Bibliográfica	Filialción
			16184.3C	16184.4C	16189C	16217C	16249C	16289G	16294T	16319A	16184.3C	16184.4C	16189C	16217C	16249C	16289G	16294T	16319A		
Chi2.M-B2	B2	1	16184.3C	16184.4C	16189C	16217C	16249C	16289G	16294T	16319A								Horai et al., 1993	Chiloe, Chile	
Chi3.M-B2	B2	2	16184.3C	16184.4C	16189C	16217C												Horai et al., 1993	Chiloe, Chile	
Chi4.M-B2	B2	1	16184.3C	16184.4C	16189C	16207G	16217C	16265G										Horai et al., 1993	Chiloe, Chile	
Chi5.M-B2	B2	1	16184.4C	16189C	16207G	16217C	16291T											Horai et al., 1993	Chiloe, Chile	
Chi6.M-B2	B2	2	16184.3C	16184.4C	16189C	16207G	16217C	16291T										Horai et al., 1993	Chiloe, Chile	
Chi7.M-B2	B2	1	16184.3C	16184.4C	16189C	16207G	16209C	16217C	16291T									Horai et al., 1993	Chiloe, Chile	
Chi9.M-B2	B2	1	16184.3C	16184.4C	16189C	16217C	16311C											Horai et al., 1993	Chiloe, Chile	
Chi13.M-D1	D1	2	16223T	16325C														Horai et al., 1993	Chiloe, Chile	
Chi14.M-C1	C1	1	16187T	16189C	16223T	16325C	16362C											Horai et al., 1993	Chiloe, Chile	
Chi15.M-D1	D1	1	16187T	16189C	16209C	16223T	16325C	16362C										Horai et al., 1993	Chiloe, Chile	
Chi17.M-D1	D1	3	16187T	16223T	16325C	16362C												Horai et al., 1993	Chiloe, Chile	
Chi18.M-D1	D1	1	16187T	16223T	16304C	16325C	16362C											Horai et al., 1993	Chiloe, Chile	
Chi19.M-D1	D1	1	16187T	16223T	16290T	16325C	16355G	16362C										Horai et al., 1993	Chiloe, Chile	
Chi20.M-D1	D1	2	16172C	16187T	16223T	16325C	16362C											Horai et al., 1993	Chiloe, Chile	
Chi21.M-D1	D1	2	16187T	16223T	16325C	16362C												Horai et al., 1993	Chiloe, Chile	
Chi22.M-D1	D1	2	16187T	16223T	16245T	16325C	16362C	16390A										Horai et al., 1993	Chiloe, Chile	
Chi25.M-A2	A2	1	16192T	16209C	16223T	16290T	16319A	16362C										Horai et al., 1993	Chiloe, Chile	
Chi26.M-A2	A2	1	16192T	16223T	16290T	16319A	16362C											Horai et al., 1993	Chiloe, Chile	
Chi34.M-C1	C1	5	16223T	16298C	16325C	16327T												Horai et al., 1993	Chiloe, Chile	
Chi35.M-C1	C1	1	16223T	16298C	16311C	16325C	16327T											Horai et al., 1993	Chiloe, Chile	
Chi36.M-C1	C1	1	16223T	16298C	16311C	16325C	16327T											Horai et al., 1993	Chiloe, Chile	
Chi37.M-C1	C1	3	16223T	16298C	16325C	16327T	16362C											Horai et al., 1993	Chiloe, Chile	
Chi39.M-C1	C1	1	16223T	16298C	16327T													Horai et al., 1993	Chiloe, Chile	
Chi40.M-C1	C1	8	16223T	16298C	16325C	16327T												Horai et al., 1993	Chiloe, Chile	
Chi41.M-C1	C1	1	16223T	16283C	16325C	16327T												Horai et al., 1993	Chiloe, Chile	
Chi42.M-C1	C1	1	16129A	16223T	16298C	16325C	16327T	16327T										Horai et al., 1993	Chiloe, Chile	
Chi43.M-C1	C1	2	16171G	16223T	16298C	16325C	16327T											Horai et al., 1993	Chiloe, Chile	
Map101.M-A2	A2	1	16111T	16223T	16290T	16319A	16356C	16362C										Sala y Corach, 2014	Rio Negro, Argentina	
Map148.M-A2	A2	1	16111T	16223T	16290T	16319A	16356C	16362C										Sala y Corach, 2014	Rio Negro, Argentina	
Map42.M-A2	A2	1	16111T	16223T	16290T	16319A	16356C	16362C										Sala y Corach, 2014	Rio Negro, Argentina	
Map87.M-A2	A2	1	16111T	16223T	16290T	16319A	16356C	16362C										Sala y Corach, 2014	Rio Negro, Argentina	
Map74.M-A2	A2	1	16111T	16129A	16223T	16290T	16319A	16362C										Sala y Corach, 2014	Rio Negro, Argentina	
Map108.M-B2	B2	1	16183C	16189C	16217C	16249C	16318G											Sala y Corach, 2014	Rio Negro, Argentina	
Map38.M-B2	B2	1	16183C	16189C	16217C	16249C	16318G											Sala y Corach, 2014	Rio Negro, Argentina	
Map138.M-B2	B2	1	16183C	16189C	16217C	16249C												Sala y Corach, 2014	Rio Negro, Argentina	
Map124.M-B2	B2	1	16183C	16189C	16217C	16249C												Sala y Corach, 2014	Rio Negro, Argentina	

Haplotipo	Asignación de Haplotipo	n	Sitios polimórficos de HVR (16024 a 16365)												Cita Bibliográfica	Filialción
			16223T	16298C	16325C	16327T	16298C	16325C	16298C	16325C	16327T	16298C	16325C	16327T		
Teh23.M-C1	C1b	1	16223T	16298C	16325C	16327T									Sala y Corach, 2014	El Chaliá, Chubut, Arg.
Teh28.M-C1	C1b	1	16223T	16298C	16325C	16327T									Sala y Corach, 2014	El Chaliá, Chubut, Arg.
Teh36.M-C1	C1b	1	16129A	16189C	16207G	16223T	16298C	16325C	16327T						Sala y Corach, 2014	El Chaliá, Chubut, Arg.
Teh51.M-C1	C1b	1	16129A	16189C	16207G	16223T	16298C	16325C	16327T						Sala y Corach, 2014	El Chaliá, Chubut, Arg.
Teh5.M-C1	C1b	1	16223T	16298C	16325C	16327T									Sala y Corach, 2014	El Chaliá, Chubut, Arg.
Teh10.M-D1	D1g	1	16187T	16223T	16325C	16362C									Sala y Corach, 2014	El Chaliá, Chubut, Arg.
Teh4.M-D1	D1g	1	16187T	16223T	16325C	16362C									Sala y Corach, 2014	El Chaliá, Chubut, Arg.
Teh13.M-D1	D1g	1	16187T	16223T	16245T	16325C	16362C								Sala y Corach, 2014	El Chaliá, Chubut, Arg.
Teh26.M-D1	D1g	1	16187T	16223T	16245T	16325C	16362C								Sala y Corach, 2014	El Chaliá, Chubut, Arg.
Teh2.M-D1	D1g	1	16187T	16223T	16325C	16362C									Sala y Corach, 2014	El Chaliá, Chubut, Arg.
Teh3.M-D1	D1g	1	16187T	16189C	16209C	16223T	16325C	16362C							Sala y Corach, 2014	El Chaliá, Chubut, Arg.
Teh50.M-D4	D4	1	16092C	16187T	16189C	16223T	16362C								Sala y Corach, 2014	El Chaliá, Chubut, Arg.
Teh56.M-D4	D4	1	16092C	16187T	16189C	16223T	16362C								Sala y Corach, 2014	El Chaliá, Chubut, Arg.
MB.GU1.M-A2	A2	33	16111T	16223T	16290T	16291T	16319A	16362C							Sala et al., 2010	Mbyá-Guaraní, Misiones, Arg.
MB.GU2.M-A2	A2	1	16111T	16223T	16266T	16290T	16319A	16362C							Sala et al., 2010	Mbyá-Guaraní, Misiones, Arg.
MB.GU3.M-A2	A2	1	16111T	16223T	16290T	16291T	16319A								Sala et al., 2010	Mbyá-Guaraní, Misiones, Arg.
MB.GU4.M-A2	A2	12	16111T	16223T	16290T	16319A	16362C								Sala et al., 2010	Mbyá-Guaraní, Misiones, Arg.
MB.GU5.M-A2	A2	2	16108T	16111T	16223T	16290T	16319A	16362C							Sala et al., 2010	Mbyá-Guaraní, Misiones, Arg.
MB.GU6.M-B2	B2	8	16183C	16189C	16217C	16241G									Sala et al., 2010	Mbyá-Guaraní, Misiones, Arg.
MB.GU7.M-B2	B2	12	16183C	16189C	16217C										Sala et al., 2010	Mbyá-Guaraní, Misiones, Arg.
MB.GU8.M-B2	B2	1	16182C	16183C	16189C	16217C									Sala et al., 2010	Mbyá-Guaraní, Misiones, Arg.
MB.GU9.M-C1	C1	3	16187T	16223T	16298C	16325C	16327T								Sala et al., 2010	Mbyá-Guaraní, Misiones, Arg.
MB.GU10.M-C	C1	1	16189C	16223T	16298C	16325C	16327T								Sala et al., 2010	Mbyá-Guaraní, Misiones, Arg.
MB.GU11.M-C	C1	1	16051G	16172C	16223T	16298C	16325C	16327T							Sala et al., 2010	Mbyá-Guaraní, Misiones, Arg.
MB.GU12.M-C	C1	1	16223T	16325C	16327T										Sala et al., 2010	Mbyá-Guaraní, Misiones, Arg.
MB.GU13.M-D	D1	39	16223T	16325C	16362C										Sala et al., 2010	Mbyá-Guaraní, Misiones, Arg.
MB.GU14.M-D	D1	2	16189C	16223T	16325C	16362C									Sala et al., 2010	Mbyá-Guaraní, Misiones, Arg.
MB.GU15.M-D	D3	1	16142T	16179T	16223T	16295T	16325C	16362C							Sala et al., 2010	Mbyá-Guaraní, Misiones, Arg.
MB.GU16.M-D	D1	1	16223T	16325C	16362C										Sala et al., 2010	Mbyá-Guaraní, Misiones, Arg.
MB.GU16.M-D	D1	1	16223T	16325C	16362C										Sala et al., 2010	Mbyá-Guaraní, Misiones, Arg.
Mapu1.M-B2	B2	5	16189C	16207G	16217C	16291T									Moraga et al., 2000	Isla Huapi, Valdivia, Chile
Mapu2.M-B2	B2	3	16189C	16207G	16217C	16249C	16291T								Moraga et al., 2000	Isla Huapi, Valdivia, Chile
Mapu4.M-C1	C1	12	16223T	16298C	16325C	16327T									Moraga et al., 2000	Isla Huapi, Valdivia, Chile
Mapu8.M-D1	D1	2	16223T	16241G	16301T	16342C	16362C								Moraga et al., 2000	Isla Huapi, Valdivia, Chile
Mapu9.M-D1	D1	2	16187T	16223T	16325C										Moraga et al., 2000	Isla Huapi, Valdivia, Chile
Mapu11.M-D1	D1	3	16187T	16189C	16223T	16270T	16362C								Moraga et al., 2000	Isla Huapi, Valdivia, Chile

Haplotipo	Asignación de Haplotipo	n	Sitios polimórficos de HVR (16024 a 16365)										Cita Bibliográfica	Filiación
Pun11.M-B4	B4b	1	16182C	16183C	16189C	16193.1C	16217C						Cardoso et al., 2013	Jujuy, Argentina
Pun12.M-B4	B4b	1	16092C	16183C	16189C	16193.1C	16217C						Cardoso et al., 2013	Jujuy, Argentina
Pun13.M-B4	B4b	1	16146G	16183C	16189C	16193.1C	16217C	16218T					Cardoso et al., 2013	Jujuy, Argentina
Pun14.M-B4	B4b	4	16183C	16188T	16189C	16217C							Cardoso et al., 2013	Jujuy, Argentina
Pun15.M-B4	B4b	1	16183C	16189C	16193.1C	16217C	16261T	16319A	16362C				Cardoso et al., 2013	Jujuy, Argentina
Pun16.M-B4	B4b	1	16183C	16189C	16193.1C	16217C	16311C						Cardoso et al., 2013	Jujuy, Argentina
Pun17.M-B4	B4b	1	16126C	16183C	16189C	16193.1C	16217C						Cardoso et al., 2013	Jujuy, Argentina
Pun18.M-B4	B4b	1	16168T	16183C	16189C	16193.1C	16217C	16274A	16301A				Cardoso et al., 2013	Jujuy, Argentina
Pun23.M-B4	B4b@73	1	16183C	16188T	16189C	16193DEL	16217C						Cardoso et al., 2013	Jujuy, Argentina
Pun26.M-C1	C1b	1	16092C	16129A	16223T	16298C	16325C	16327T					Cardoso et al., 2013	Jujuy, Argentina
Pun27.M-C1	C1b	7	16092C	16223T	16249C	16298C	16325C	16327T					Cardoso et al., 2013	Jujuy, Argentina
Pun34.M-D1	D1a2	2	16223T	16293G	16325C	16362C							Cardoso et al., 2013	Jujuy, Argentina
Pun36.M-D1	D1f	3	16142T	16148T	16223T	16278T	16325C	16356C	16362C				Cardoso et al., 2013	Jujuy, Argentina
Map.AG1-B2	B2	2	16189C	16207G	16217C	16291T							Ginther et al., 1993	Anecón Grande, Río Negro, Arg.
Map.AG2-B2	B2	2	16189C	16217C	16294C								Ginther et al., 1993	Anecón Grande, Río Negro, Arg.
Map.AG3-B2	B2	6	16189C	16217C	16319C								Ginther et al., 1993	Anecón Grande, Río Negro, Arg.
Map.AG5-B2	B2	4	16124G	16189C	16217C	16294T							Ginther et al., 1993	Anecón Grande, Río Negro, Arg.
Map.AG6-B2	B2	1	16189C	16217C	16249C								Ginther et al., 1993	Anecón Grande, Río Negro, Arg.
Map.AG7-C1	C1	6	16223T	16298C	16325C	16327T							Ginther et al., 1993	Anecón Grande, Río Negro, Arg.
Map.AG9-C1	C1	1	16189C	16223T	16298C	16325C	16327T						Ginther et al., 1993	Anecón Grande, Río Negro, Arg.
Map.AG10-C	C1	1	16051G	16223T	16298C	16325C	16327T						Ginther et al., 1993	Anecón Grande, Río Negro, Arg.
Map.AG12-D	D1	4	16223T	16242T	16311C	16325C	16362C						Ginther et al., 1993	Anecón Grande, Río Negro, Arg.
Map.AG13-D	D1	3	16187T	16223T	16325C	16362C							Ginther et al., 1993	Anecón Grande, Río Negro, Arg.
Map.AG15-D	D1	1	16187T	16223T	16325C	16390A							Ginther et al., 1993	Anecón Grande, Río Negro, Arg.
Map.AG16-D	D1	1	16189C	16223T	16245T	16270T	16325C	16362C					Ginther et al., 1993	Anecón Grande, Río Negro, Arg.
Map.AG17-D	D1	1	16092C	16187T	16189C	16362C							Ginther et al., 1993	Anecón Grande, Río Negro, Arg.
Map.A618-A2	A2	4	16223T	16290T	16319A	16362C							Ginther et al., 1993	Anecón Grande, Río Negro, Arg.
Map.AG19-A2	A2	2	16223T	16290T	16319A	16362C							Ginther et al., 1993	Anecón Grande, Río Negro, Arg.
Si.Cen1-D1	D1	10	16223T	16325C	16362C								García et al., 2012	Sierras Centrales, Argentina
Si.Cen2-D1	D1	8	16223T	16311C	16325C	16362C							García et al., 2012	Sierras Centrales, Argentina
Si.Cen3-D1	D1	1	16051G	16223T	16311C	16325C	16362C						García et al., 2012	Sierras Centrales, Argentina
Si.Cen4-D1	D1	4	16192T	16223T	16311C	16325C	16362C						García et al., 2012	Sierras Centrales, Argentina
Si.Cen5-D1g	D1g	1	16187T	16223T	16325C	16362C							García et al., 2012	Sierras Centrales, Argentina
Si.Cen6-D1g5	D1g5	1	16092C	16187T	16189C	16209C	16223T	16325C	16362C				García et al., 2012	Sierras Centrales, Argentina
Si.Cen6-D1g5	D1g5	1	16092C	16187T	16189C	16209C	16223T	16325C	16362C				García et al., 2012	Sierras Centrales, Argentina
Si.Cen7-D1g5	D1g5	1	16093C	16187T	16189C	16209C	16223T	16325C	16362C				García et al., 2012	Sierras Centrales, Argentina

Haplotipo	Asignación de Haplotipo	n	Sitios polimórficos de HVR (16024 a 16365)												Cita Bibliográfica	Filial			
			16187T	16189C	16209C	16223T	16325C	16362C	16142T	16179T	16223T	16295T	16325C	16362C					
Si.Cen8-D1g5	D1g5	8	16187T	16189C	16209C	16223T	16325C	16362C									García et al., 2012	Sierras Centrales, Argentina	
Si.Cen9-D1f1	D1f1	1	16142T	16179T	16223T	16295T	16325C	16362C										García et al., 2012	Sierras Centrales, Argentina
Si.Cen10-D1j	D1j	1	16189C	16223T	16242T	16311C	16325C											García et al., 2012	Sierras Centrales, Argentina
Si.Cen11-D1j	D1j	44	16223T	16242T	16311C	16325C	16362C											García et al., 2012	Sierras Centrales, Argentina
Si.Cen12-D1j	D1j	4	16172C	16223T	16242T	16311C	16325C	16362C										García et al., 2012	Sierras Centrales, Argentina
Si.Cen13-D1j	D1j	3	16157C	16223T	16242T	16311C	16325C	16362C										García et al., 2012	Sierras Centrales, Argentina
Si.Cen14-D1j	D1j	1	16083T	16157C	16223T	16242T	16311C	16325C	16362C									García et al., 2012	Sierras Centrales, Argentina
Si.Cen15-D1j	D1j	3	16223T	16286T	16242T	16311C	16325C	16362C										García et al., 2012	Sierras Centrales, Argentina
Si.Cen16-D1	D1	1	16172C	16223T	16325C	16362C												García et al., 2012	Sierras Centrales, Argentina
Si.Cen17-D1	D1	1	16223T	16242T	16248T	16325C	16362C											García et al., 2012	Sierras Centrales, Argentina
Si.Cen18-D1	D1	5	16126C	16223T	16325C	16362C												García et al., 2012	Sierras Centrales, Argentina
Si.Cen19-D1	D1	1	16223T	16362C														García et al., 2012	Sierras Centrales, Argentina
Si.Cen20-D1	D1	1	16154C	16193T	16223T	16325C	16362C											García et al., 2012	Sierras Centrales, Argentina
Si.Cen21-D1	D1	1	16189C	16223T	16325C	16362C												García et al., 2012	Sierras Centrales, Argentina
Si.Cen22-D1	D1	1	16190T	16223T	16325C	16362C												García et al., 2012	Sierras Centrales, Argentina
Si.Cen23-D1	D1	3	16223T	16293G	16325C	16362C												García et al., 2012	Sierras Centrales, Argentina
Si.Cen24-D1	D1	1	16129A	16223T	16325C	16362C												García et al., 2012	Sierras Centrales, Argentina
Tit1.Q-A2	A2	3	16111T	16223T	16290T	16319A	16362C											Barbieri et al., 2011	Quechua, Lago Titicaca, Perú
Tit2.Q-A2	A2	2	16111T	16129A	16223T	16290T	16319A	16362C										Barbieri et al., 2011	Quechua, Lago Titicaca, Perú
Tit3.Q-A2	A4	2	16223T	16290T	16311C	16319A	16362C											Barbieri et al., 2011	Quechua, Lago Titicaca, Perú
Tit4.Q-B2	B4	4	16183C	16189C	16217C													Barbieri et al., 2011	Quechua, Lago Titicaca, Perú
Tit5.Q-B2	B4	7	16183C	16188T	16189C	16217C												Barbieri et al., 2011	Quechua, Lago Titicaca, Perú
Tit6.Q-B2	B2g	3	16183C	16188T	16189C	16217C	16362C											Barbieri et al., 2011	Quechua, Lago Titicaca, Perú
Tit7.Q-B2	B4	1	16182C	16183C	16189C	16217C	16362C											Barbieri et al., 2011	Quechua, Lago Titicaca, Perú
Tit8.Q-B2	B4	1	16183C	16189C	16217C	16242A												Barbieri et al., 2011	Quechua, Lago Titicaca, Perú
Tit9.Q-B2	B4	1	16183C	16189C	16217C	16289G												Barbieri et al., 2011	Quechua, Lago Titicaca, Perú
Tit10.Q-B2	B4	1	16093C	16176T	16183C	16189C	16217C	16274A	16319A	16362C								Barbieri et al., 2011	Quechua, Lago Titicaca, Perú
Tit11.Q-B2	B4	4	16183C	16189C	16217C	16290T												Barbieri et al., 2011	Quechua, Lago Titicaca, Perú
Tit12.Q-B2	B4	1	16182C	16183C	16189C	16217C	16240G											Barbieri et al., 2011	Quechua, Lago Titicaca, Perú
Tit13.Q-B2	B4	1	161096T	16108G	16109C	16183C	16188T	16189C	16217C									Barbieri et al., 2011	Quechua, Lago Titicaca, Perú
Tit14.Q-B2	B4	1	16176T	16183C	16189C	16217C	16274A	16319A	16362C									Barbieri et al., 2011	Quechua, Lago Titicaca, Perú
Tit15.Q-B2	B4	2	16183C	16188T	16189C	16217C	16381C											Barbieri et al., 2011	Quechua, Lago Titicaca, Perú
Tit16.A-B2	B4	1	16183C	16189C	16194C	16217C												Barbieri et al., 2011	Aymará, Lago Titicaca, Perú
Tit17.A-B2	B4	1	16140C	16183C	16189C	16217C												Barbieri et al., 2011	Aymará, Lago Titicaca, Perú
Tit18.A-B2	B4	1	16183C	16188T	16189C	16217C	16354T											Barbieri et al., 2011	Aymará, Lago Titicaca, Perú
Tit19.A-B2	B4	3	16183C	16188T	16189C	16217C	16299G	16379A	16354T									Barbieri et al., 2011	Aymará, Lago Titicaca, Perú

Haplotipo	Asignación de Haplotipo	n	Sitios polimórficos de HVR (16024 a 16365)												Cita Bibliográfica	Filación
			16183C	16189C	16217C	16294T	16183C	16189C	16217C	16294T	16183C	16188T	16189C	16217C		
AT142	B2	1	16183C	16189C	16217C	16294T									de Saint Pierre et al., 2012	Atacameño, Chile
AT176	B2	1	16183C	16189C	16217C	16294T									de Saint Pierre et al., 2012	Atacameño, Chile
AT013	B2	1	16183C	16188T	16189C	16217C									de Saint Pierre et al., 2012	Atacameño, Chile
AT163	B2	1	16183C	16188T	16189C	16217C									de Saint Pierre et al., 2012	Atacameño, Chile
AT053	B2	1	16183C	16188T	16189C	16217C									de Saint Pierre et al., 2012	Atacameño, Chile
AT051	B2	1	16182C	16183C	16189C	16217C									de Saint Pierre et al., 2012	Atacameño, Chile
AT086	B2	1	16183C	16189C	16194G	16195C	16217C	16258G	16270T	16325C	16362C				de Saint Pierre et al., 2012	Atacameño, Chile
AT148	B2	1	16183C	16189C	16194G	16195C	16217C	16258G	16270T	16325C	16362C				de Saint Pierre et al., 2012	Atacameño, Chile
AT103	B2	1	16183C	16189C	16217C										de Saint Pierre et al., 2012	Atacameño, Chile
AT182	B2	1	16183C	16189C	16217C	16218T		16233T	16356C						de Saint Pierre et al., 2012	Atacameño, Chile
AT045	B2	1	16182C	16183C	16189C	16217C	16218T	16278T							de Saint Pierre et al., 2012	Atacameño, Chile
AT162	B2	1	16182C	16183C	16189C	16233T		16357C							de Saint Pierre et al., 2012	Atacameño, Chile
AT171	C1b	1	16223T	16298C	16325C	16327T									de Saint Pierre et al., 2012	Atacameño, Chile
AT137	C1b	1	16157C	16209C	16223T	16298C	16325C	16327T							de Saint Pierre et al., 2012	Atacameño, Chile
AT089	C1b13	1	16131C	16223T	16298C	16325C		16327T							de Saint Pierre et al., 2012	Atacameño, Chile
AT121	D1	1	16223T	16325C	16362C										de Saint Pierre et al., 2012	Atacameño, Chile
AT033	D1j	1	16223T	16242T	16311C	16325C	16362C								de Saint Pierre et al., 2012	Atacameño, Chile

Tabla anexa 3. Comparación entre los métodos de extracción utilizados, su rendimiento y el número de veces realizado.

Muestra	Métodos de extracción de ADN			
	<i>Fenol-Cloroformo - Isoamílico</i>	<i>QIAamp DNA Investigator KIT</i>	<i>GeneClean Kit</i>	<i>EDTA</i>
DC1	Amplificó x 3	no se hizo	no se hizo	no se hizo
DC2	Amplificó x 3	no se hizo	no se hizo	no se hizo
DC3	Amplificó x 3	no se hizo	no se hizo	no se hizo
DC4	Amplificó x 3	no amplificó x 1	no se hizo	no se hizo
DC5	Amplificó x 3	no se hizo	no se hizo	no se hizo
DC6	Amplificó x 3	no amplificó x 1	no se hizo	Amplificó x 1
DC7	Amplificó x 3	Amplificó x 2	no se hizo	Amplificó x 1
DC8	Amplificó x 3	no amplificó x 1	no se hizo	no se hizo
DC9	Amplificó x 3	no se hizo	no se hizo	no se hizo
DC10	Amplificó x 3	no amplificó x 2	Amplifico x 1	no se hizo
DC11	Amplificó x 3	no amplificó x 2	amplifico x 1	no se hizo
DC12	Amplificó x 3	Amplificó x 2	no se hizo	Amplificó x 1
DC13	no amplificó x 2	inhibido	no se hizo	no se hizo
DC14	Amplificó x 3	Amplificó x 2	no se hizo	no se hizo
DC15	no amplificó x 2	inhibido	no se hizo	no se hizo
DC16	Amplificó x 3	Amplificó x 2	no se hizo	no se hizo
DC17	Amplificó x 3	Amplificó x 2	no se hizo	Amplificó x 1
DC18	Amplificó x 3	Amplificó x 2	no se hizo	no se hizo
DC19	Amplificó x 3	Amplificó x 2	no se hizo	no amplificó x 1
DC20	Amplificó x 3	inhibido	no se hizo	no se hizo
DC21	Amplificó x 3	Amplificó x 2	no se hizo	no se hizo
DC22	Amplificó x 3	Amplificó x 2	no se hizo	no amplificó x 1
DC23	Amplificó x 3	Amplificó x 2	no se hizo	Amplificó x 1
DB1	Amplificó x 3	no amplificó x 1	no amplificó x 1	no se hizo
DB2	Amplificó x 3	no amplificó x 1	amplificó x 1	Amplificó x 1
DB3	Amplificó x 3	no amplificó x 1	no amplificó x 1	Amplificó x 1
DB4	Amplificó x 3	no amplificó x 1	no amplificó x 1	Amplificó x 1
DB5	no amplificó x 2	no amplificó x 1	no amplificó x 1	Amplificó x 1
DB6	Amplificó x 3	Amplificó x 1	no amplificó x 1	Amplificó x 1
DB7	Amplificó x 3	Amplificó x 1	no amplificó x 1	Amplificó x 1
DB8	Amplificó x 3	no amplificó x 1	no amplificó x 1	no se hizo
PA8	Amplificó x 2	no amplificó x 1	no se hizo	no amplificó x 1
PA9	Amplificó x 2	no amplificó x 1	no se hizo	no amplificó x 1
Muestra	Fenol-Cloroformo - Isoamílico	QIAamp DNA Investigator KIT	GeneClean Kit	EDTA

PA10	Amplificó x 2	no amplificó x 1	no se hizo	no amplificó x 1
PA11	no amplificó x 1	inhibido	no se hizo	no se hizo
PA12	Amplificó x 2	inhibido	no se hizo	no se hizo
PA13	no amplificó x 1	no amplificó x 1	no se hizo	no amplificó x 1
PA14	Amplificó x 2	no amplificó x 1	no se hizo	no se hizo
PA15	Amplificó x 2	no amplificó x 1	no se hizo	no se hizo
PA16	Amplificó x 2	no amplificó x 1	no se hizo	no se hizo
PA17	Amplificó x 2	no amplificó x 1	no se hizo	no se hizo
PA18	Amplificó x 2	Amplificó x 1	no se hizo	no se hizo
PA19	Amplificó x 2	Amplificó x 1	no se hizo	no se hizo
PA20	Amplificó x 2	no amplificó x 1	no se hizo	no se hizo
PA21	Amplificó x 2	no amplificó x 1	no se hizo	no se hizo
PA22	Amplificó x 2	no amplificó x 1	no se hizo	no se hizo
PA23	Amplificó x 2	no amplificó x 1	no se hizo	no se hizo
PA24	Amplificó x 2	no amplificó x 1	no se hizo	no amplificó x 1
PA25	Amplificó x 2	no amplificó x 1	no se hizo	no amplificó x 1
PA26	Amplificó x 2	no amplificó x 1	no se hizo	no se hizo
PA27	Amplificó x 2	no amplificó x 1	no se hizo	no amplificó x 1
AMZ1	no se hizo	inhibido	no se hizo	no se hizo
AMZ2	no se hizo	no amplificó x 1	no se hizo	Amplificó x 1
RP1	Amplificó x 2	no amplificó x 1	no se hizo	Amplificó x 1
RP2	Amplificó x 2	Amplificó x 1	no se hizo	Amplificó x 1
RP3	Amplificó x 2	inhibido x 1	no se hizo	no amplificó x 1
RP4	Amplificó x 2	Amplificó x 1	no se hizo	Amplificó x 1

El número en cada método de extracción implica la cantidad de veces que se realizó ese protocolo en esa muestra y se obtuvo ese resultado