



**FACULTAD DE
CIENCIAS**

UDELAR | fcien.edu.uy

Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas
(PEDECIBA)

Área Biología – Subárea Genética

Tesis para la obtención del grado de

Magister en Ciencias Biológicas

Lic. Lucía Anza



**PEDECIBA
MEC-UDELAR**

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE RESTOS HUMANOS RECUPERADOS EN SITIOS ARQUEOLÓGICOS DEL OESTE DE URUGUAY

Orientador:

Dr. Gonzalo Figueiro

Departamento de Antropología Biológica, FHCE – Universidad de la República

Co-Orientadora:

Dra. Mónica Sans

Departamento de Antropología Biológica, FHCE – Universidad de la República

Tribunal:

Dr. Bernardo Bertoni

Dra. Laura del Puerto

Dra. Gabriela Russo

Montevideo, 2023

ÍNDICE

Resumen	4
Agradecimientos	6
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. El ADN mitocondrial.....	8
1.1.1. Estructura y variabilidad del ADN mitocondrial	9
1.1.2. Características como marcador genético	11
1.1.3. Variantes del ADN mitocondrial	14
1.2. ADN mitocondrial americano	16
1.3. Consideraciones en el estudio de ADN antiguo y su importancia.....	20
1.4. Antecedentes de ADN antiguo en Uruguay.....	25
1.5. Relación con poblaciones cercanas	27
1.6. Otros marcadores utilizados en restos antiguos	28
2. OBJETIVOS	31
2.1. Objetivo general.....	31
2.2. Objetivos específicos	31
3. HIPÓTESIS	32
4. MATERIALES Y MÉTODOS	33
4.1.Obtención de las muestras	33
4.1.1. Descripción del sitio en estudio.....	33
4.1.2. Individuos analizados.....	36
4.1.2.1. Elección de las piezas.....	36
4.1.2.2. Características de las muestras.....	37
4.2. Metodología de trabajo con ADN antiguo.....	39
4.2.1. Preparación de las muestras.....	40
4.2.2. Extracción de ADN	40
4.2.3. Amplificación de las regiones hipervariables I y II.....	42
4.2.3.1. Desarrollo y síntesis de cebadores específicos.....	42
4.2.3.2. Verificación y purificación de los productos amplificados.....	45
4.3. Análisis de los datos	46
4.3.1. Análisis de las secuencias de las HVR I y II.....	46
4.3.2. Análisis de las secuencias obtenidas por secuenciación masiva	47
4.3.3. Recopilación de secuencias antiguas y modernas de América del Sur	47
4.3.4. Redes de haplotipos y afinidad geográfica	49
4.3.5. Análisis complementarios: marcadores nucleares	50
4.3.5.1. Determinación del sexo mediante el marcador amelogenina.....	51
4.3.5.1.1. Amplificación por PCR de los genes AMELX y AMELY	52
4.3.5.1.2. Estudio de la variante T1540C del gen EDAR.....	53
5. RESULTADOS	54

5.1. Extracción de ADN.	54
5.1.1. Contaminación de las extracciones	57
5.2. Análisis de los datos.....	58
5.2.1. Análisis de las secuencias HVR I y II	58
5.2.1.1. Afinidades geográficas.....	58
5.2.2. Análisis de las secuencias mitocondriales completas.....	65
5.2.3. Análisis complementarios: marcadores nucleares	72
5.2.3.1. Determinación del sexo mediante el marcador amelogenina.....	72
5.2.3.2. Estudio de la variante T1540C del gen EDAR.....	74
6. DISCUSIÓN.....	76
6.1. Rendimiento de las extracciones de ADN.....	76
6.1.1. Eficiencia del material de partida	78
6.1.2. Degradación del ADN en las muestras analizadas	80
6.1.3. Contaminación de las extracciones	81
6.2. Análisis de los datos.....	85
6.2.1. Secuencias HVR I y II	85
6.2.2. Secuencias mitocondriales completas.....	86
6.2.3. Afinidades geográficas.....	86
6.2.4. Análisis complementarios: marcadores nucleares	92
6.2.4.1. Determinación del sexo mediante el marcador amelogenina.....	93
6.2.4.2. Estudio de la variante T1540C del gen EDAR.....	93
7. CONSIDERACIONES FINALES Y PERSPECTIVAS	95
7.1. Consideraciones finales	95
7.2. Perspectivas a futuro	96
8. BIBLIOGRAFÍA.....	98
9. ANEXO	121

RESUMEN

El estudio del ADN antiguo ha permitido dilucidar las relaciones evolutivas entre formas de vida pasadas y modernas, destacándose como tópicos centrales el origen de las poblaciones humanas modernas y la reconstrucción de la historia genética de las poblaciones junto con los procesos evolutivos que incidieron sobre las mismas. En Uruguay, el análisis del ADN antiguo de restos humanos ha permitido asignar a los individuos estudiados haplogrupos y linajes específicos y relacionarlos con los procesos de poblamiento humano del continente. En la región oeste del país, del sitio Colonia Concordia (departamento de Soriano), se han recuperado unos 50 restos de individuos indígenas, que se encuentran actualmente en colecciones de museos. Este sitio presenta la serie esquelética de mayor tamaño y mejor estado de conservación del litoral oeste, por lo que su análisis constituye una oportunidad de conocer la variabilidad genética de las poblaciones de esta región, sus vinculaciones con poblaciones vecinas, y las relaciones de parentesco entre los individuos enterrados en el sitio.

En la presente Tesis, se colectaron muestras de restos humanos correspondientes a 17 individuos enterrados en el sitio Colonia Concordia presentes en colecciones de museo. Se extrajo ADN de estas muestras y se amplificaron las regiones hipervariables I y II del genoma mitocondrial mediante PCR en tiempo final. Los productos obtenidos fueron secuenciados y comparados con bases de datos para determinar el haplogrupo mitocondrial correspondiente. Adicionalmente, se analizó el ADN obtenido por secuenciación masiva de un individuo de Colonia Concordia y otro del sitio Campo Morgan, en el departamento de Río Negro. Se construyeron bases de datos con secuencias de diversas poblaciones tanto antiguas como modernas de Sudamérica para la realización de análisis comparativos.

En las muestras extraídas y analizadas en la Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación se obtuvo una tasa de éxito de las extracciones y la identificación de ADN antiguo endógeno muy baja (11,8%), relacionada al ambiente donde fueron colectadas las muestras y su antigüedad, así como a su manipulación y permanencia por largo tiempo en

las colecciones. Las secuencias obtenidas se identificaron como pertenecientes al haplogrupo A2 y al subhaplogrupo C1d. En el análisis, a dichas secuencias se les suman las dos muestras obtenidas por secuenciación masiva, ambas pertenecientes al subhaplogrupo C1b. Los estudios comparativos para estos cuatro individuos señalaron una cercanía con secuencias del actual territorio argentino, y una ausencia de similitud con poblaciones de Brasil. Se destaca que estos individuos presentaron linajes particulares no encontrados en otras poblaciones antiguas o modernas.

Estudios posteriores con genomas mitocondriales completos permitirán aumentar la resolución y la designación de los mismos a linajes específicos para aportar información sobre el poblamiento de la región oeste de Uruguay.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecerles a mis tutores, el Dr. Gonzalo Figueiro y la Dra. Mónica Sans por aceptarme en el laboratorio viniendo de otra institución y permitirme hacer lo que tanto me gusta que es estudiar (o al menos intentar) ADN de restos antiguos. Estoy eternamente agradecida por esta oportunidad, por sus inmensos aportes tanto en este trabajo como en la parte más administrativa de mi maestría.

También quisiera agradecerles a los miembros del Tribunal los Dres. Bernardo Bertoni, Laura del Puerto y Gabriela Russo por haber aceptado formar parte del mismo, por su disposición para leer y corregir la presente Tesis.

Un agradecimiento particular para Patricia Mut (FHCE - Udelar) y Thomaz Pinotti (Universidad de Copenhague) por las secuencias mitocondriales completas analizadas en este trabajo.

Esta Tesis fue financiada por la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) y parcialmente por Comisión Académica de Posgrado (CAP - Udelar), por lo cual estoy enormemente agradecida.

Muchas gracias a mis amigos de Fcien que han estado en todo el proceso, por su consuelo y paciencia. A mis amigas de toda la vida por ser un cable a tierra.

Hacia mis padres porque siempre me han orientado a que siga estudiando, a pesar de que quise cambiar de rumbo y me caí muchas veces en el proceso. A mi hermana por darme una mano en momentos difíciles. Y en especial a mis bebés felinos: Mimo, Phelps y la pequeña Amy, porque los tres estuvieron siempre acompañándome durante las largas horas frente a la computadora leyendo, escribiendo y desvelándome.

Mis agradecimientos a todos por su contribución desde distintas maneras a la realización y conclusión de esta Tesis.

1. INTRODUCCIÓN

Desde la mitad del siglo XX un gran número de trabajos, utilizando marcadores clásicos como grupos sanguíneos y polimorfismos de enzimas, han podido determinar el origen asiático de los primeros pobladores de las Américas (Crawford, 1998; O'Rourke, 2006). La evidencia reciente señala que los primeros humanos en llegar al continente americano se dispersaron de una población que vivió en aislamiento genético por miles de años en Beringia, una plataforma de tierra entre Alaska y Eurasia. El aumento de la temperatura y descenso del nivel del mar hacia el final del Pleistoceno permitiría el acceso a las Américas a través de un corredor libre de hielo por tierra y por la costa Pacífica (Waters, 2019). La colonización inicial habría estado caracterizada por un cuello de botella muy pronunciado resultando en un pequeño número de fundadores (Raff et al., 2011). Tanto las investigaciones arqueológicas como los estudios de diversidad genética en poblaciones humanas modernas indican una colonización inicial de las Américas algún tiempo antes de los 15.000 años antes del presente (Raff et al., 2011).

Mediante la utilización de secuencias de ADN mitocondrial (ADNmt), cromosoma Y y marcadores autosómicos se ha ido obteniendo un mayor poder de resolución en la confirmación del origen euroasiático de los indígenas americanos y en las estimaciones del momento del ingreso de los primeros pobladores al continente americano (O'Rourke & Raff, 2010).

Con el desarrollo de nuevos métodos de genética molecular se hizo posible la obtención de ADN de muestras antiguas y la caracterización de patrones de variación genética en la prehistoria (Raff et al., 2010). No puede dejarse de mencionar que el trabajo con muestras antiguas presenta ciertas dificultades, empezando por la descomposición espontánea que ocurre en todas las macromoléculas biológicas (Lindahl, 1993). Otro factor es la incidencia del ambiente en el cual se preservó el resto biológico (Seersholm et al., 2021). Así, el éxito en la obtención de ADN es en gran medida dependiente del estado de preservación biomolecular (Seersholm et al., 2021). Sin

embargo, los estudios de ADN antiguo en poblaciones del Cono Sur de América del Sur son de particular interés, ya que es el área más distante de Beringia, por lo cual correspondería a las últimas fases del poblamiento americano (de Saint Pierre et al., 2012a).

1.1. EL ADN MITOCONDRIAL

La mitocondria es un orgánulo celular involucrado en muchas vías metabólicas pero su principal función es la generación de la mayoría de la energía celular, en forma de moléculas de adenosín trifosfato (ATP), a través del sistema de fosforilación oxidativa (Fernández-Silva et al., 2003). Además, las mitocondrias juegan un papel importante en la apoptosis, participan en la transducción de señales para la proliferación celular y en el metabolismo de aminoácidos, lípidos, colesterol, esteroides y nucleótidos, entre otras funciones (Chinnery, 2006).

Con respecto a su origen evolutivo, la hipótesis más establecida y aceptada es que las mitocondrias derivan de una alfa-proteobacteria aeróbica, metabolizadora de oxígeno, que ingresó como un endosimbionte al ancestro de las células eucariotas, que habría sido anaeróbica. Esto ocurriría hace aproximadamente dos mil millones de años, en el correr de la transición a una atmósfera oxidante, produciéndose desde allí la evolución a las actuales células eucariotas (Sagan, 1967).

La existencia en la célula de un elemento genético citoplasmático, diferente del núcleo, se propuso por primera vez a fines de la década de 1940 después de la descripción de mutantes de levadura que mostraban defectos respiratorios transmisibles a través de un factor citoplasmático (Ephrussi et al., 1949). No fue hasta muchos años más tarde que el ADNmt se descubrió visualizándose por primera vez en células de pollo mediante microscopía electrónica en la década de 1960 (Nass & Nass, 1963). Desde entonces se ha obtenido una imagen detallada de su estructura, contenido genético y modo de expresión, y se fue dilucidando su variabilidad y su modo de herencia en diferentes grupos de organismos.

1.1.1. ESTRUCTURA Y VARIABILIDAD DEL ADN MITOCONDRIAL

Aunque el ADNmt es bastante diverso en el dominio eucariota, la organización del genoma mitocondrial de los mamíferos se conserva significativamente (Fernández-Silva et al., 2003). Entre estos, el ADNmt humano es una molécula doble hebra, circular, de un tamaño aproximado de 16569 pb (pares de bases) (Figura 1). Las dos cadenas de ADNmt pueden distinguirse por su diferente composición de bases. Debido a que una de ellas es rica en guaninas, pueden separarse por densidad en gradientes desnaturizantes, dando una cadena pesada o H y una cadena ligera o L (Fernández-Silva et al., 2003).

La numeración de las posiciones nucleotídicas del genoma mitocondrial humano, por convención, se describen de acuerdo a la Secuencia de Referencia de Cambridge (CRS, por sus siglas en inglés, Anderson et al., 1981), que constituye la primera secuencia humana completa y su versión posterior revisada y corregida por Andrews et al. (1999), conocida como rCRS. La posición número uno fue designada arbitrariamente dentro de la hebra L en la región control y continúa a partir de esa posición a lo largo de toda la molécula (Anderson et al., 1981; Andrews et al., 1999).

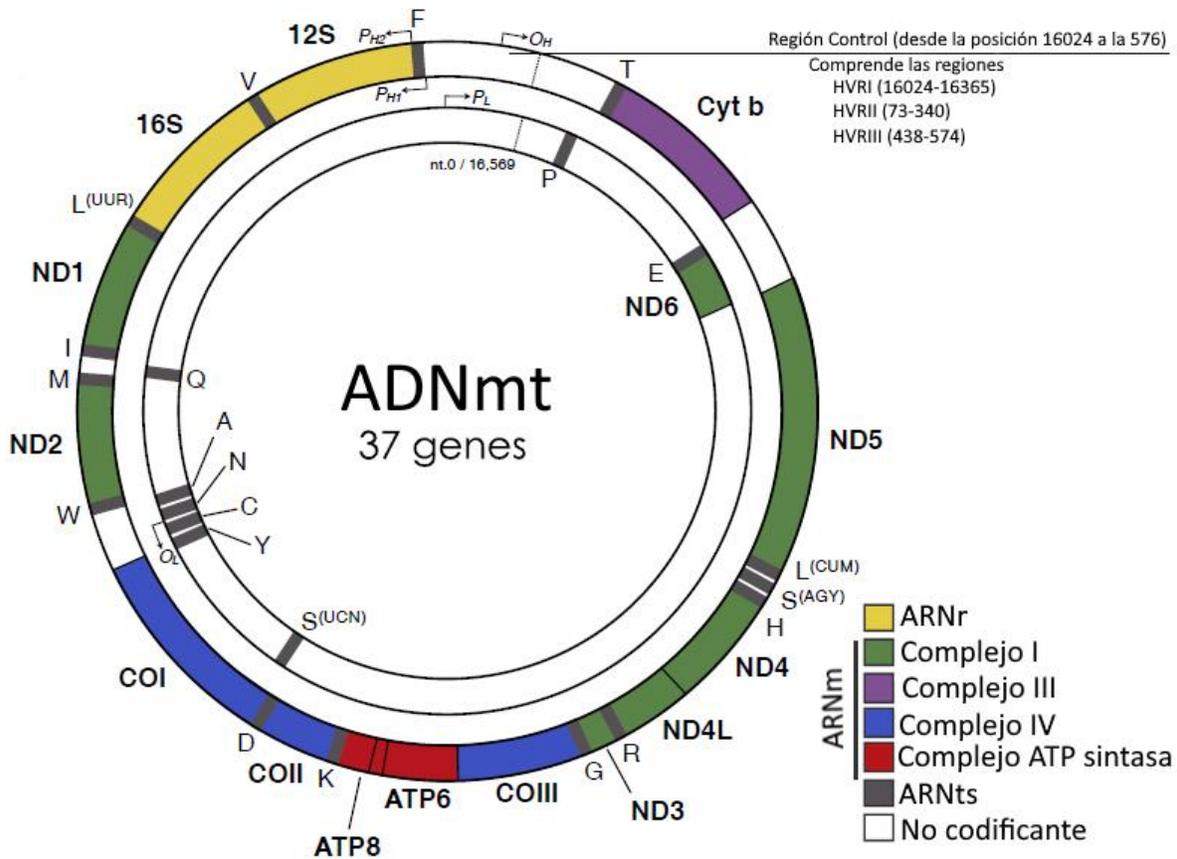


Fig. 1. Representación de la molécula de ADN mitocondrial. Se indica la estructura genética y las posiciones nucleotídicas correspondientes. El círculo interior representa la hebra L (ligera), mientras que el externo representa la hebra H (pesada) del ADN mitocondrial. P_{H1} , P_{H2} y P_L indican los puntos de iniciación de la transcripción para las hebras H y L, respectivamente. O_H y O_L representan los orígenes de replicación para las hebras H y L, respectivamente. Las flechas indican la dirección de transcripción y replicación. Los genes que codifican las subunidades de los complejos del sistema de fosforilación oxidativa aparecen en violeta, verde, azul y rojo. ND1 a ND6 más ND4L son genes que codifican las subunidades del Complejo I, Cyt b es un gen que codifica para la subunidad del Complejo III, COI-COIII son genes que codifican las subunidades catalíticas del Complejo IV, ATP6, ATP8, son genes que codifican las subunidades del Complejo ATP sintasa. Los genes de ARN ribosomal figuran en amarillo (ARNr 12S y 16S) y los 22 genes de ARN de transferencia en gris, nombrados mediante una sola letra utilizando el código estándar para aminoácidos. Además, se señala la región control y las regiones hipervariables que la componen. Adaptado de Amorim et al. (2019).

En cuanto a su contenido genético, el ADNmt incluye dos genes de ARN ribosomal llamados ARNr 12S y 16S, 22 genes de ARN de transferencia (ARNt); y 13 genes que codifican para polipéptidos que son subunidades de cuatro complejos del sistema de

fosforilación oxidativa (Fernández-Silva et al., 2003; Figura 1). La mayoría de las secuencias son únicas, es decir, no son repetitivas, presenta pocas secuencias intergénicas y no posee intrones. Los genes de ARNt se distribuyen regularmente entre los otros genes, interviniendo en el procesamiento de ARN (Fernández-Silva et al., 2003).

Además de las secuencias codificantes, el genoma mitocondrial presenta dos regiones no codificantes que contienen la mayoría de los elementos regulatorios (Fernández-Silva et al., 2003). La región principal, denominada región control o bucle de desplazamiento (D-loop), tiene aproximadamente 1.1 kb de largo y contiene las principales secuencias reguladoras para la transcripción e iniciación de la replicación del ADNmt (Fernández-Silva et al., 2003). En una célula metabólicamente activa esta región forma una estructura de triple cadena constituida por la incorporación de un segmento naciente de ADN de la cadena H de unos 680 pb que permanece alineado a la hebra L parental (Amorim et al., 2019; Fernández-Silva et al., 2003). Esta región también es la más variable en secuencia y tamaño entre las diferentes especies (Fernández-Silva et al., 2003). En humanos, la región control se extiende entre las posiciones 16024-16569 y 1-576 (van Oven & Kayser, 2009).

Dentro de esta región se destacan tres secuencias altamente variables, denominadas como Región Hipervariable I (HVR I) que se extiende desde la posición 16024 a la 16365, Región Hipervariable II (HVR II), entre las posiciones 73 y 340, y la Región Hipervariable III (HVR III), entre las posiciones 438 y 574 (Figura 1; Lutz et al., 2000).

1.1.2. CARACTERÍSTICAS COMO MARCADOR GENÉTICO

Los estudios en el campo de la genética mitocondrial han destacado una serie de peculiaridades que lo diferencian del genoma nuclear, y muchas de ellas lo convierten en un marcador adecuado y fácil de utilizar para estudios genéticos.

En primer lugar, el ADNmt se encuentra en un alto número de copias en muchos tejidos. En los mamíferos, las células somáticas pueden llegar a contener hasta 1000

mitocondrias y, a su vez, cada mitocondria presenta varias (de dos a diez) copias de ADNmt (Amorim et al., 2019), mientras que de ADN nuclear solamente presentan dos copias. Esta propiedad, junto con la ubicación extranuclear y citoplasmática, permiten la obtención de un mayor número de copias en una extracción, lo que facilita la amplificación del ADNmt en comparación con las secuencias nucleares (Pakendorf & Stoneking, 2005). Esta característica hace que el ADNmt sea preferentemente utilizado en los casos en el que el material genético de partida es escaso o está muy degradado, como se encuentra en restos fósiles o arqueológicos, material de museo o muestras biológicas obtenidas de forma no invasiva, como pueden ser pelos, fecas o restos de animales muertos.

En animales superiores, el ADNmt muestra un patrón de herencia materna y es haploide, a diferencia del ADN nuclear que presenta herencia biparental y en células somáticas es diploide. Si bien el espermatozoide contiene mitocondrias en la región de la pieza intermedia y en el flagelo, el ADNmt paterno casi nunca se transmite a la progenie (Amorim et al., 2019). Esto se debe a que existe una regulación negativa significativa del número de copias de ADNmt durante la espermatogénesis, además de un mecanismo dependiente de ubiquitina que degrada las mitocondrias del espermatozoide después de la fecundación (Gustafsson et al., 2016). Sin embargo, se han reportado casos de herencia biparental en los últimos años. Por ejemplo, en un estudio reciente confirmaron la transmisión de ADNmt biparental en 17 individuos de tres familias no relacionadas (Luo et al., 2018).

En general todas las copias de ADNmt son idénticas, una condición conocida como homoplasmia. Sin embargo, debido a la transmisión de ADNmt paterno o si ocurren y se mantienen mutaciones *de novo* en su secuencia, puede dar lugar a la condición de heteroplasmia (Fernández-Silva et al., 2003), en donde hay una mezcla de dos o más tipos diferentes de genoma mitocondrial (Weissensteiner et al., 2021). La distribución aleatoria de las mitocondrias durante la división celular puede llevar a diferentes niveles de

heteroplasmia e incluso homoplasmia en diferentes linajes celulares (Fernández-Silva et al., 2003). Se estima que alrededor del 14% de la población tiene un segundo tipo de ADNmt en una frecuencia de al menos 1%, siendo bastante probable, considerando el número de ADNmt en el cuerpo de una persona, que todos seamos portadoras de más de un tipo de ADNmt (Pakendorf & Stoneking, 2005). Sin embargo, la baja frecuencia de heteroplasmia indica la existencia de un mecanismo que reduce el número de mitocondrias en la ovogénesis temprana (Pakendorf & Stoneking, 2005).

A diferencia del ADN nuclear, el ADNmt en la mayoría de los animales no recombina, por lo que el genoma mitocondrial heredado de la madre es de tipo clonal, es decir, la descendencia generalmente tendrá, excepto por mutación, exactamente el mismo genoma mitocondrial que su madre (Amorim et al., 2019). Esto significa que los linajes mitocondriales se pueden identificar de una manera mucho más directa que los linajes nucleares que, en especies que se reproducen sexualmente, agrupan continuamente genes de dos individuos y se someten a recombinación (Pakendorf & Stoneking, 2005). La herencia monoclonal del ADNmt permite que estos linajes individuales puedan ser rastreados en el tiempo y el espacio con relativa facilidad, por estos motivos las secuencias de ADNmt se usan comúnmente en estudios de filogeografía (Galtier et al., 2009). Esta propiedad junto con su naturaleza haploide permite que la deriva génica y los eventos fundadores tengan un rol más significativo en la extinción estocástica y la fijación de linajes de ADNmt en contraste con los genes nucleares (Torrioni et al., 1993).

En humanos, la secuencia de ADNmt es altamente variable, presentando los genes mitocondriales unas diez veces más variación en comparación con los genes codificantes nucleares (Ruiz-Pesini & Wallace, 2006). Esto se explica por una tasa de evolución del ADNmt mucho más rápida que la del genoma nuclear, lo que define su gran utilidad para estudios de alta resolución de los procesos evolutivos (Brown et al., 1979). Se ha estimado una tasa de sustitución nucleotídica promedio para toda la molécula de ADNmt de

aproximadamente $1,67 \times 10^{-8}$ sustituciones por nucleótido y año, o una mutación cada 3.624 años (Soares et al., 2009). Varias razones se han postulado para explicar la elevada tasa mutacional (Brown et al., 1979; Fernández-Silva et al., 2003; Pinz & Bogenhagen, 1998). Primero, el ADNmt está menos protegido por proteínas por lo cual está más expuesto al daño causado por radicales libres resultantes del metabolismo oxidativo. Segundo, la mitocondria posee mecanismos de reparación menos eficientes que el núcleo y una ADNmt polimerasa de baja fidelidad. Finalmente, también ocurren más eventos de replicación del ADNmt que del nuclear dentro de las líneas celulares. Por estos motivos, se acumulan más cambios en su secuencia en comparación con genes nucleares.

A su vez, dentro de la misma molécula existen diferencias en la tasa de mutación: en general en la región control es diez veces más alta que en la región codificante (van Oven & Kayser, 2009). Esto se explica debido a que la selección purificadora elimina las mutaciones deletéreas que ocurren en los genes que son esenciales para la supervivencia del individuo, sin embargo, la región control, al ser una secuencia no codificante, acumula más mutaciones (van Oven & Kayser, 2009). También existen variaciones en las tasas de mutación entre diferentes posiciones nucleotídicas dentro de la región control, encontrándose sitios *hot spots*, como las posiciones 146, 150, 152, 195, 16189, 16311, 16362 y 16519 (van Oven & Kayser, 2009).

1.1.3. VARIANTES DEL ADN MITOCONDRIAL

La variación en las secuencias de ADNmt es debida a la acumulación de mutaciones a lo largo de los linajes heredados matrilinealmente (van Oven & Kayser, 2009). La presencia de diferentes variantes de secuencias ha establecido diferentes niveles de agrupación en base a un conjunto definido de mutaciones que se relacionan filogenéticamente. En el presente trabajo se utilizó una terminología basada en Kemp & Schurr (2010) y Raff et al. (2011). El grupo más abarcativo lo constituyen los “haplogrupos”, definidos como un grupo de ADNmts que presentan polimorfismos específicos que se heredan ligados y que son definidos tanto para la región codificante

como para las regiones hipervariables. Los haplogrupos se denominan con letras mayúsculas del alfabeto latino, como por ejemplo A, B, C y D utilizados en Torroni et al. (1992); posteriormente las variantes americanas asignadas fueron A2, B2, C1 y D1 (Bandelt et al., 2003). La siguiente subdivisión de este grupo la constituyen los “subhaplogrupos”, estos refieren a aquellas secuencias que contienen mutaciones adicionales a las que definen cada haplogrupo. En cuanto a la nomenclatura de los subhaplogrupos, se les adiciona números y letras en minúscula alternados, por ejemplo A2a, C1d, D4h3. Dentro de este subconjunto, encontramos diferentes “haplotipos” que contienen una o más mutaciones además de las mutaciones que definen a los subhaplogrupos y haplogrupos, y que corresponden a linajes locales o individuales. Los haplotipos se describen utilizando también la alternancia de letras y números, por ejemplo C1d1b2.

Se asume que todas las variaciones del ADNmt humano descienden de un único linaje surgido en África alrededor de 200.000 años antes del presente (Ruiz-Pesini & Wallace, 2006; van Oven & Kayser, 2009), representado como “Eva” (Figura 2). De este haplotipo derivan cuatro ramas: L0, L1, L2 y L3, que constituyen haplogrupos específicos de África Sub-sahariana (Ruiz-Pesini & Wallace, 2006). Del linaje L3, en el noreste de África, irradian otros dos haplogrupos, M y N, aproximadamente hace 65.000 – 71.000 años (Cabrera et al., 2018; Ruiz-Pesini & Wallace, 2006). Únicamente estos dos linajes abandonaron África para extenderse hacia la región templada de Eurasia (Ruiz-Pesini & Wallace, 2006). El haplogrupo N dio origen a todos los haplogrupos mitocondriales europeos: H, I, J, T, U, K, V, W y X. A partir de los haplogrupos tanto M como N surgen los linajes específicos de Asia, y de estos sólo tres linajes (A, C y D) colonizaron el noreste de Siberia y todo el continente americano una vez que aparece la actualmente sumergida plataforma terrestre de Beringia (Ruiz-Pesini & Wallace, 2006). Durante eventos de migraciones posteriores, el haplogrupo X coloniza América del Norte y el haplogrupo B alcanza las zonas templadas y tropicales de América del Norte, Central y del Sur (Ruiz-Pesini & Wallace, 2006).



Fig. 2. Región de origen de los haplogrupos mitocondriales y la subsecuente expansión hacia el resto de los continentes. “EVA” corresponde al haplogrupo original africano del cual derivan todos los linajes mitocondriales. Figura tomada de Figueiro et al. (2021).

1.2. ADN MITOCONDRIAL AMERICANO

Estudios tempranos de la variabilidad de ADNmt a través de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), una delección de 9 pares de bases y la secuencia de la HVR I (Brown et al., 1998; Forster et al., 1996; Schurr et al., 1990; Torroni et al., 1993) de nativos americanos revelaron que estas poblaciones derivan únicamente de cinco haplogrupos independientes de ADNmt: A, B, C, D y X (Kemp et al., 2007; O’Rourke & Raff, 2010). Las mutaciones que definen los haplogrupos de nativos americanos se encuentran en la Tabla 1.

Estos linajes indican que la población fundadora habría experimentado un significativo cuello de botella genético, lo que explica el bajo número de haplogrupos encontrado y la diversidad mitocondrial reducida de los nativos americanos, en comparación con la encontrada en otros continentes (O’Rourke & Raff, 2010; Waters,

2019). La limitada diversidad genética también fue observada en la variabilidad del cromosoma Y, encontrándose únicamente dos linajes: haplogrupos C y Q (O'Rourke & Raff, 2010; Waters, 2019). El evento de reducción poblacional también ha sido evidenciado a escala genómica (Skoglund & Reich, 2016).

Tabla 1. Polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) que definen linajes de ADN mitocondrial nativo americano. Modificado de O'Rourke & Raff (2010).

Variantes	SNPs HVR I	SNPs HVR II	SNPs región codificante
A	16290, 16319	235	663, 1736, 4248, 4824, 8794
A2	16111, 16362	146, 153	8027, 12007
A2a	16192		3330
A2b	16265		11365
B	16189		8281-8289d
B4	16217		
B4b		499	827, 4820, 13590, 15535
B2			3547, 4977, 6473, 9950, 11177
X	16189, 16278	153	6221, 6371, 13966, 14470
X2		195	1719
X2a	16213	200	8913, 12397, 14502
C	16327	249d	3552A, 9545, 11914, 13263, 14318
C1	16298, 16325	290-291d	
C1b		493	
C1c			1888, 15930
C1d	16051		7697
C4			2232A, 6026, 11969, 15204
C4c	16245		11440, 13368, 14433, 15148
D	16362		4883, 5178A

D4			3010, 8414, 14668
D4h3	16301, 16342	152	3396, 3644, 5048
D1	16325		2092
D2	16129, 16271		3316, 7493, 8703, 9536, 11215
D2a			11959
D4b1	16319		8020, 10181, 15440, 15951

El número de los SNPs refiere a la posición nucleotídica con respecto a la secuencia de referencia revisada de Cambridge (rCRS; Andrews et al., 1999).

Los estudios iniciales de ADNmt indicaron que los primeros pobladores de América derivan de poblaciones asiáticas, debido a los polimorfismos compartidos entre nativos americanos y asiáticos (Schurr et al., 1990; Torroni et al., 1993; Wallace et al., 1985). Análisis de genomas completos posteriormente han señalado que la población ancestral de nativos americanos se originó en Eurasia, separándose de poblaciones asiáticas del este hace 36.000 años atrás y con las cuales se mantuvo el flujo génico hasta hace 25.000 años atrás (Waters, 2019). También existiría flujo génico con poblaciones ancestrales de Siberia de ancestría euroasiática, hasta hace aproximadamente 25.000 – 20.000 años (Waters, 2019). La población que daría origen a los primeros pobladores de América habría estado en aislamiento genético de las poblaciones asiáticas durante su estancia en Beringia para luego avanzar hacia el sur una vez que las capas de hielo que rodeaban el área se derritieron hacia el final del último máximo glacial, durante el Pleistoceno tardío (Raff et al., 2011; Skoglund & Reich, 2016; Tamm et al., 2007).

Las primeras hipótesis sobre el poblamiento de América habían señalado a la cultura indígena Clovis como los primeros pobladores. Esta cultura se desarrolló en América del Norte y está caracterizada por una tecnología de punta de proyectil acanalada asociados en sus sitios arqueológicos con restos de megafauna del Pleistoceno (Heintzman et al., 2016). Los sitios hallados fueron datados aproximadamente entre 13.000 y 12.700 años radiocarbónicos antes del presente, y considerado como fecha de la primera

dispersión humana hacia América (Waters, 2019). Posteriormente, diversas fuentes de evidencia revelaron ocupaciones previas a los Clovis. A través de análisis de genomas mitocondriales completos se ha estimado la llegada de los primeros pobladores al continente americano hace aproximadamente 16.000 años (Llamas et al., 2016), lo cual está en acuerdo con la evidencia arqueológica que data sitios en América del Norte desde aproximadamente 15.500 años atrás y para América del Sur, 14.200 años (Waters, 2019).

Dentro de las hipótesis más aceptadas, se han postulado dos posibles rutas de entrada al continente americano desde Beringia: por tierra o bordeando la costa (de Saint Pierre et al., 2012a; Waters, 2019). La hipótesis que considera el primer poblamiento a través de la costa pacífica es la más soportada por la información cronológica, ya que esa ruta habría empezado a estar disponible hace aproximadamente 16.000 años (Waters, 2019). Además, mediante estudios filogeográficos utilizando ADNmt antiguo de bisonte, se presentó evidencia del tiempo de dispersión de los mismos a través del corredor terrestre entre Beringia y el interior de Norteamérica, determinándose que pudo ser totalmente habitable a partir de 13.000 años antes del presente (Heintzman et al., 2016). Probablemente esta ruta pacífica es la más importante para el poblamiento a lo largo de todo el continente americano, mientras que el corredor postglacial tendría un impacto más significativo en la región norte de América del Norte (de Saint Pierre et al., 2012a).

En cuanto al poblamiento de Sudamérica, dado que las poblaciones del Este presentan bajos niveles de heterocigosidad, se ha propuesto una rápida colonización inicial de la parte oeste de América del Sur, llegando a través de la costa Pacífica, para luego poblar la región este del Cono Sur (de Saint Pierre et al., 2012a; Moreno-Mayar et al., 2018). Se ha considerado una rápida radiación en diferentes poblaciones dada a la presencia de polimorfismos específicos de haplotipos nativos americanos restringidos a ciertas localidades geográficas (Torroni et al., 1993). A medida que avanzaron en el continente, procesos microevolutivos como la deriva genética fueron actuando y estructuraron la distribución genética en diferentes proporciones a lo largo del territorio,

y como consecuencia fueron apareciendo linajes asociados a determinadas regiones geográficas (Cardozo et al., 2021; de Saint Pierre et al., 2012a; Perego et al., 2010).

A través de la secuenciación de genomas mitocondriales completos, y, por lo tanto, debido al aumento de la resolución en la variación mitocondrial, se han detectado 16 haplogrupos y subhaplogrupos amerindios fundadores (de Saint Pierre et al., 2012a). Entre ellos, A2, B2, C1b, C1c, C1d, C1d1, C4c, D1 y D4h3a se encuentran distribuidos a lo largo de todo el continente americano, mientras que los restantes: A2a, A2b, D2a, D3, D4e1, X2a y X2g muestran una distribución restringida a Norteamérica (Cardozo et al., 2021; de Saint Pierre et al., 2012a; Kashani et al., 2012; Perego et al., 2010).

El estudio de ADN en restos arqueológicos es imprescindible para detectar la presencia de linajes nativos americanos así como su relación filogenética y la estructura filogeográfica de las poblaciones que de otra manera sería indetectable. Por ejemplo, en el análisis realizado sobre dos individuos de 5.000 años de antigüedad de la Columbia Británica se detectó el haplogrupo asiático M que no había sido hallado en poblaciones antiguas de América y tampoco en las actuales (Malhi et al., 2007). Otro ejemplo es en el sitio arqueológico Yana en Siberia, que, mediante el análisis de ADN de piezas dentales, se descartó su relación con los nativos americanos (Sikora et al., 2019). Por lo tanto, el análisis de ADN antiguo es la más adecuada fuente de información para estudiar los movimientos poblacionales en el pasado y los eventos microevolutivos que definieron a las poblaciones durante el poblamiento de América (Kemp et al., 2007; Raff et al., 2011).

1.3. CONSIDERACIONES EN EL ESTUDIO DE ADN ANTIGUO Y SU IMPORTANCIA

Se denomina “ADN antiguo” a aquellos fragmentos de ADN extraídos de material biológico preservado o fosilizado (Brown & Brown, 1994), como son las muestras de ejemplares de museo, restos arqueológicos y restos paleontológicos. Los trabajos pioneros que demostraron la existencia de ADN en este tipo de material se remontan a la década de 1980, empleando técnicas de clonado. El primer trabajo fue realizado por

Higuchi et al. (1984), donde lograron extraer y clonar un fragmento de 229 pb de ADN mitocondrial de la piel de un ejemplar de museo de unos 140 años de antigüedad. Este ejemplar correspondía a una especie denominada quagga (*Equus quagga quagga*), un mamífero extinto emparentado con las cebras (Higuchi et al., 1984). El segundo trabajo exitoso en esta temática fue el realizado por Pääbo (1985), donde se logró extraer y clonar un fragmento de ADN que presentaba una secuencia de un repetido *Alu* de una momia egipcia datada en unos 2.400 años de antigüedad. Sin embargo, no fue hasta el desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*, PCR) (Mullis et al., 1986; Saiki et al., 1988) que se produjo un incremento de la eficacia en la obtención de fragmentos de ADN antiguo, ya que esta técnica permite aumentar el número de copias de un fragmento a partir de pocas o incluso una copia única del ADN original (Pääbo et al., 2004). Desde entonces, han surgido otros trabajos donde se descubrió la posibilidad de amplificar ADN antiguo proveniente de tejidos duros preservados, como huesos y dientes (e.g. Hagelberg et al., 1989; Hänni et al., 1990; Horai et al., 1989). Otro de los trabajos que también se destaca en el estudio de ADN antiguo, es el realizado por Krings et al. (1997), en el cual se lograron obtener las primeras secuencias de ADNmt de Neandertal, siendo también las primeras secuencias obtenidas de un homínido extinto.

Sin embargo, el trabajo con ADN antiguo presenta dificultades debido a que frecuentemente la molécula se encuentra dañada tanto física como químicamente, lo cual limita la información que puede ser obtenida (Brown & Brown, 1994). Además, generalmente sólo se puede obtener una pequeña fracción del ADN endógeno presente en la muestra (Höss et al., 1996).

Naturalmente el ADN se encuentra sometido a varios factores que alteran su estabilidad química, siendo las causas más frecuentes los daños causados por hidrólisis y por oxidación de la cadena (Höss et al., 1996). Uno de los daños producidos por hidrólisis es la ruptura del enlace N-glicosídico entre el azúcar y la base nitrogenada, resultando en la liberación de esta última (Lindahl, 1993). Dentro de este tipo de daño, el evento más frecuente es la pérdida de purinas o depurinación, que ocurre en tasas más altas que la

pérdida de pirimidinas (Lindahl, 1993). En el sitio libre de base (sitio apurínico o apirimidínico) se induce un corte en la cadena de ADN, causando pérdida de la información genética (Lindahl, 1993). Otra forma común de daño hidrolítico es la desaminación de bases nitrogenadas (Hofreiter et al., 2001). La tasa de desaminación para la citosina y su homóloga 5-metilcitosina es particularmente elevada, siendo una reacción menos frecuente en purinas (Lindahl, 1993). La citosina desaminada es convertida en uracilo, una base no presente en el ADN, y la 5-metilcitosina en timina, lo cual, si no es reparado, puede inducir a la fijación de una mutación (Lindahl, 1993). En cuanto al daño oxidativo, es generado por radicales hidróxido y superóxido, subproductos del metabolismo oxidativo, o por radiaciones ionizantes (Höss et al., 1996; Lindahl, 1993). Estos radicales actúan frecuentemente sobre los residuos de guanina, convirtiéndolos en 8-hidroxiguanina, que se aparea preferencialmente con adenina en lugar de citosina, por lo cual se genera una transversión durante la replicación (Lindahl, 1993). Los radicales de oxígeno también son capaces de distorsionar la doble hélice del ADN, a través de la formación de enlaces covalentes dobles entre purinas y el esqueleto de azúcar-fosfato y de dímeros de purinas (Lindahl, 1993). Además, luego de la muerte de un organismo, es frecuente que ocurra el daño por oxidación de las pirimidinas a hidantoínas, compuesto que bloquea a la ADN polimerasa impidiendo la PCR (Höss et al., 1996).

Cuando el organismo está vivo, los mecanismos de reparación celular permiten mantener la información genética, reparando las modificaciones causadas (Lindahl, 1993). Cuando el organismo muere, el ADN deja de ser reparado y los daños se acumulan (Hofreiter et al., 2001). Esto lleva a la alteración de la composición química de las bases nitrogenadas (Kemp & Smith, 2005), lo cual impide la extensión durante el proceso de amplificación por PCR (Kress & Erickson, 2012). Otra consecuencia muy importante es que estos daños acumulados llevan a la fragmentación de la cadena, en un proceso que es dependiente del tiempo (Allentoft et al., 2012). La reducción a fragmentos pequeños es causada tanto por actividad enzimática una vez que el organismo muere y por clivaje hidrolítico del enlace fosfodiéster en el esqueleto azúcar-fosfato (Pääbo et al., 2004). Se

estima que el ADN totalmente hidratado es espontáneamente degradado en unos pocos miles de años (Lindahl, 1993). La tasa a la cual ocurre la fragmentación se ve afectada por factores ambientales como la temperatura, el pH, la humedad y la composición química del ambiente donde se encuentran los restos (Seersholm et al., 2021). Además, el ataque de los microorganismos puede destruir por completo el ADN luego de la muerte del organismo (MacHugh et al., 2000). Debido a este proceso de degradación, en general, no se preservan fragmentos de gran tamaño en restos antiguos (Pääbo et al., 2004). Es por ello que varios autores han señalado que en el trabajo con ADN antiguo existe una relación inversa entre el éxito en la amplificación y el tamaño del amplicón (Höss et al., 1996; Pääbo et al., 2004). Esto lleva a la necesidad de la utilización de oligonucleótidos que amplifiquen por PCR fragmentos cortos, menores a 200-300 pb (O'Rourke et al., 2000a; Pääbo et al., 1989).

Otra de las consideraciones a tener en cuenta al trabajar con ADN es la contaminación con ADN exógeno durante la extracción del material genético y posterior amplificación por PCR (Lindahl, 1993). El ADN contaminante moderno, al encontrarse menos afectado por la degradación puede verse preferencialmente amplificado en un procedimiento de PCR y resultar en un falso positivo (Kemp & Smith, 2005). También muchas extracciones presentan inhibidores, como taninos, ácidos húmicos y fúlvicos, productos de degradación derivados del suelo, o los productos de Maillard, subproductos de la reducción del azúcar, que ocasionan el color marrón en las extracciones de ADN e impiden la amplificación por PCR (O'Rourke et al., 2000a).

Dado que los tejidos blandos raramente se preservan y normalmente presentan una mayor contaminación por parte de los microorganismos, las fuentes de ADN antiguo más utilizadas son las piezas óseas y dentales (Orlando et al., 2021). Se ha observado una mejor preservación de fragmentos de ADN en muestras de hueso, dado a la unión y estabilización del ADN con la hidroxiapatita, un mineral del tejido óseo (MacHugh et al., 2000; Tuross, 1993, 1994), reduciendo la velocidad de desintegración a la mitad (Lindahl, 1993; MacHugh et al., 2000). En el caso de los dientes, el ADN se preserva mejor dado a

que está menos expuesto a los factores ambientales y menos afectado por el tipo de sustrato donde permanecen los restos (O'Rourke et al., 2000a).

La característica del ADN antiguo de encontrarse altamente fragmentado es una de las ventajas para la utilización de secuenciación masiva paralela, también llamada secuenciación de alto rendimiento o *Next-Generation Sequencing* (NGS), dado que los moldes utilizados por este tipo de tecnologías deben ser fragmentos muy cortos de ADN (Stoneking & Krause, 2011). La aplicación de estas tecnologías desde el 2005 han traído cambios revolucionarios al campo del análisis de ADN antiguo (Knapp & Hofreiter, 2010; Orlando et al., 2021). La secuenciación masiva permite obtener millones de *reads* (o lecturas) paralelas de diferentes variantes de secuencia presentes en una muestra, lo que hace que esta estrategia sea más adecuada y rentable que el método tradicional de secuenciación Sanger (Shokralla et al., 2012). Además de las mencionadas ventajas, la secuenciación de alto rendimiento proporciona una menor probabilidad de que los ADNs contaminantes sean secuenciados, dado que siendo ADN moderno no se encontraría degradado en fragmentos cortos (Stoneking & Krause, 2011). Como ejemplos de su aplicación se pueden destacar el primer genoma humano antiguo obtenido de un cabello de un individuo de 4.000 años de antigüedad de Groenlandia (Rasmussen et al., 2010) y los genomas de otros homínidos: Neandertales (Green et al., 2010) y Denisovanos (Reich et al., 2010), de gran importancia ya que se reveló su contribución a poblaciones modernas no africanas y poblaciones modernas de Australasia y Oceanía, respectivamente (Orlando et al., 2021). Si bien trabajar con secuencias completas de ADNmt presenta muchas ventajas, la utilización de secuencias cortas como son las HVR aún siguen siendo informativas dado a que representan el 40% de la variabilidad conocida en un 4% del genoma (Soares et al., 2009).

1.4. ANTECEDENTES DE ADN ANTIGUO EN URUGUAY

Se ha estimado una edad radiocarbónica de ocupación del territorio uruguayo entre 10.400 y 12.600 años antes del presente (Sans et al., 2015 y las referencias en el mismo). Sin embargo, el resto humano más antiguo publicado hasta el momento fue datado en 3.520 ± 60 años antes del presente, ubicado en el este del país (Mut, 2015). Para la región oeste, el fechado radiocarbónico más antiguo sobre restos humanos es de 1.910 ± 50 años antes del presente, correspondiente al sitio arqueológico denominado “El Cerro” (Castillo, 2004).

Numerosos sitios arqueológicos se han encontrado a lo largo de todo el territorio, fundamentalmente al oeste y este del país (Figueiro, 2014). Se asocian mayormente en ambos casos a estructuras monticulares, que particularmente en la región oriental, se consideran de origen antrópico y se han denominado como “cerritos de indios”. Estas manifestaciones arqueológicas demuestran los complejos procesos socioculturales de las poblaciones que habitaban el país desde hace más de 5.000 años hasta el siglo XVII (Bracco, 2006). El registro arqueológico del área corresponde a grupos de cazadores-recolectores-pescadores con presencia de horticultura. En cuanto a la función de los montículos, se han interpretado como espacios ceremoniales o cementerios colectivos, como espacios habitacionales y monumentales (e.g. Bracco, 2006; Bracco et al., 2000; Cabrera, 2005; Figueiro et al., 2017; Gianotti, 2015; Iriarte, 2006; López Mazz, 2001; Milheira & Gianotti, 2018; Moreno et al., 2014).

En el litoral oeste, gran parte del acervo arqueológico generado fue realizado a partir de trabajos de arqueólogos aficionados (Figueiro, 2014), sin embargo, actualmente se están realizando trabajos para contextualizar adecuadamente este acervo (por ejemplo Gascue et al., 2016, 2022). Las poblaciones del Oeste estarían asociadas a grupos ceramistas, que se habían adaptado a los ambientes fluviales (Figueiro, 2013a). Los montículos correspondientes a las localidades del Oeste son más bajos, presentando mayor similitud con aquellos encontrados en el Delta del Paraná, en Argentina, a lo largo de la costa opuesta del Río Uruguay (Gascue et al., 2016).

El primer análisis de ADN antiguo en Uruguay fue llevado a cabo por Sans & Portas en 2001, en el cual se utilizaban marcadores en los cromosomas X e Y para la identificación del sexo de restos arqueológicos. Años después, el estudio de ADN de poblaciones antiguas de Uruguay tuvo su punto de partida con el trabajo de Bertoni et al. (2004), donde se secuenció la HVR I de cinco individuos recuperados en yacimientos arqueológicos del Departamento de Rocha. Los resultados permitieron incluir en haplogrupos previamente establecidos a cuatro de ellos, siendo tres individuos pertenecientes al haplogrupo C y el restante al haplogrupo B (Bertoni et al., 2004). Desde este estudio preliminar pudo establecerse que dos de los individuos pertenecientes al haplogrupo C, hallados en el mismo sitio, presentaron el mismo linaje. A su vez, en estudios posteriores, se pudo identificar este mismo linaje en el charrúa Vaimaca Perú y en poblaciones modernas de Uruguay (Sans et al., 2010, 2012, 2015). Adicionalmente, Sans & Figueiro (2009) identificaron en poblaciones pasadas del Este una frecuencia de haplogrupos similar a lo encontrado en diversas muestras de la población uruguaya actual (Bonilla et al., 2004; Sans et al., 2006). Posteriormente, comparaciones entre muestras del Este y el Oeste con el componente indígena del Uruguay actual también han destacado la similitud en frecuencias de los haplogrupos (Figueiro, 2013a). Estos hallazgos han evidenciado una continuidad de las poblaciones indígenas del Uruguay (Figueiro, 2013a, 2013b; Sans et al., 2015), lo cual aporta a la construcción de la identidad nacional, así como resalta el valor del patrimonio arqueológico a través de la identificación de lazos genéticos entre las poblaciones antiguas y actuales. También se ha propuesto, en base a la evidencia utilizando ADNmt antiguo, que los individuos encontrados en los montículos estarían emparentados por vía materna (Figueiro et al., 2017). Incluso, analizando individuos de sitios indígenas del este y el oeste de Uruguay, se ha detectado una diferenciación entre las poblaciones de ambas regiones en el Holoceno tardío (últimos 2.500 años), encontrando distintos valores de diversidad genética, 0,70 y 0,82, respectivamente (Figueiro, 2013a).

Los primeros genomas completos de individuos antiguos de Uruguay fueron recientemente publicados, proporcionando evidencia a favor de otra posible ruta de

poblamiento de Sudamérica a través de la costa atlántica, conectando mediante una ancestría profunda individuos antiguos del este de Uruguay y del este de Brasil (Lindo et al., 2022).

1.5. RELACIÓN CON POBLACIONES CERCANAS

Muchos estudios en genética de poblaciones antiguas se han dedicado a responder preguntas en relación a la colonización de las Américas, sin embargo, poco se detalla acerca de las interacciones locales o regionales entre poblaciones (García et al., 2018).

En base a evidencia arqueológica, el río Uruguay y el Río de la Plata se han postulado como una de las principales rutas de migración, dispersión inicial y circulación humana durante el poblamiento de la región sureste de Sudamérica (Suárez, 2017). Se ha registrado el transporte de materias primas (piedras preciosas, calizas, etc.) que podrían evidenciar movimientos extrarregionales (Flegenheimer et al., 2003; Saccone, 2020).

Se ha vinculado a los habitantes de la región este de Uruguay con el sur de Brasil dado que comparten semejanzas a nivel arqueológico a través de las construcciones de “cerritos de indios” (Cabrera, 2005), sin evidencia genética de una vinculación más reciente debido a migraciones entre los individuos precolombinos de ambas regiones (Figueiro et al., 2017; Lindo et al., 2022; Sans et al., 2015).

En el caso de la región oeste, se han observado similitudes económicas, tecnológicas y estilísticas entre las poblaciones del margen izquierdo del río Uruguay con aquellos habitantes de su margen derecho y del Paraná medio e inferior, en el actual territorio argentino, lo cual puede evidenciar contacto entre dichos grupos humanos (Gascue et al., 2019a). Se destaca una gran similitud a nivel de la estructura del registro arqueológico entre el bajo río Uruguay y el Paraná inferior, evidenciando la presencia de sociedades complejas adaptadas a entornos similares hacia el final del Holoceno tardío (Gascue et al., 2019a). Incluso se han encontrado similitudes en base a la dieta rica en proteínas animales de individuos de ambas márgenes del Río Uruguay (Gascue et al.,

2016). Estas semejanzas han permitido relacionar a las ocupaciones de la región oeste del país con las unidades arqueológicas de la margen derecha del río Uruguay y el Paraná medio e inferior (Bortolotto et al., 2020). Además, hay evidencias que apuntan a un intercambio cultural regional basado en la presencia de moluscos marinos y restos óseos de mara y guanaco (Gascue et al., 2019b, Gascue et al., 2022). Sin embargo, también se ha destacado una alta estabilidad residencial en sitios del oeste de Uruguay, evidenciada a partir de las materias primas locales utilizadas para la manufactura de herramientas así como su uso, el consumo final de presas y el gran número de inhumaciones encontradas (Gascue et al., 2022).

Si bien ya había sido propuesta una red de interacción de larga distancia entre Uruguay y Argentina en el límite Pleistoceno/Holoceno (Flegenheimer et al., 2003), por los linajes locales encontrados y otras líneas de evidencia del contexto arqueológico, fundamentalmente del este de Uruguay, se ha sugerido una reducción de la movilidad durante el Holoceno (Sans et al., 2015).

Trabajando con ADN mitocondrial de individuos contemporáneos de la totalidad del territorio uruguayo, Figueiro et al. (2022) revelaron múltiples vínculos de profundidad temporal variable de las poblaciones de Uruguay con otras de América del Sur. Entre ellas, se destacan las vinculaciones con Patagonia, la región del Chaco y el centro de Argentina. Si bien al trabajar con muestras modernas no puede establecerse con claridad la profundidad temporal de estos vínculos, algunos deben haber implicado movimientos a través del río Uruguay.

1.6. OTROS MARCADORES UTILIZADOS EN RESTOS ANTIGUOS

La gran mayoría de los trabajos que se basan en ADN antiguo utilizan el ADNmt, debido a su alto número de copias por célula (Raff et al., 2011). Esta característica determina un mayor éxito en la amplificación de un fragmento mitocondrial comparado

con la amplificación de secuencias nucleares, con dos copias por gen en los organismos diploides (O'Rourke et al., 2000a). Sin embargo, ha sido posible el estudio de marcadores nucleares, incluso antes de la aplicación de la secuenciación masiva (e. g. Filon et al., 1995; Hummel & Herrmann, 1991; Lassen et al., 1996; Palmirotta et al., 1997; Zierdt et al., 1996).

Uno de los primeros intereses al estudiar restos óseos humanos es la determinación del sexo, ya sea en las ciencias forenses para la identificación de individuos, así como en arqueología y paleoantropología para una adecuada reconstrucción del pasado (Stewart et al., 2017). Muchas veces el grado de fragmentación de las piezas óseas arqueológicas impide determinar caracteres morfológicos u osteométricos distintivos. En aquellos restos esqueléticos correspondientes a subadultos (infantes, niños y adolescentes) es más dificultosa la asignación de sexo por morfología ósea. Además, es importante la utilización de otras herramientas que permitan la distinción del sexo, ya que en trabajos anteriores se ha visto que las poblaciones del oeste del país, como las analizadas en este trabajo, presentan un menor dimorfismo con respecto a las del este (Figueiro & Sans, 2011), lo cual dificulta aún más la asignación. En el marco de este trabajo identificar el sexo de los individuos es de gran importancia para plantear patrones de entierro diferencial de manera de ampliar el conocimiento en cuanto a la organización social de las poblaciones pasadas.

Otro de los marcadores nucleares de interés es el gen del receptor de la Ectodisplasia A (EDAR), dado a su asociación con el rasgo morfológico denominado "incisivo en pala", hallado en frecuencias elevadas en poblaciones nativas americanas y del este de Asia, y poco frecuente en poblaciones de origen africano y europeo (Hanihara, 2008; Hlusko et al., 2018; Turner, 1979). El diente en pala se define por la presencia de una concavidad delimitada por crestas en la cara lingual de los incisivos (Acosta, 2021). Se ha reportado una frecuencia del 95 y 100% en poblaciones indígenas prehispánicas de América (Hanihara, 2008; Sutter, 2005). En poblaciones modernas también fue identificado este rasgo fundamentalmente en asiáticos como en indígenas americanos

(Kimura et al., 2009). Este rasgo ha sido asociado en poblaciones asiáticas a una mutación no sinónima T1540C del gen EDAR (Kimura et al., 2009; Park et al., 2012). El gen se encuentra en el brazo largo del cromosoma 2 (2q11-13) (Acosta, 2021). La mutación consiste en un polimorfismo de nucleótido único o SNP (*single nucleotide polymorphism*), rs3827760, en la posición 1540, donde se sustituye la base T por C, generando un cambio de aminoácidos de valina a alanina (Fujimoto et al., 2008). La variante se denomina EDAR T1540C según nucleótidos o V370A según aminoácidos (Kimura et al., 2009).

El gen EDAR tiene una variedad de efectos pleiotrópicos, además de la forma de los incisivos en pala, como la densidad de las glándulas sudoríparas y la ramificación de los conductos de las glándulas mamarias. Recientemente se ha propuesto que las poblaciones nativas americanas habitantes de Beringia habrían experimentado una fuerte selección positiva sobre el gen EDAR, por la ventaja que la variante aporta en la transmisión de nutrientes de la madre al hijo a través de la leche materna en condiciones de escasa radiación solar (Hlusko et al., 2018). Por estos motivos, la presencia de la variante EDAR T1540C es un indicativo de ancestría indígena, y es de interés el estudio de su presencia también en poblaciones antiguas.

En la presente Tesis se pretende generar datos para las poblaciones indígenas antiguas del oeste de Uruguay, mediante el análisis de ADN de varios individuos de Colonia Concordia y de un individuo proveniente de la localidad cercana de Campo Morgan. Estos análisis tienen la finalidad de detectar linajes geográficamente restringidos o compartidos con otras regiones y así aportar detalles del poblamiento y microevolución locales. Complementariamente, se amplificaron dos marcadores nucleares, en primer lugar, para la determinación molecular del sexo de los individuos en estudio, y, seguidamente, para la identificación de una variante de alta frecuencia en poblaciones indígenas, con el objetivo de poder evaluar su potencial en futuros estudios.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Aportar al conocimiento de los sitios arqueológicos Colonia Concordia y Campo Morgan, ubicados en el oeste de Uruguay, desde el punto de vista genético por medio del análisis de ADN mitocondrial de restos humanos enterrados en los mismos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Extraer ADN y amplificar las HVR I y II de los individuos recuperados del sitio Colonia Concordia, departamento de Soriano.
- 2) Determinar haplogrupos, subhaplogrupos y linajes maternos de las muestras mediante el análisis de las secuencias de las HVR I y II, y de dos secuencias obtenidas por secuenciación masiva, una proveniente de un individuo de Colonia Concordia y otra proveniente de un sitio arqueológico próximo al anterior, Campo Morgan, ubicado en el departamento de Río Negro.
- 3) Comparar las secuencias obtenidas con poblaciones antiguas y modernas de regiones vecinas a nivel de similitud de secuencia, y determinar las afinidades geográficas.
- 4) Determinar el sexo de los individuos en estudio mediante marcadores moleculares en los cromosomas X e Y.
- 5) Amplificar el gen EDAR e identificar la presencia de la variante T1540C en las muestras.

3. HIPÓTESIS

En primer lugar, dada la propuesta de reducción de la movilidad durante el Holoceno, se espera determinar linajes locales con polimorfismos exclusivos de la región oeste de Uruguay. Por otra parte, se espera encontrar variantes compartidas con poblaciones de Argentina, debido a la proximidad geográfica así como su morfología y rasgos culturales similares.

En segundo lugar, se espera que el sexo inferido mediante rasgos morfológicos adultos se corresponda con el obtenido a través de marcadores moleculares.

Por último, se espera que los individuos estudiados presenten la variante T1540C para el gen nuclear EDAR dada su alta frecuencia en poblaciones indígenas americanas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

4.1.1. DESCRIPCIÓN DEL SITIO EN ESTUDIO

El sitio Colonia Concordia es un montículo ubicado a las orillas del río Uruguay en la localidad La Concordia, al noroeste del departamento de Soriano, Uruguay. Se localiza a los 33° 36.987 de latitud Sur y a los 58° 24.965 de longitud Oeste (Figura 3, Rodríguez, 2019). También es llamado Cañada Saldaña debido a su cercanía con la cañada de ese nombre. El sitio fue excavado durante el siglo XX por los arqueólogos *amateurs* Antonio Taddei, Francisco Oliveras y Rodolfo Maruca Sosa. Se encuentra ubicado a 180 metros aproximadamente de la costa, y fue considerado, en un primer momento, como un montículo artificial construido por indígenas (Maruca Sosa, 1957). Recientemente se ha demostrado que la formación del montículo se debe principalmente a la acumulación natural de sedimentos causada por la dinámica fluvial, aunque no se descarta que otros procesos pudieran haber actuado generando una mayor elevación (Gascue et al., 2022).

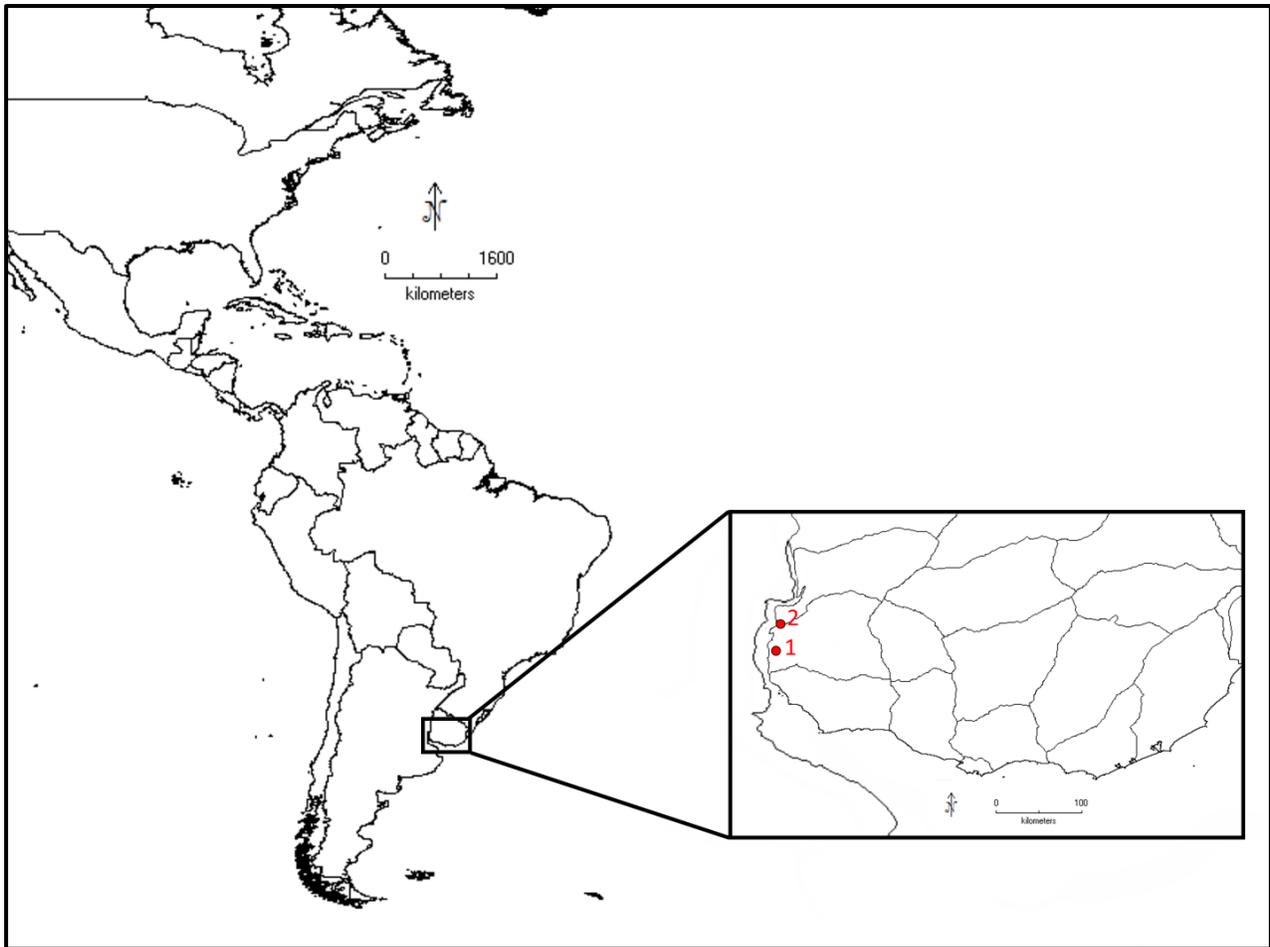


Fig. 3. Mapa con la ubicación de los sitios estudiados: 1- Colonia Concordia; 2- Campo Morgan.

Rodolfo Maruca Sosa declaró que “se han extraído unos 50 restos de indígenas” (Maruca Sosa, 1957: 176), incluyendo tanto individuos adultos como infantiles, de los cuales 20 eran esqueletos casi completos (Maruca Sosa, 1957). A partir de los huesos largos que fueron analizados se estimaron las alturas entre un metro sesenta centímetros y un metro sesenta y ocho centímetros (Maruca Sosa, 1957). Entre las piezas halladas son de particular interés los restos pertenecientes a una mujer enterrada boca abajo junto con los restos de un subadulto de pocos meses de edad, cuyos huesos, además de ser los más pequeños que fueron encontrados, tienen la característica de observarse en buen estado (Maruca Sosa, 1957). Estas piezas fueron particularmente colectadas para estudiar las relaciones de parentesco de ambos individuos, ya que por la forma de enterramiento se

consideran madre e hijo. Además se recuperaron restos faunísticos (nutrias, ciervos, ñandúes, carpinchos, pumas y otros felinos, mulitas, peces y moluscos), instrumentos de piedra (como morteros, boleadoras, etc.), instrumentos en huesos de ciervos, ñandúes, felinos y nutrias (como punzones, amuletos y otras aplicaciones), alfarería y leña carbonizada (Maruca Sosa, 1957).

En un estudio reciente (Rodríguez, 2019) se detectaron marcas de estrés músculo-esquelético en los miembros superiores de los individuos estudiados de Colonia Concordia, lo cual es señal de la realización de diferentes actividades que implicaban la fuerza de los miembros superiores como lo son la pesca, la caza, el remo, la fabricación y utilización de herramientas como morteros, guijarros, entre otros (Rodríguez, 2019). También se observaron procesos inflamatorios en la zona de inserción de músculo, tendón y ligamento (entesis), lo cual se asociaría con actividades físicas u ocupacionales (Rodríguez, 2019).

Los restos obtenidos de Colonia Concordia quedaron inicialmente en manos de Antonio Taddei, Francisco Oliveras y Rodolfo Maruca Sosa. Aquellos recuperados por Taddei ahora están presentes en el Museo Arqueológico Prof. Antonio Taddei en Canelones y los restos recuperados por Oliveras forman parte actualmente de la Colección Oliveras del Museo Nacional de Antropología. En cuanto a los restos extraídos por Maruca Sosa su ubicación es desconocida, por lo tanto no fue posible acceder a la totalidad de los restos exhumados.

Restos humanos del sitio fueron datados mediante carbono 14 obteniendo dos fechados de 1.840 ± 100 y 1.780 ± 70 años antes del presente (Castillo, 2004; Gascue et al., 2022), lo cual es considerado el marco cronológico general de los entierros. El sitio Campo Morgan, de interés por su proximidad a Colonia Concordia, carece de datos cronológicos. Sin embargo, para este sitio se asume una cronología similar al sitio arqueológico Isla del Vizcaíno 1, datado en 1.510 ± 30 años radiocarbónicos antes del presente (Gascue et al., 2019a).

4.1.2. INDIVIDUOS ANALIZADOS

4.1.2.1. ELECCIÓN DE LAS PIEZAS

Dado la evidencia de que el ADN se preserva mejor en las piezas dentales que en los huesos (Figueiro, 2013a; Shook, 2005), preferentemente se colectaron molares de los individuos. Los dientes presentan una cubierta de esmalte que ofrece mayor protección frente a la degradación del material hereditario remanente (Cardozo et al., 2021). En la Figura 4 se muestra el ejemplo de dos muestras colectadas, A2 y S1, del sitio Colonia Concordia. La muestra S4 (Tabla 2) no había sido reconocida como parte de un esqueleto humano, sino que se encontraba junto a restos de fauna, siendo identificada por el Dr. Gonzalo Figueiro e incluida en este análisis.



Fig. 4. Ejemplos de los individuos colectados en el Museo “Antonio Taddei”: A2 (izquierda) y S1 (derecha).

4.1.2.2. CARACTERÍSTICAS DE LAS MUESTRAS

Se recolectaron muestras (dentales u óseas) de restos de 17 individuos del sitio Colonia Concordia, depositados en el Museo Nacional de Antropología (Montevideo) y el Museo Arqueológico Prof. Antonio Taddei (Tabla 2). Para prevenir en lo posible que las piezas tuviesen ADN exógeno en su interior, se aseguró que estuvieran íntegras y con buena preservación macroscópica. Los individuos A1 y S3 fueron identificados como los que fueron hallados enterrados juntos, con el individuo S3 ubicado entre los fémures del individuo A1, un entierro primario en decúbito ventral de una mujer adulta (Figura 5).



Fig. 5. Fotografía *in situ* del entierro de los individuos A1 y S3 (colección Museo Taddei).

Tabla 2. Detalle de las muestras analizadas en este estudio.

Individuo	Material	Museo y colección	Edad y sexo
A1	Segundo molar superior derecho	Museo "Antonio Taddei"	
A2	Temporal derecho y segundo molar superior izquierdo	Museo "Antonio Taddei"	
S1	Fragmento de temporal derecho	Museo "Antonio Taddei"	2,5-3,5 años*
S2	Temporal izquierdo	Museo "Antonio Taddei"	6-12 meses*
S3	Hueso largo Costilla	Museo "Antonio Taddei"	6-12 meses*
S4	Petroso	Museo "Antonio Taddei"	0-6 meses*
37974	Tercer molar inferior	Museo Nacional de Antropología/ Colección	

Oliveras			
41101	Cuarto metacarpo derecho	Museo Nacional de Antropología/ Colección Oliveras	Adulto, posiblemente entre 20-24 años Posible femenino**
47992	Dos fragmentos de costilla	Museo Nacional de Antropología/ Colección Oliveras	Indeterminado Subadulto/Adulto joven**
Molar			
47994	Temporal izquierdo	Museo Nacional de Antropología/ Colección Oliveras	
47995	Segunda costilla izquierda	Museo Nacional de Antropología/ Colección Oliveras	Adulto Posible masculino**
47996	Dos fragmentos de costillas	Museo Nacional de Antropología/ Colección Oliveras	Adulto joven Indeterminado**
47996 BIS	Dos fragmentos de hueso largo	Museo Nacional de Antropología/ Colección Oliveras	Indeterminado Subadulto/Adulto joven**
51983	Petroso izquierdo	Museo Nacional de Antropología/ Colección Oliveras	
Metacarpo			
55698	Segundo molar inferior izquierdo	Museo Nacional de Antropología/ Colección Oliveras	Posible masculino**
55961	Metacarpo	Museo Nacional de Antropología/ Colección Oliveras	Adulto Posible masculino**
61395	Falange	Museo Nacional de Antropología/ Colección Oliveras	Adulto joven Posible femenino**

*Determinado por el Dr. Gonzalo Figueiro **De acuerdo al trabajo realizado por Rodríguez (2019).

4.2. METODOLOGÍA DE TRABAJO CON ADN ANTIGUO

El estudio de ADN antiguo requiere la implementación de estrictos protocolos y precauciones anticontaminación para muestras altamente degradadas (Knapp et al., 2012; Yang & Watt, 2005). El Laboratorio de ADN Antiguo del Departamento de Antropología Biológica de la Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación (FHCE), Universidad de la República, se encuentra en un área aproximada de 16m², y cuenta con los implementos necesarios para minimizar la posibilidad de contaminación con ADN moderno: Inyector de aire con filtro, luz UV general y localizada, e instrumental y equipos utilizados exclusivamente para extracción, preservación y montaje de PCR de ADN antiguo: agitadores (horizontal y vórtex), cabina para PCR con flujo laminar y luz UV, centrífugas para tubos de 15 y 1,5 mL, freezer -20°C, horno de temperatura regulable con rotación, micropipetas operadas con puntas con filtro y UV *crosslinker*.

En el trabajo de laboratorio se cumplieron con las prácticas para minimizar la contaminación, incluyendo el uso de mameluco con capucha, cubrezapatos, tapabocas y dos pares de guantes de nitrilo descartables. Antes del ingreso al laboratorio y luego de finalizar el trabajo en el mismo, la luz UV fue encendida como mínimo 20 minutos. Todas las superficies y el instrumental a utilizar fueron limpiadas antes, durante y después de su uso con hipoclorito de sodio al 10%. También las piezas de instrumental fueron irradiadas con UV localizado, al igual que todos los reactivos a excepción de los que pudieran sufrir daño con la radiación UV, como el *mix* utilizado para PCR, los cebadores y los extractos de ADN.

Las reacciones de PCR y todas las operaciones post-PCR se efectuaron fuera del laboratorio de ADN antiguo, en el laboratorio de genética molecular del Departamento de Antropología Biológica. No se realizó el reingreso al laboratorio de ADN antiguo luego de haber estado en el laboratorio post-PCR, de manera de evitar la contaminación con productos de PCR y ADN moderno.

4.2.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

En primer lugar se debieron eliminar los contaminantes presentes en la superficie del material, para lo cual las piezas fueron tratadas con hipoclorito de sodio al 10%. Molares y piezas más pequeñas fueron incubadas en un tubo estéril de 50 mL con hipoclorito de sodio en rotación a temperatura ambiente por 10 minutos. Para las piezas de mayor tamaño, como por ejemplo los huesos petrosos, se limpió la superficie externa con dicho compuesto. Luego se descartó el hipoclorito y se enjuagaron las piezas dos veces con agua destilada (ddH₂O DNA-free) para remover cualquier resto del producto. Al material dentro del tubo se realizó un tercer lavado con agua destilada que incluyó un período de incubación y rotación por 10 minutos a temperatura ambiente, para luego descartar toda el agua posible. Posteriormente a este tratamiento, fueron irradiadas con luz UV dentro del *crosslinker* durante una hora o hasta que la pieza estuviese completamente seca. Finalmente se utilizó un torno de manualidades para la pulverización del material interno de las piezas óseas y en el caso de los dientes la obtención del polvo de dentina.

4.2.2. EXTRACCIÓN DE ADN

Una vez que las piezas fueron reducidas a polvo, se les agregó 3 mL de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0,5M (pH 8,0), que es un agente quelante, utilizado para la captura de los iones calcio de la hidroxiapatita, logrando separar la matriz mineral de la pieza del ADN que haya en la misma. En casos donde el material estaba muy fragmentado, como es el caso de las muestras S3, 41101, 55698, 61395, fueron procesadas utilizando FASTPREP (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, EE.UU.), agregando EDTA a la matriz, hasta obtener una fragmentación completa de la pieza. Se le añadió 30 µL de Proteínasa K (20 mg/ml, New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) para degradar las proteínas que conforman la matriz orgánica de las piezas, y se incubó toda la noche a 55°C. Se adicionaron 20 µL de la misma Proteínasa K y se la dejó hasta el día siguiente. Luego de

este período, se centrifugaron los digeridos a 5000 revoluciones por minuto (rpm) durante tres minutos y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Se redujo su volumen, concentrando el ADN presente en el mismo, utilizando un filtro de centrifuga Amicon® Ultra-4 4 mL (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania) hasta alcanzar un volumen aproximado de 250 µL, siendo sometidos a una centrifugación de 69 a 85 minutos a 3500 rpm. El concentrado se transfirió a un nuevo tubo. El ADN del material digerido se purificó mediante el uso de un agente caotrópico (Höss & Pääbo, 1993) y se capturó a través de columnas de sílice en un ambiente de pH ácido (Yang et al., 1998). Para ello se utilizaron las soluciones provistas por un *kit* comercial de purificación de productos de PCR basado en columnas de sílice (QIAquick® PCR purification kit, QIAGEN, Hilden, Alemania). El uso de *kit* comerciales tiene la ventaja de reducir al mínimo la manipulación y la preparación de soluciones, evitando la contaminación en algunos de estos pasos. Primero se añadieron 5 volúmenes de *buffer* de captura (*buffer* PB) al tubo al cual se transfirió el sobrenadante. Debido a que el ADN sólo se une a las columnas de sílice estando a un pH ácido, se agregó 15 µL de acetato de sodio 3 M (pH 5,2) a la mezcla. Se transfirió, en tandas de 750 µL, la mezcla de EDTA y *buffer* de captura a través de columnas de sílice, incubando por cinco minutos previamente a su centrifugación a máxima velocidad por un minuto, repitiendo el procedimiento hasta terminar todo el contenido del tubo. Luego se realizaron dos lavados, para eliminar todo aquello que no se unió a las columnas, utilizando 750 µL de *buffer* de lavado con etanol (*buffer* PE) y descartando el eluído generado en la centrifugación a máxima velocidad por un minuto. Se eluyó el ADN adherido a la columna utilizando el *buffer* de elución (*buffer* EB) del *kit*. Se añadieron 30 µL del *buffer* a las columnas, luego fueron incubadas por 10 minutos a 37°C y finalmente se centrifugaron a velocidad máxima, también por un minuto, recolectando el eluído en un nuevo tubo de 1,5 mL. Este procedimiento se realizó dos veces, obteniendo un volumen final de 60 µL para cada extracto.

Se realizaron tandas de extracción de hasta tres piezas y siempre se incluyó un blanco de extracción, que consiste en un tubo sin material sometido a los mismos

reactivos y procedimientos que las demás muestras. Cada uno de los materiales utilizados fue previamente irradiado con luz UV.

Se midió la concentración del ADN en los extractos a través de las lecturas Qubit con el *kit* de alta sensibilidad (HS) para ADN de cadena doble, con el fin de detectar trazas de ADN en las muestras; se incluyeron los blancos de extracción en las lecturas para confirmar la ausencia de ADN en ellos, de manera de descartar errores de manipulación durante los procedimientos de extracción. Los blancos de extracción también fueron incluidos en las reacciones de PCR.

Por último, con el objetivo de detectar posibles fuentes de contaminación humana, se determinó el haplogrupo mitocondrial de los integrantes del laboratorio que estuvieron en contacto con las muestras y áreas de trabajo.

4.2.3. AMPLIFICACIÓN DE LAS REGIONES HIPERVARIABLES I Y II

Fragmentos de ambas regiones hipervariables se amplificaron utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tres a cinco fragmentos solapantes (Kemp et al., 2007; Raff et al., 2010). Se emplearon 30 μ L de las reacciones de amplificación por PCR con *mastermix* ImmoMix™ 1X incluyendo una enzima *hot-start* DNA polimerasa (BioLine Reagents, London, England, United Kingdom), cebadores 160 nM cada uno (*forward* y *reverse*), H₂O ultrapura libre de ADNasas y ARNasas, y 3,0 μ L de ADN molde.

Cada porción de la región hipervariable fue sujeta a 45 ciclos de PCR: 10 minutos de desnaturalización inicial a 95°C, seguido por 30 segundos de desnaturalización a 95°C, 30 segundos a la temperatura de *annealing*, y 30 segundos de extensión a 72°C, seguida por cinco minutos de extensión final a 72°C.

4.2.3.1. DESARROLLO Y SÍNTESIS DE CEBADORES ESPECÍFICOS

Dado el alto grado de fragmentación del ADN en las muestras estudiadas, no fue posible la amplificación utilizando los cebadores desarrollados previamente por el Dr.

Gonzalo Figueiro, por lo cual fue necesario diseñar cebadores capaces de amplificar regiones aún más pequeñas.

Para el diseño de cebadores específicos que amplifiquen fragmentos cortos de 125-130 pb de la HVR I se utilizaron los programas Primer3Plus (Untergasser et al., 2007) y Primer-BLAST (Ye et al., 2012). Entre los cebadores que se obtuvieron mediante el programa, la elección de aquellos a sintetizar se realizó de acuerdo a que presentaran menor complementariedad tanto en su propia secuencia como entre el cebador sentido y el antisentido, de manera de evitar la formación de estructuras secundarias, y que el contenido de bases GC y el valor de la temperatura de hibridación (Tm) fuera similar entre los pares de cebadores. Mediante la herramienta OligoAnalyzer se evaluó la formación de dímeros (tanto homo como heterodímeros) y especialmente el potencial de formación de estructuras secundarias, evaluando existencia, estabilidad y la Tm de las mismas en los cebadores diseñados. Aquellos que fueron seleccionados se enviaron a sintetizar a la compañía Invitrogen (Carlsbad, CA, EE.UU.).

Tabla 3. Cebadores empleados para la amplificación de la HVRI. Los cebadores “F” extienden la hebra “L” del genoma mitocondrial y los “R” la hebra “H”. La posición está numerada de acuerdo a la secuencia de referencia revisada de Cambridge (Andrews et al., 1999).

Cebador	Posición (5'-3')	Secuencia	Tamaño amplicón	Temp. de annealing	Ref.
LAHV1F	16023-16043	GTT CTT TCA TGG GGA AGC AGA	128 pb	56°C	Este estudio
LAHV1R	16151-16128	GGT GGT CAA GTA TTT ATG GTA CCG			Este estudio
LAHV2F	16098-16117	ACA TTA CTG CCA GCC ACC AT	128 pb	56°C	Este estudio
LAHV2R	16225-16204	GAG GGT TGA TTG CTG TAC TTG C			Este estudio
16126F	16106-16126	GCC AGC CAC CAT GAA TAT TGT	145 pb	53°C	Kemp et al. (2007)

16230R	16251-16230	GGA GTT GCA GTT GAT GTG TGA T			Kemp et al. (2007)
LAHV3F	16156-16179	GTA CAT AAA AAC CCA ATC CAC ATC			Este estudio
LAHV3R	16283-16263	TGT TGG TAT CCT AGT GGG TGA	127 pb	55°C	Este estudio
16249F	16232-16249	CAC ACA TCA ACT GCA ACT			Kemp et al. (2007)
16331R	16355-16331	GGG ATT TGA CTG TAA TGT GCT ATG T	123 pb	53°C	Kemp et al. (2007)
HVR1_P2Fb	16162-16182	AAA ACC CAA TCC ACA TCA AA			Raff et al. (2010)
HVR1_P2R	16296-16276	GGG TGG GTA GGT TTG TTG G	134 pb	53°C	Raff et al. (2010)
LAHV4F	16240-16259	AAC TGC AAC TCC AAA GCC AC			Este estudio
LAHV4R	16365-16345	GGG ACG AGA AGG GAT TTG ACT	125 pb	59°C	Este estudio
HVR1_P3F	16266-16288	CCC ACT AGG ATA CCA ACA AAC C			Raff et al. (2010)
HVR1_P3R	16422-16401	ATT GAT TTC ACG GAG GAT GG	156 pb	53°C	Raff et al. (2010)
LAHV5F	16322-16341	ATT TAC CGT ACA TAG CAC AT			Este estudio
LAHV5R	16450-16433	CGA GGA GAG TAG CAC TCT	128 pb	50°C	Este estudio

Tabla 4. Cebadores empleados para la amplificación de la HVRII. Los cebadores “for” extienden la hebra “L” del genoma mitocondrial y los “rev” la hebra “H”. La posición está numerada de acuerdo a la secuencia de referencia revisada de Cambridge (Andrews et al., 1999).

Cebador	Posición (5'-3')	Secuencia	Tamaño amplión	Temp. de <i>annealing</i>	Ref.
ii29for	8-29	GGT CTA TCA CCC TAT TAA CCA C	144 pb	50°C	Vigilant et al. (1989)
ii133revA	152-132	AGG ATG GGG CAG GAA TCA AAG			
ii152forA	132-152	CTT TGA TTC CTG CCC CAT CCT	164 pb	51°C	Diseñados por el Dr. Gonzalo Figueiro
ii273rev	296-273	GGA AAT TTT TTG TTA TGA TGT CTG			
ii260for	242-260	CAA TTG AAT GTC TGC ACA G	140 pb	51°C	
ii362rev	382-362	CAT ACC GCC AAA AGA TAA AAT			

Todos los extractos fueron amplificados usando los cebadores de la Tabla 3. Estos productos proporcionan cobertura de la HVR I desde las posiciones nucleotídicas de 16044 a 16432 de la secuencia de referencia revisada de Cambridge (Andrews et al., 1999). Para el caso de la HVR II, las amplificaciones de los cebadores de la Tabla 4 cubren las posiciones nucleotídicas desde 30 a 361 con respecto a la mencionada secuencia de referencia.

4.2.3.2. VERIFICACIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS

Para verificar la amplificación del producto deseado se realizó para cada reacción una electroforesis cargando una alícuota de 10 µL de producto de PCR en un gel de agarosa al 2% con buffer Tris-borato-EDTA (TBE) 0,5 X a 100 V durante 40 minutos, utilizando GoodView™ (Sbs) como agente intercalante. La visualización de las bandas se

realizó mediante fluorescencia por luz UV. El tamaño de los productos amplificados se verificó por comparación con un estándar de peso molecular conocido compuesto de bandas de ADN de largos en múltiplos de 100 pb proporcionado por la empresa NZYTech (Lisboa, Portugal).

Aquellos fragmentos que pudieron ser amplificados fueron purificados mediante el tratamiento con 3,0 μ L de fosfatasa alcalina y 1,5 μ L de exonucleasa I sobre 15 μ L de producto de PCR, en un volumen final de 19,5 μ L. Este tratamiento se realiza previamente a la secuenciación de los fragmentos con el objetivo de eliminar el exceso de desoxinucleósidos trifosfatos (dNTPs) y cebadores, respectivamente. Se incubaron los productos de PCR con dichas enzimas por 30 minutos a 37°C en un baño seco y posteriormente a 80°C por 15 minutos para inactivar las enzimas. Las muestras amplificadas y purificadas se enviaron a secuenciar mediante secuenciación Sanger a Macrogen (Seúl, Corea del Sur) y al Institut Pasteur de Montevideo.

4.3. ANÁLISIS DE LOS DATOS

4.3.1. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DE LAS HVR I Y II

Las secuencias de ADN obtenidas se alinearon con la rCRS (Andrews et al., 1999) en el programa MEGA versión X (Kumar et al., 2018), revisándose las variantes obtenidas en forma manual a fin de filtrar eventuales “mutaciones” debidas al daño *post-mortem* al ADN (Hofreiter et al., 2001). Se determinaron los haplogrupos de los individuos analizados empleando el programa Haplogrep v2.2 (Weissensteiner et al., 2016). A medida que se obtenían las secuencias y se les asignaba un haplogrupo, aquellas que no presentaron variantes indígenas, y que, por lo tanto, se asumieron como contaminadas, no se continuaron amplificando y fueron descartadas de análisis posteriores.

4.3.2. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS POR SECUENCIACIÓN MASIVA

En cuanto a las secuencias obtenidas mediante secuenciación masiva, el Centro de Geogenética de la Universidad de Copenhague proporcionó los archivos BAM (Binary Alignment/Map format; Li et al., 2009) del mapeo de las lecturas al genoma mitocondrial correspondientes a dos individuos de interés para esta tesis: el individuo 55698 de Colonia Concordia y el individuo 15736 procedente de Campo Morgan. Se exportaron los datos de las secuencias a un formato leído por el software implementado para los análisis comparativos utilizando un *script* desarrollado por el Dr. Gonzalo Figueiro y el MSc. Lucas Ale para su uso con genomas mitocondriales (Figueiro et al., 2022) en el entorno R 3.6.3 (<http://www.r-project.org/>).

De acuerdo a la información proporcionada por dicho centro, las estadísticas de mapeo de las lecturas al genoma mitocondrial se obtuvieron mediante Qualimap 2.0 (García-Alcalde et al., 2012). En relación a la detección de variantes con respecto a la rCRS se realizó utilizando el programa SNVer 0.5.3 (Wei et al., 2011), y posteriormente se verificaron de forma visual a través del programa IGV 2.3.89 (Thorvaldsdóttir et al., 2013). El análisis de daño al ADN fue llevado a cabo utilizando el paquete MapDamage 2.0 (Jónsson et al. 2013) y la evaluación de contaminación con ADN exógeno fue efectuada mediante el programa ContaMix (Fu et al., 2013).

4.3.3. RECOPIACIÓN DE SECUENCIAS ANTIGUAS Y MODERNAS DE AMÉRICA DEL SUR

Para la realización de análisis comparativos de las secuencias antiguas obtenidas se recopilaron secuencias de HVR del ADNmt de muestras antiguas y modernas de América del Sur. Las mismas fueron obtenidas a partir de la bibliografía (Afonso Costa et al., 2010; Arias et al., 2017; Baca et al., 2014; Barbieri et al., 2011, 2017; Batai & Williams, 2014; Bobillo et al., 2010; Cabana et al., 2006; Cardoso et al., 2013; Carnese et al., 2010; Catelli

et al., 2011; Corella et al., 2007; de Araujo et al., 2015; de Saint Pierre et al., 2012a; 2012b; Fagundes et al., 2008; Fehren-Schmitz et al., 2014; Figueiro et al., 2022; García et al., 2021; Guevara et al., 2020; Horai et al., 1993; Kemp et al., 2009; Lewis et al., 2007; Llamas et al., 2016; Marrero et al., 2007a; 2007b; Mendisco et al., 2014; Moraga et al., 2010; Pagano et al., 2005; Reix et al., 2014; Sala et al., 2010; Sala & Corach, 2014; Sandoval et al., 2013; Sandoval et al., 2009; Sans et al., 2021; Sevini et al., 2014; Simão et al., 2019; Taboada-Echalar et al., 2013; Tamm et al., 2007, Wang et al., 2007) y de las bases de datos *on line*: GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) y EMPOP (<http://empop.org>). Para cada una de las secuencias se le asignó la región geográfica de procedencia, el haplogrupo que le fue determinado, así como los polimorfismos que presenta. Las secuencias incluidas provienen de Argentina, Brasil, Chile, Bolivia, Paraguay, Perú, Colombia y Ecuador (Figura 6). En el Anexo se proporcionan detalles sobre los datos de las secuencias utilizadas de acuerdo al haplogrupo identificado (Tablas anexas 1, 2 y 3).

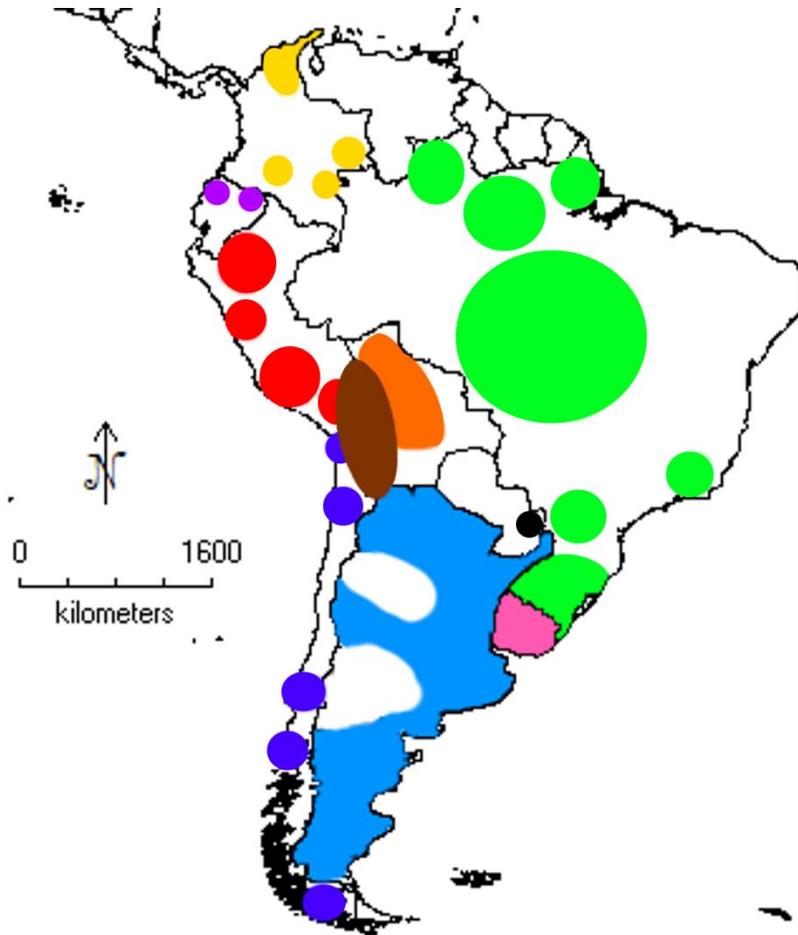


Fig. 6. Países a los cuales pertenecen las poblaciones empleadas para el análisis comparativo. Referencia: amarillo – Colombia; verde – Brasil; violeta – Ecuador; rojo – Perú; marrón – Altiplano peruano-boliviano; naranja– Bolivia; negro – Paraguay; azul – Chile; celeste – Argentina; rosado – Uruguay.

4.3.4. REDES DE HAPLOTIPOS Y AFINIDAD GEOGRÁFICA

Para las secuencias obtenidas de un mismo haplogrupo, se reconstruyeron filogenias intraespecíficas, llamadas redes de haplotipos, utilizando el programa NETWORK versión 5.0.0.3 (Bandelt et al., 1999). Este programa se basa en el método de máxima parsimonia empleando el algoritmo “*Median-Joining*” para la construcción de las redes, en ausencia de recombinación entre las secuencias estudiadas. Se utilizó la opción post-procesamiento de calcular la red más parsimoniosa: *MP calculation* (Polzin

& Daneschmand, 2003), para resolver posibles reticulaciones y obtener los árboles más cortos. Además, se le asignó a cada sitio polimórfico un valor de importancia filogenética relativa para la construcción de la red de acuerdo a las tasas mutacionales descritas por Soares et al. (2009). Se construyeron dos redes de haplotipos para C1d y A2: una abarcando todas las secuencias HVR I por un lado, y otra incluyendo solamente a aquellos individuos que contaran con secuencias HVR I y HVR II. La importancia de analizar ambas redes se debe a que un mayor número de datos, como es el caso de las redes HVR I, permite ampliar las regiones geográficas estudiadas. A su vez, la incorporación al análisis de ambas regiones hipervariables aumenta la resolución de afinidades de acuerdo a un mayor grado de polimorfismo.

4.3.5. ANÁLISIS COMPLEMENTARIOS: MARCADORES NUCLEARES

En una extracción de ácidos nucleicos, el ADN nuclear se encuentra en menor número de copias que el ADNmt, lo cual hace que amplificar secuencias nucleares sea más dificultoso en extractos de ADN antiguo (O'Rourke et al., 2000a). Sin embargo, su análisis es de gran interés dado a que puede aportar información que complemente los estudios de ADNmt. Por ejemplo, el estudio realizado por Mut (2019) para estudiar la estructura poblacional y procesos demográficos en la población uruguaya, a través de los linajes paternos, utiliza marcadores localizados en el cromosoma Y.

El análisis de marcadores del ADN nuclear es de importancia para evaluar su potencial en futuros estudios en poblaciones antiguas. En este trabajo se utilizó el marcador amelogenina para la determinación molecular del sexo (Mannucci et al., 1994) y el gen EDAR, que es de interés dado a que presenta una variante de alta frecuencia en poblaciones indígenas (Hlusko et al., 2018).

4.3.5.1. DETERMINACIÓN DEL SEXO MEDIANTE EL MARCADOR AMELOGENINA

Para establecer la viabilidad del estudio del ADN antiguo nuclear en muestras arqueológicas del oeste, se aplicaron técnicas moleculares para la determinación del sexo utilizadas previamente en el Laboratorio de ADN Antigo (Mut, 2013). Como en la especie humana el sexo es determinado por sus cromosomas, se utilizan marcadores moleculares asociados a los cromosomas sexuales para identificar el sexo. Entre los más utilizados se encuentran el gen SRY (*Sex-determining Region Y*), que se basa en la presencia/ausencia de amplificación de un fragmento de dicho gen (Drobnic, 2006; McKeown et al., 2000), y también el gen codificante de la amelogenina, una proteína presente en el esmalte dental, que tiene una copia en cada cromosoma sexual pero las mismas difieren en su tamaño y secuencia de bases (Sullivan et al., 1993). En el caso del gen SRY, dado que la ausencia de amplificación puede darse porque la PCR no sea exitosa, para evitar falsos negativos, es preferible la utilización de cebadores que amplifiquen fragmentos en ambos cromosomas sexuales (Mannucci et al., 1994). En humanos, los genes que codifican para la proteína amelogenina, AMELX y AMELY, se ubican en la región p22.1-p22.3 del cromosoma X y en la región p11.2 del cromosoma Y, respectivamente (Nakahori et al., 1991; Salido et al., 1992). Los métodos de determinación sexual mediante este gen implican la utilización de cebadores diseñados en las regiones conservadas de ambas copias, que permitan la amplificación de un fragmento que difiere en tamaño en ambos cromosomas. Esto se debe a que la copia del cromosoma X presenta una delección de 6 pb dentro del intrón 1 del gen, lo que genera fragmentos de diferente longitud que pueden fácilmente distinguirse mediante electroforesis en gel (Mannucci et al., 1994). Si el individuo es masculino se observan dos bandas en el gel, una de mayor peso molecular correspondiente a la amplificación en el cromosoma Y, y otra de menor peso correspondiente a la amplificación en X. Si el individuo es femenino se observa una única banda correspondiente a la amplificación del gen en ambos cromosomas X.

4.3.5.1.1. AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LOS GENES AMELX Y AMELY

La determinación molecular del sexo únicamente se realizó para aquellas muestras en las cuales se identificaron haplogrupos indígenas. Se llevó a cabo mediante amplificación por PCR de un fragmento homólogo del gen de la amelogenina, presente en los cromosomas X e Y, utilizando los cebadores diseñados por Mannucci et al. (1994), detallados en la Tabla 5. Los productos de PCR esperados tienen un tamaño de 106 pb para el cromosoma X y 112 pb para el cromosoma Y. Las reacciones de amplificación por PCR se realizaron en un volumen final de 30 μ L, conteniendo los mismos componentes del *mix* utilizados para la amplificación de ADNmt, y también agregando 3,0 μ L de ADN molde. Las condiciones de ciclado también se utilizaron las mismas que para el ADNmt, excepto por la temperatura de *annealing*, que, de acuerdo a estos cebadores, fue de 55°C.

Tabla 5. Cebadores utilizados para la determinación molecular del sexo y el tamaño esperado del fragmento del gen amelogenina.

Cebador	Secuencia	Tamaño amplicón (pb)	Ref.
AMEL F	CCC TGG GCT CTG TAA AGA ATA GTG	106 en cromosoma X	Mannucci et al. (1994)
AMEL R	ATC AGA GCT TAA ACT GGG AAG CT	112 en cromosoma Y	

La verificación del éxito de la PCR se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa 4%. Posteriormente, para la discriminación de alelos se corrieron los productos de PCR en un gel de poliacrilamida (acrilamida/bisacrilamida 29:1) al 12% (p/v) con un tiempo de corrida de la electroforesis de 5 horas a un voltaje constante de 80 V. Se tiñó el gel con nitrato de plata siguiendo el procedimiento descrito en Sanguinetti et al. (1994).

4.3.5.2. ESTUDIO DE LA VARIANTE T1540C DEL GEN EDAR

El genotipado del polimorfismo EDAR T1540C (rs3827760) fue realizado mediante PCR y posterior secuenciación Sanger. Para ello, se diseñaron cebadores específicos que amplifican un fragmento que contiene el sitio variable T1540C, siguiendo los pasos y utilizando los mismos programas que los descritos en la sección 4.2.3.1. Los cebadores seleccionados se detallan en la Tabla 6.

Tabla 6. Cebadores diseñados para amplificar el polimorfismo T1540C del gen EDAR. La secuencia leída y analizada corresponde a la hebra sentido (+).

Cebador	Posición (5'-3')	Secuencia	Tamaño amplicón	Ref.
EDAR F	1447-1464	ATG CGG TCA AAG AGT TG	124 pb	Este estudio
EDAR R	1570-1553	TCA GCT CCA CGT ACA AC		

Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo como fue descrito tanto para ADNmt como para los genes AMELX y AMELY, utilizando una temperatura de *annealing* de 50°C.

Los productos obtenidos fueron verificados y purificados siguiendo los mismos pasos descritos para las HVR I y II en la sección 4.2.3.2. Los fragmentos purificados también fueron secuenciados utilizando el método de Sanger en las plataformas de Macrogen (Seúl, Corea del Sur) y del Institut Pasteur de Montevideo.

Las secuencias de ADN obtenidas se alinearon con una secuencia del gen EDAR extraída del GenBank (NG_008257.1) en el programa MEGA versión X (Kumar et al., 2018), revisándose la presencia de la variante T1540C en forma manual.

5. RESULTADOS

5.1. EXTRACCIÓN DE ADN

La tabla 7 muestra el total de muestras analizadas y los resultados obtenidos en las extracciones de cada pieza, así como el tipo de material utilizado. En las que se pudo obtener secuencias de las HVR I y II parciales o completas, se asignaron los haplogrupos correspondientes al conjunto de polimorfismos que presentaron mediante Haplogrep v2.2 (Weissensteiner et al., 2016). De las 17 muestras analizadas (Tabla 8), una (S2) no presentó cantidades suficientes de ADN en la extracción, y un total de tres muestras no pudieron ser amplificadas mediante PCR (S2, 47992 y 47996 BIS). Únicamente dos de las muestras presentaron mutaciones que permitieron incluirlas en linajes indígenas (S4 y 47995) y las restantes no pudieron ser incluidas como linajes nativos. Estos resultados representan una tasa de éxito global de 11,8% en la extracción de ADN endógeno antiguo. Los dos individuos exitosamente extraídos y amplificados en este trabajo presentan una preservación excepcional en comparación con las otras muestras, en especial el individuo S4, cuyas amplificaciones fueron exitosas para todos los marcadores utilizados.

Tabla 7. Resultados de las extracciones de ADN de los individuos analizados. Se incluye el número de experimentos de PCR realizado por muestra.

Individuo	Material	ADN	Concentración (ng/uL)	Número de PCR
A1	Segundo molar superior derecho	Sí	No se obtuvo lectura	18
A2	Temporal derecho	Sí	9,33	19
	Segundo molar superior izquierdo	Sí	0,60	22
S1	Fragmento de temporal derecho	Sí	4,27	11
S2	Temporal izquierdo	No	Fuera de rango	8

S3	Hueso largo y Costilla	Sí	8,13	18
S4	Petroso	Sí	6,10	19
37974	Tercer molar inferior	Sí	1,63	13
41101	Cuarto metacarpo derecho	Sí	0,42	4
47992	Fragmento de Costilla	Sí	10,70	2
47994	Molar	Sí	20,00	8
	Temporal izquierdo	Sí	4,28	5
47995	Segunda costilla izquierda	Sí	7,22	21
47996	Fragmento de Costilla	Sí	2,67	7
47996 BIS	Fragmento de hueso largo	Sí	0,74	8
51983	Petroso izquierdo	Sí	3,66	19
55698	Diente	Sí	22,90	13
	Metacarpo	Sí	11,40	4
	Segundo molar inferior izquierdo	Sí	3,83	10
55961	Metacarpo	Sí	2,75	5
61395	Falange	Sí	8,50	4
			1,74	4

Tabla 8. Segmentos secuenciados en las HVR I y II, número de amplificaciones para cada fragmento, mutaciones encontradas en las secuencias de cada individuo y linaje mitocondrial inferido a través del programa Haplogrep v2.2 (Weissensteiner et al., 2016).

Muestra	Segmentos secuenciados de la HVR I	Número de amplif.	Segmentos secuenciados de la HVR II	Número de amplif.	Mutaciones con respecto a la rCRS	Linaje mitocondrial inferido
A1	16143-16251 16277-16366	3 3	8-152	1	16304Y 16366G 73G 152C	n.d. ⁽¹⁾

A2	16065-16225 16280-16422	8 4	8-152	1	16073T 16077T 16111T 16183C 16185T 16186T 16187T 16189C 16311C 16390A 73G 112Y 114Y 152C	n.d. ⁽¹⁾
S1	16143-16422	4			16223T 16294Y 16296Y 16304Y	n.d. ⁽¹⁾
S3.1	16143-16358	3			16223T	n.d.
S3.2	16023-16225 16322-16422	2 1	8-152 242-382	1 1	16093C 16172.1C 16399R 73G 152C 263G 295Y	n.d. ⁽¹⁾
S4	16073-16251 16266-16421	3 2	48-382	6	<u>16111T</u> 16131C 16189C <u>16192T</u> 16223T <u>16290T</u> <u>16319A</u> <u>16362C</u> 73G <u>146C</u> <u>153G</u> <u>235G</u> 263G	A2a ⁽²⁾
37974	16023-16421	5	8-152	1	16111T 16183C 16189C 16224C 16311C 73G 152C	n.d. ⁽³⁾
41101	16023-16275 16280-16365	3 1			16079Y 16217C 16248T 16311C	n.d. ⁽¹⁾
47994	16065-16266 16288-16365	4 1			16224Y 16311C	n.d. ⁽³⁾
47995	16023-16422	6	8-382	6	<u>16051G</u> 16223T <u>16298C</u> <u>16325C</u> <u>16327T</u> 73G 146C 195C 263G <u>290-291d</u>	C1d ⁽²⁾
47996	16065-16422	5			16126C 16294Y 16296Y	n.d. ⁽¹⁾
51983	16140-16225	1				n.d. ⁽¹⁾
55698	16106-16422	13			16223T 16320T 16325C 16399G	n.d. ⁽¹⁾
55961	16162-16374	2			16162T 16223T 16320T	n.d. ⁽¹⁾
61395	16106-16422	6			16223T 16320T 16399G	n.d. ⁽¹⁾

n.d. representa "no determinado". ⁽¹⁾ Probable contaminación previa a los análisis moleculares; ⁽²⁾ Linaje indígena; ⁽³⁾ Probable contaminación en el laboratorio. Variantes subrayadas corresponden a las que definen el linaje indígena identificado (van Oven & Kayser, 2009). Variantes en negrita indican mutaciones adicionales.

5.1.1. CONTAMINACIÓN DE LAS EXTRACCIONES

En los blancos de extracción no se detectaron trazas de contaminación ni tampoco en los controles negativos de PCR. Sin embargo, sólo los individuos S4 y 47995 presentan conjuntos de mutaciones diagnósticas para alguno de los haplogrupos fundadores de ADNmt de América (Tabla 8). Por lo tanto, se asume que las extracciones de las demás muestras fueron contaminadas con ADN exógeno de investigadores previos al análisis de ADN o de integrantes del laboratorio. Particularmente los individuos 37974 y 47994 presentan, respectivamente, cuatro y dos de las variantes del motivo 16111T-16189C-16224C-16311C correspondiente al haplogrupo K de uno de los investigadores del laboratorio (concretamente, el Dr. Gonzalo Figueiro).

Resalta la presencia de variantes relacionadas con haplogrupos mitocondriales africanos en tres de los 17 individuos analizados (55698, 55961 y 61395). Solamente una integrante del laboratorio presenta un linaje africano, sin embargo, los motivos de secuencia no coinciden completamente con los encontrados en los individuos analizados, lo cual sugiere que una contaminación reciente es una explicación improbable. Si el resultado es producto de contaminación, es probable que haya sido introducida antes de haber sido colectada para la realización de análisis moleculares.

La transición C→T en la posición 16325 en la secuencia del individuo 55698 (Tabla 8) podría ser considerada como producto del daño *post-mortem* del ADN (Hofreiter et al., 2001). Sin embargo, dado a la presencia en varias muestras de dobles picos podría tratarse de contaminación con ADN exógenos provenientes de diferentes fuentes o por contaminación cruzada con otras muestras presentes en la misma tanda de extracción. Esto podría explicar la presencia de las variantes 16223T, 16320T y 16399G en las muestras 55961 y 55698 (Tabla 8), dado a su extracción conjunta con la muestra 61395 y a que se obtuvo el mismo haplogrupo (L3e2) para las tres amplificaciones.

Otros de los problemas en la asignación de haplogrupos se observa en la muestra S3.1, que el programa indica como perteneciente al haplogrupo N, pero en base a la presencia de una sola variante (16223T). El fragmento amplificado es muy pequeño para la asignación de un haplogrupo de manera eficiente, por lo cual esta muestra no es

considerada en posteriores análisis, dado a que no puede detectarse si es ADN endógeno o contaminación.

5.2. ANÁLISIS DE LOS DATOS

5.2.1 ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS HVR I Y II

En cuanto a las secuencias de las HVR I y II de los individuos que pudieron asignarse a haplogrupos americanos, S4 pertenece al haplogrupo A2 y 47995 pertenece al subhaplogrupo C1d (Tabla 8). El haplogrupo A2 se caracteriza por las mutaciones 146C, 153G, 235G, 16111T, 16290T, 16319A, 16362C. Para el caso del subhaplogrupo C1d, se define por las siguientes variantes 249d, 290-291d, 16051G, 16298C, 16325C, 16327T.

De acuerdo a las mutaciones presentes en el individuo S4, los resultados obtenidos utilizando el programa Haplogrep indicaban su pertenencia al linaje A2a. Sin embargo, se consideró improbable debido a que dicho subhaplogrupo, hasta el momento, se encuentra restringido a territorios de América del Norte (Tackney et al., 2019). Además, la variante en la HVR I que define al subhaplogrupo (16192T) también ha sido encontrada en otras poblaciones de América del Sur asociado a diferentes linajes dentro del haplogrupo A2 (e.g. García et al., 2021; Llamas et al., 2016). Por su parte, la mutación 16051G en las secuencias obtenidas del individuo 47995 establece su correspondencia al subhaplogrupo C1d, que está presente en poblaciones indígenas americanas (Figueiro et al., 2011).

5.2.1.1. AFINIDADES GEOGRÁFICAS

A través de la búsqueda en las bases de datos de GenBank y EMPOP para el individuo S4 se encontraron variantes compartidas con individuos de poblaciones modernas de Brasil (Cardena et al., 2013; Ramallo et al., 2013), y de poblaciones

modernas de la región norte central de Venezuela (Castro de Guerra et al., 2012). En el caso del individuo 47995 se obtuvieron coincidencias con individuos de poblaciones modernas de Brasil (Cardena et al., 2013; Ramallo et al., 2013), individuos históricos de Tierra del Fuego (Motti et al., 2020), y poblaciones modernas de la región norte central de Venezuela (Castro de Guerra et al., 2012). Sin embargo, estas búsquedas no permitieron encontrar a las secuencias más próximas en relación a todas las variantes.

En las redes de haplotipos generadas a través del software *Network*, cada círculo corresponde a un único haplotipo, en donde el diámetro es proporcional al número de secuencias representadas. La distancia entre haplotipos está basada en el número de mutaciones que los diferencian. Los nodos con menos casos corresponden en general a haplotipos derivados.

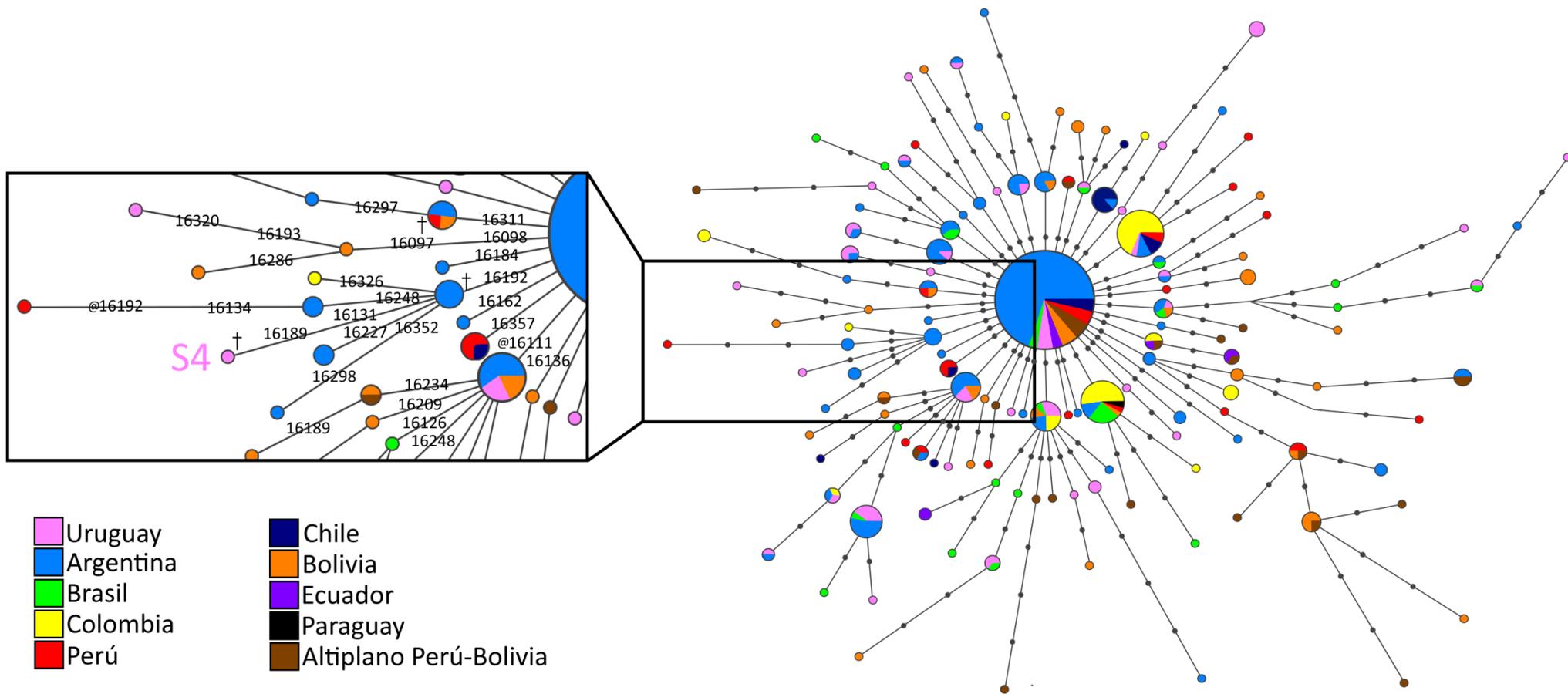


Fig. 7. Red de haplotipos de las secuencias recopiladas del linaje A2 según HVR I. La numeración corresponde a la posición de la mutación en la rCRS (Andrews et al., 1999). El haplotipo central está definido por las mutaciones 16111T, 16223T, 16290T, 16319A y 16362C con respecto a rCRS. El símbolo @ indica reversión al estado ancestral del nucleótido. La cruz indica individuos antiguos. Se señala la posición de la muestra S4 en la red.

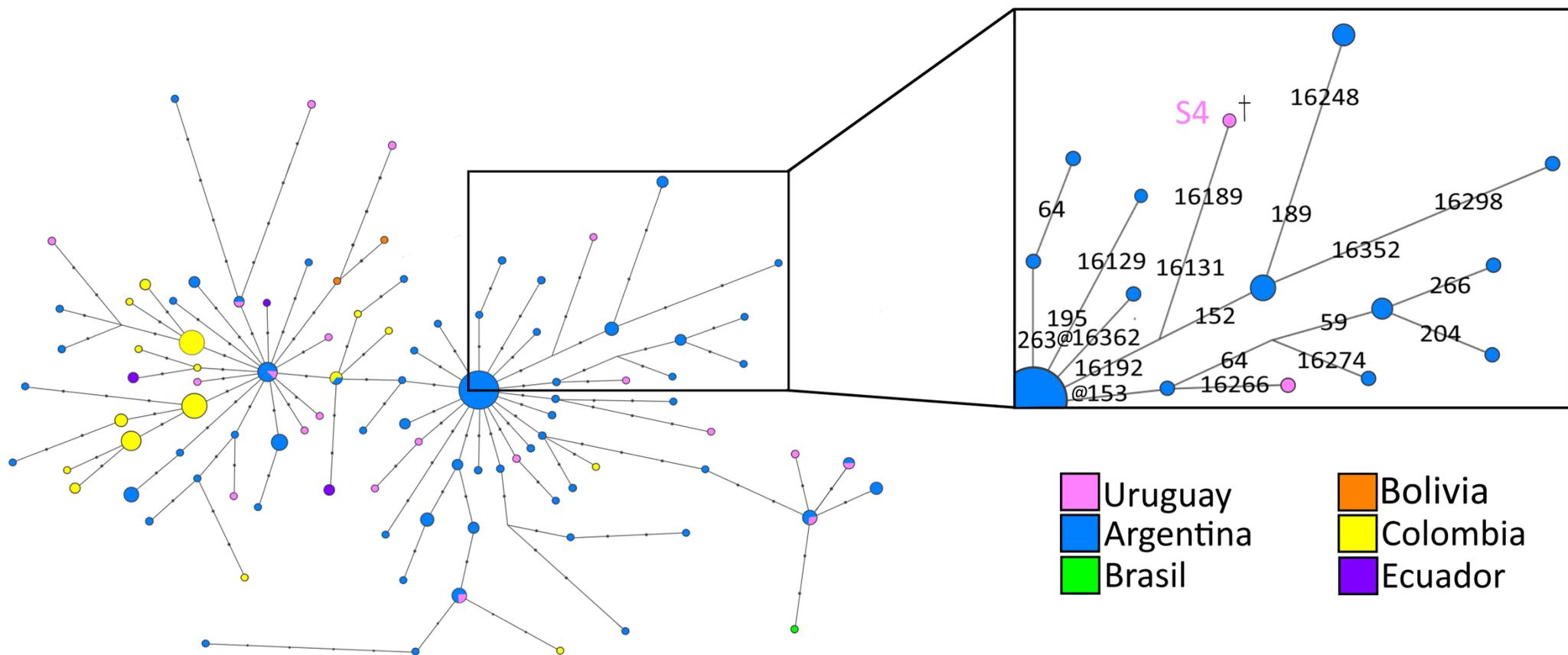


Fig. 8. Red de haplotipos de las secuencias recopiladas del linaje A2 según HVR I y II. La numeración corresponde a la posición de la mutación en la rCRS (Andrews et al., 1999). El símbolo @ indica reversión al estado ancestral del nucleótido. La cruz indica individuos antiguos. Se señala la posición del individuo S4.

Con respecto al haplogrupo A2, el individuo en estudio S4 corresponde a un linaje derivado en ambas redes (Figuras 7 y 8). La red de haplotipos que incluye ambas regiones hipervariables muestra una topología multimodal (Figura 8), lo cual se asocia a que en la base de datos utilizada las secuencias de Colombia en su mayoría corresponden a individuos de una misma población indígena con baja diversidad de haplotipos.

El individuo S4 comparte una mutación en la posición 16192 fundamentalmente con poblaciones de Argentina tanto para muestras antiguas (Llamas et al., 2016) como modernas de la región sur (Bobillo et al., 2010; de Saint Pierre et al., 2012b) y central (Catelli et al., 2011; García et al., 2021), pero también con individuos modernos de Perú (Sandoval et al., 2009) y Colombia (Tamm et al., 2007). Los polimorfismos particulares que presenta S4 corresponden a las posiciones 16131 y 16189. La mutación 16131C no fue hallada en ningún otro individuo de la base de datos. En la red de haplotipos que incluyen la HVR II, S4 también deriva de uno de los haplotipos centrales encontrados en muestras del norte de Argentina (Catelli et al., 2011; Tamm et al., 2007) y Argentina central a través de la mutación en la posición 16192 (Catelli et al., 2011; García et al., 2021).

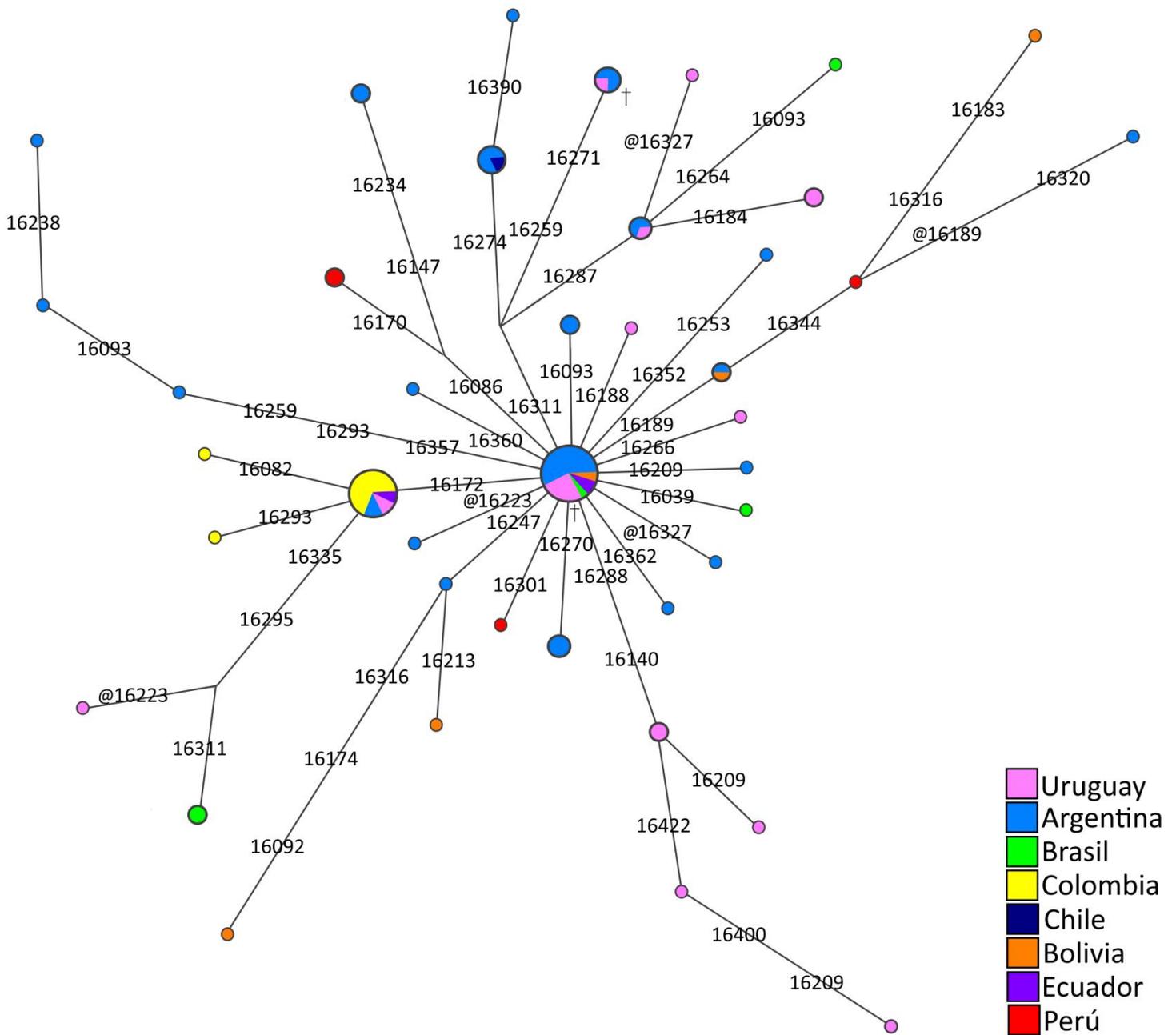


Fig. 9. Red de haplotipos de las secuencias recopiladas del linaje C1d según HVR I. La numeración corresponde a la posición de la mutación en la rCRS (Andrews et al., 1999). La muestra antigua perteneciente al haplotipo nodal, definido por las mutaciones en las posiciones 16051, 16223, 16298, 16325 y 16327 con respecto a la rCRS, es el individuo 47995. El símbolo @ indica reversión al estado ancestral del nucleótido. Mediante una cruz se indican los individuos de poblaciones antiguas.

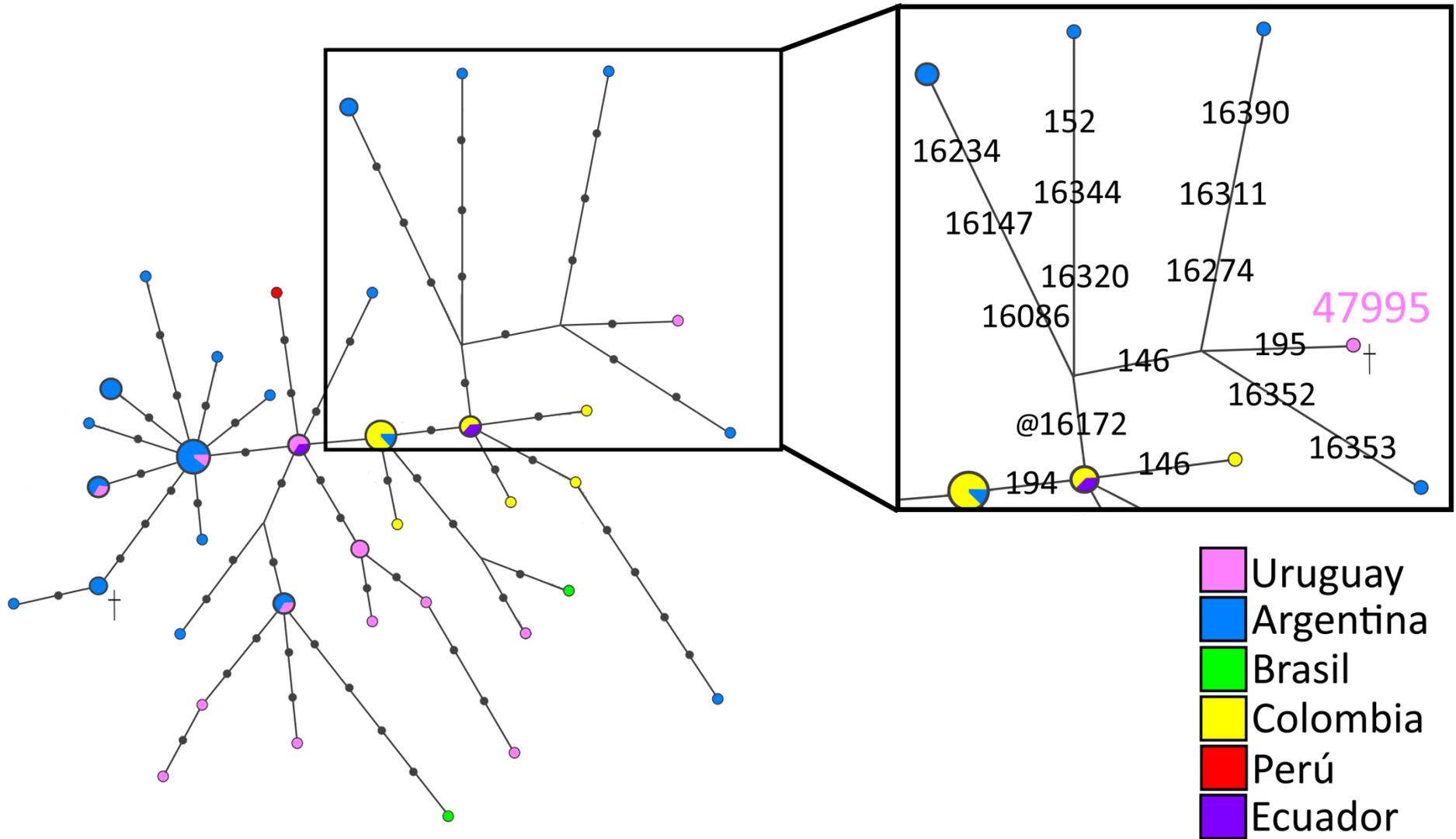


Fig. 10. Red de haplotipos de las secuencias recopiladas del linaje C1d según HVR I y II. La numeración corresponde a la posición de la mutación en la rCRS (Andrews et al., 1999). El símbolo @ indica reversión al estado ancestral del nucleótido. La cruz indica individuos antiguos. Se señala al individuo 47995.

En la muestra 47995 se registró la mutación 16051G característica del subhaplogrupo C1d. Asimismo, presenta el motivo mutacional del haplogrupo C1 16223T-16298C-16325C-16327T. También presenta las mutaciones en la HVR II que son también características del haplogrupo C: 73G, 263G, 290-291d, así como transiciones en las posiciones 146 y 195. No pudo detectarse la delección diagnóstica del haplogrupo C en la posición 249, dado a los múltiples picos en ese tramo de secuencia.

En la red de haplotipos correspondientes al subhaplogrupo C1d de la HVR I, el individuo de Colonia Concordia, 47995, presenta el haplotipo ancestral, muy frecuente en poblaciones modernas (Figura 9). Sin embargo, cuando también se considera la HVR II (Figura 10) aparece como un linaje derivado no compartido con ninguna otra población; su afinidad más próxima es con otros dos linajes presentes en Argentina que comparten la variante 146C, uno correspondiente a un individuo actual de Argentina central (Catelli et al., 2011), y otro proveniente de un individuo también actual de la región sur de Argentina (Bobillo et al., 2010). Si bien derivan de un haplotipo no presente en la muestra analizada, con el cual los tres individuos comparten la variante en la posición 146, la muestra antigua se distancia un paso mutacional mientras que las muestras argentinas presentan una distancia de dos pasos mutacionales para el individuo de la región central y tres para el individuo del Sur (Figura 10). La mutación particular que distingue a la muestra antigua está en la posición 195.

5.2.2. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS MITOCONDRIALES COMPLETAS

Los datos de la secuenciación masiva para el individuo 55698 generaron una cobertura de 85,612% (14185/16569 pb) y una profundidad media de 3,36x, mientras que para el individuo 15736 la cobertura alcanzó el 99,994% (16568/16569 pb) y una profundidad media de 22x.

En base al análisis de las variantes presentes en las secuencias mitocondriales completas de los individuos 55698 y 15736 usando a la rCRS como referencia, se estableció que ambos pertenecían al subhaplogrupo fundador americano C1b (Tabla 9).

Tabla 9. Variantes detectadas en las secuencias mitocondriales completas. Se utiliza como referencia la rCRS (Andrews et al., 1999).

Posición	rCRS	55698	15736
60	T	T	C
61	C	C	T
73	A	G	G
207	G	G	A
234	A	A	G
249	A	<u>d</u>	<u>d</u>
263	A	G	G
290	A	<u>d</u>	<u>d</u>
291	A	<u>d</u>	<u>d</u>
309	C	CC	CC
489	T	C	C
493	A	<u>G</u>	<u>G</u>
522	C	C	d
523	A	A	d
750	A	G	G
961	T	T	C
1438	A	G	G
1717	T	T	C
2706	A	G	G
3552	T	<u>A</u>	<u>A</u>
4715	A	G	G
4769	A	G	G
4952	C	C	T
7028	C	T	T
7196	C	A	A
8584	G	A	A
8701	A	G	G
8770	A	A	G
9540	T	C	C

9545	A	<u>G</u>	<u>G</u>
9581	T	T	C
10398	A	G	G
10400	C	T	T
10873	T	C	C
11719	G	A	A
11914	G	<u>A</u>	<u>A</u>
12705	C	T	T
13145	G	A	G
13263	A	<u>G</u>	<u>G</u>
14318	T	<u>C</u>	<u>C</u>
14766	C	T	T
14783	T	C	C
15043	G	A	A
15301	G	A	A
15326	A	G	G
15487	A	T	T
16209	T	C	T
16223	C	T	T
16298	T	C	C
16325	T	<u>C</u>	<u>C</u>
16327	C	C	<u>I</u>

Variantes subrayadas indican las mutaciones que definen el subhaplogrupo C1b con respecto al haplogrupo ancestral M8. Variantes resaltadas en negrita refieren a mutaciones adicionales. Las variantes "CC" indican una inserción de la base C en la posición indicada; "d" indica delección.

El individuo 15736 presenta las mutaciones diagnósticas del haplogrupo C1 y la mutación 493G que define el linaje C1b. El individuo 55698 presenta las mismas mutaciones diagnósticas excepto en la posición 16327, en donde se observa una reversión T→C.

Se identificaron varias modificaciones en las moléculas de ADN a través de diferencias en las lecturas para las muestras, correspondiente a daños en la cadena

frecuentes en el ADN antiguo y que por lo tanto fueron ignoradas para evitar falsas afinidades entre las muestras. En el ejemplo de la Figura 11a correspondiente a un tramo de 217 pb dentro de la región codificante, se observaron las transiciones C→T presentes en rojo y G→A en verde (Figura 11a), que se consideraron alteraciones *post-mortem* del ADN debido a su presencia sólo en algunas lecturas. La transición T→C, que figura en azul, está presente en la gran mayoría de las lecturas, por lo cual se consideró auténtica en ambos individuos estudiados. Las variantes detectadas en el resto del genoma mitocondrial fueron analizadas siguiendo el criterio anterior.

El análisis de daño al ADN realizado con el paquete MapDamage permite analizar la autenticidad del ADN antiguo a través del patrón de desaminación de citosinas, siendo frecuente la observación de una elevada tasa de desaminación en el extremo 5', un aumento de las tasas de sustitución C→T hacia el inicio de los *reads* secuenciados y un complementario aumento de G→A hacia el final de los *reads* (Jónsson et al. 2013). El gráfico de incorporación de bases artefactuales por desaminación de citosinas muestra el patrón esperado para el caso de Colonia Concordia (Figura 11b, izquierda), basado en bibliotecas de doble hebra, en el que se constatan transiciones C→T en el extremo 5' y las transiciones complementarias (G→A) en el extremo 3' de las lecturas. La secuenciación de Campo Morgan (Figura 11b, derecha) se basa en bibliotecas de hebra simple, lo que genera la presencia únicamente de transiciones C→T cercanas a los puntos de ruptura del ADN en los extremos de las lecturas. La tasa disminuida de transiciones se debe a que la muestra de Campo Morgan fue tratada con USER (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE.UU.), conteniendo Uracil ADN glicosilasa, antes de la preparación de la biblioteca, que elimina los uracilos producto de la desaminación de citosinas. El análisis de contaminación mediante Contamix rindió estimativos de 0,17% de las lecturas en el individuo 55698 y 0,36% en el individuo 15736.

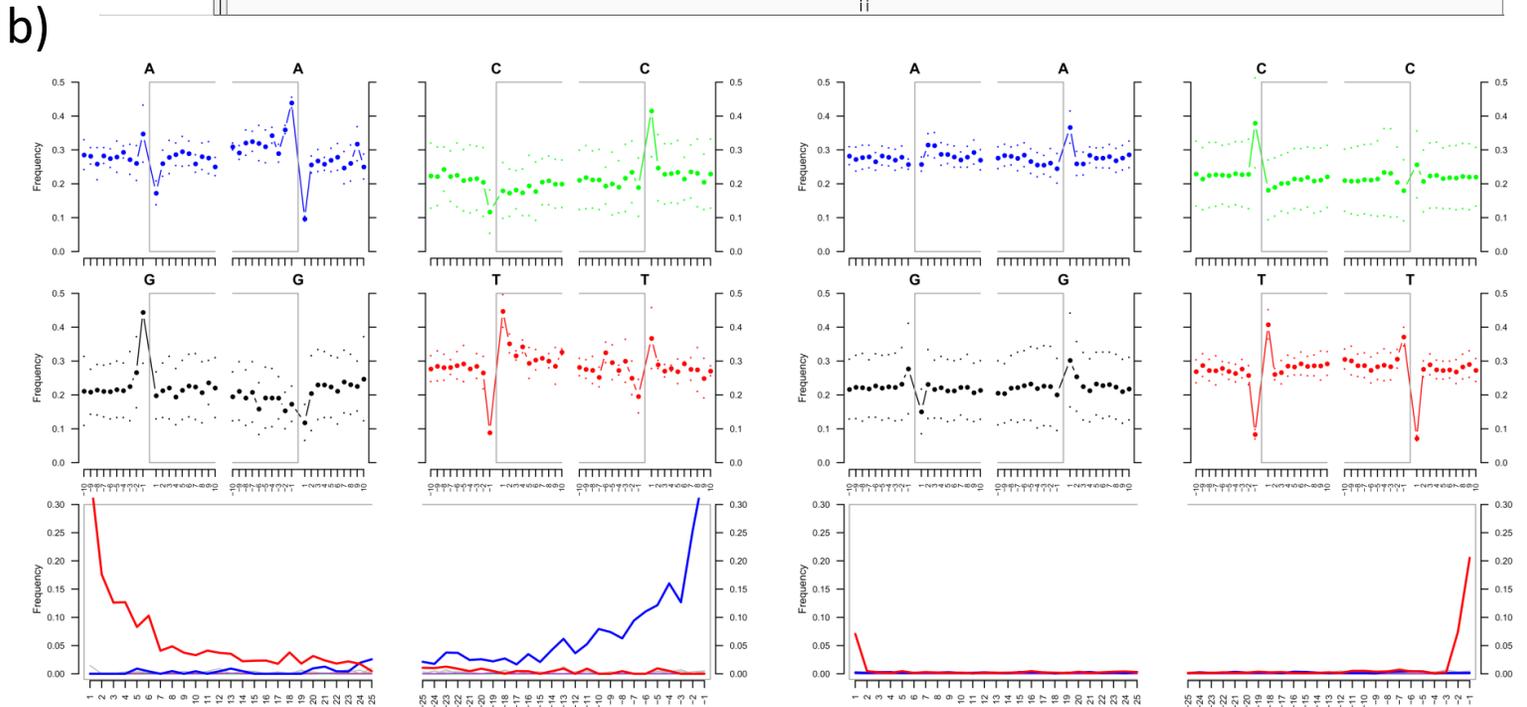
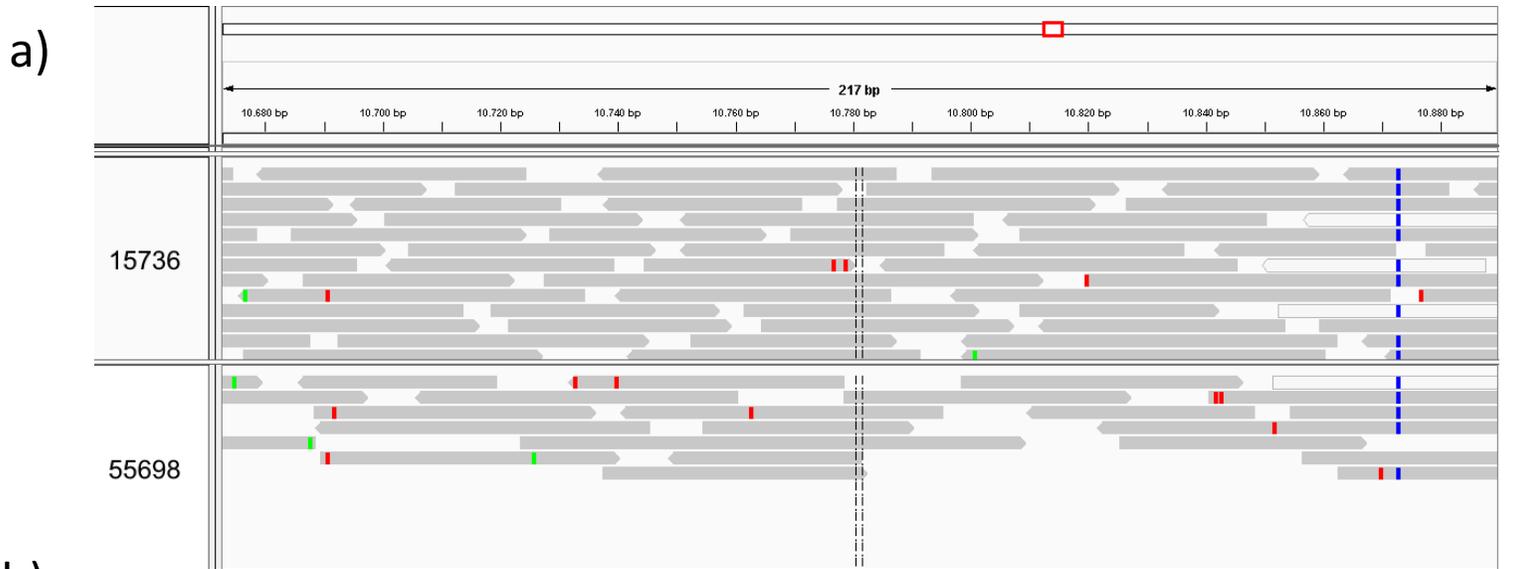


Fig. 11. a) Visualización de las secuencias mitocondriales completas de las muestras 15736 y 55698. En la figura pueden observarse las diferencias de las bases coloreadas con la secuencia de referencia como producto del daño al ADN. En rojo timina, en verde adenina y en azul citosina. Se utilizó para la visualización de las lecturas la herramienta IGV (Thorvaldsdóttir et al., 2013). b) Resultados de los análisis de autenticidad de las secuencias obtenidas mediante secuenciación masiva utilizando el paquete MapDamage 2.0 (Jónsson et al. 2013). A la izquierda se observa los gráficos correspondientes a la muestra 55698 de Colonia Concordia. Se observa que hacia los extremos 5' y 3' de las lecturas hay un aumento de sustituciones C-T y G-A respectivamente. Los gráficos de la derecha corresponden a la muestra 15736 del sitio Campo Morgan, en cuyos extremos sólo puede detectarse las sustituciones C-T dado a que corresponden a bibliotecas monohebra.

Para los individuos pertenecientes al subhaplogrupo C1b, como consisten en genomas mitocondriales completos el nivel de diversidad es mayor (Figura 12). Ambos corresponden a linajes particulares en una red donde no está representado el linaje ancestral del cual derivan las ramas restantes. El individuo 15736 de Campo Morgan comparte una mutación en la posición 207 con otros linajes propios de la región central de Argentina, representados por un individuo moderno y cuatro antiguos (García et al., 2021). Además, otros individuos modernos de Uruguay también forman clados separados con individuos de Argentina. Sin embargo, y a semejanza con lo encontrado en los demás individuos de Colonia Concordia, la secuencia de 55698 representa un linaje particular. Cabe destacar que otros genomas tanto modernos como antiguos de Uruguay también forman ramas fuertemente derivadas de los otros individuos en estudio.

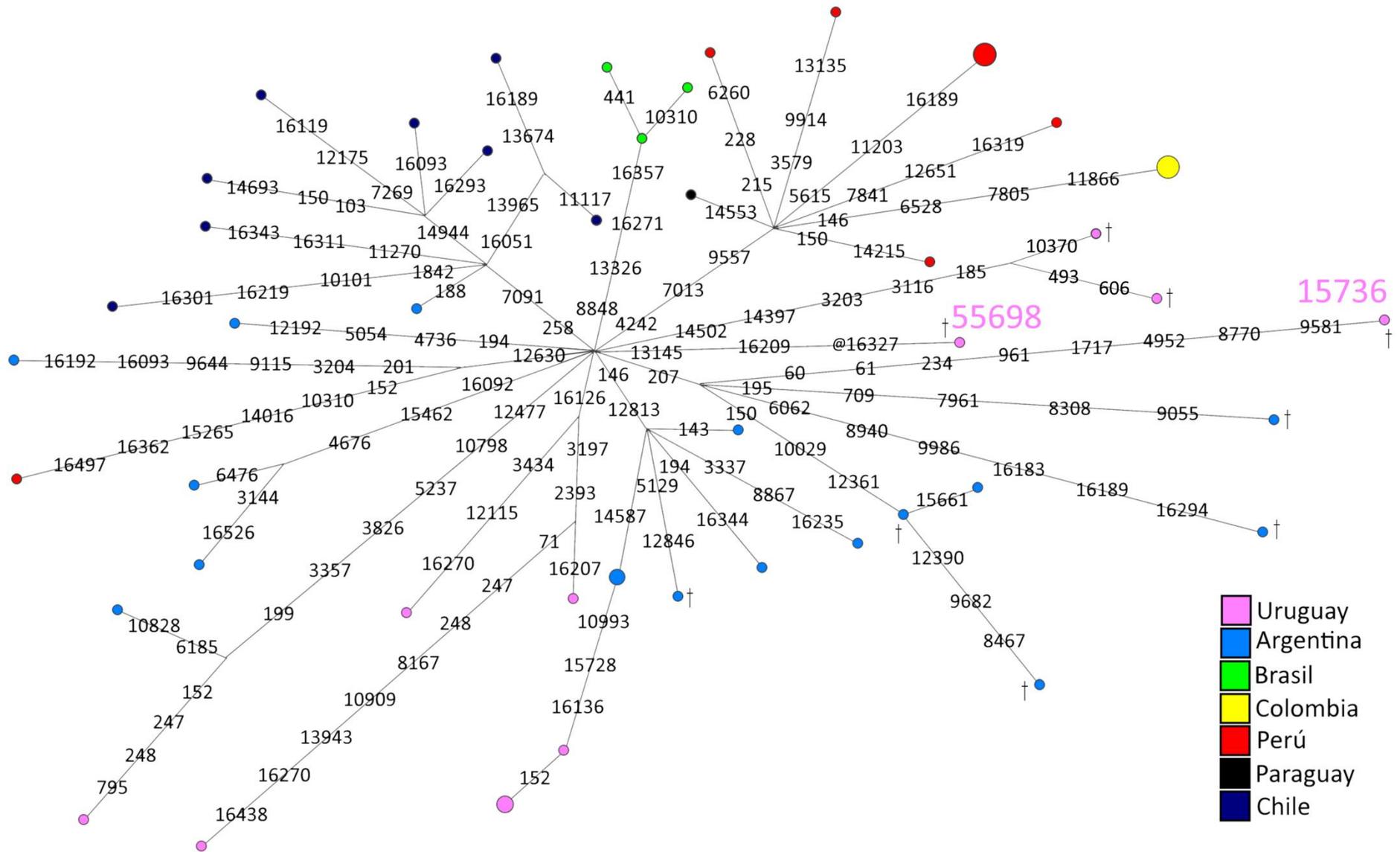


Fig. 12. Red de haplotipos de las secuencias mitocondriales completas recopiladas del linaje C1b. La numeración corresponde a la posición de la mutación en la rCRS (Andrews et al., 1999). El símbolo @ indica reversión al estado ancestral del nucleótido. La cruz indica individuos antiguos. Se señala la posición de los individuos 15736 y 55698 correspondientes a los sitios Campo Morgan y Colonia Concordia, respectivamente.

En líneas generales, cuando comparamos a los individuos de Colonia Concordia y Campo Morgan con secuencias de diferentes poblaciones sudamericanas, los individuos del oeste de Uruguay analizados se aproximan a secuencias de Argentina.

5.2.3. ANÁLISIS COMPLEMENTARIOS: MARCADORES NUCLEARES

En virtud de que solamente se obtuvieron secuencias de ADNmt endógeno para dos individuos del total de la muestra analizada, los experimentos de PCR con marcadores nucleares únicamente se realizaron con dichos individuos.

5.2.3.1. DETERMINACIÓN DEL SEXO MEDIANTE EL MARCADOR AMELOGENINA

La amplificación de los marcadores del cromosoma X e Y en el gen de la amelogenina se efectuó en un número total de cinco experimentos de PCR. Para el individuo S4 se obtuvieron cuatro amplificaciones exitosas, en dos de las cuales se observó un patrón de dos bandas, correspondiente a la amplificación de fragmentos en los cromosomas X e Y (S4_1 y S4_2 en las Figura 13 y 14). En los restantes dos experimentos se observó una banda única de aproximadamente 112 pb, lo cual corresponde a la amplificación en el cromosoma Y (S4_3 y S4_4 en las Figura 13 y 14). Estos resultados apuntan a que el individuo S4 es masculino. Los resultados para el individuo 47995 no fueron tan claros: En dos de las amplificaciones exitosas para esta muestra se obtuvo una única banda de 106 pb (47995_2 y 47995_4 en las Figuras 13 y 14), mientras que en una tercera amplificación se observó un patrón de dos bandas (47995_1 en las Figuras 13 y 14).

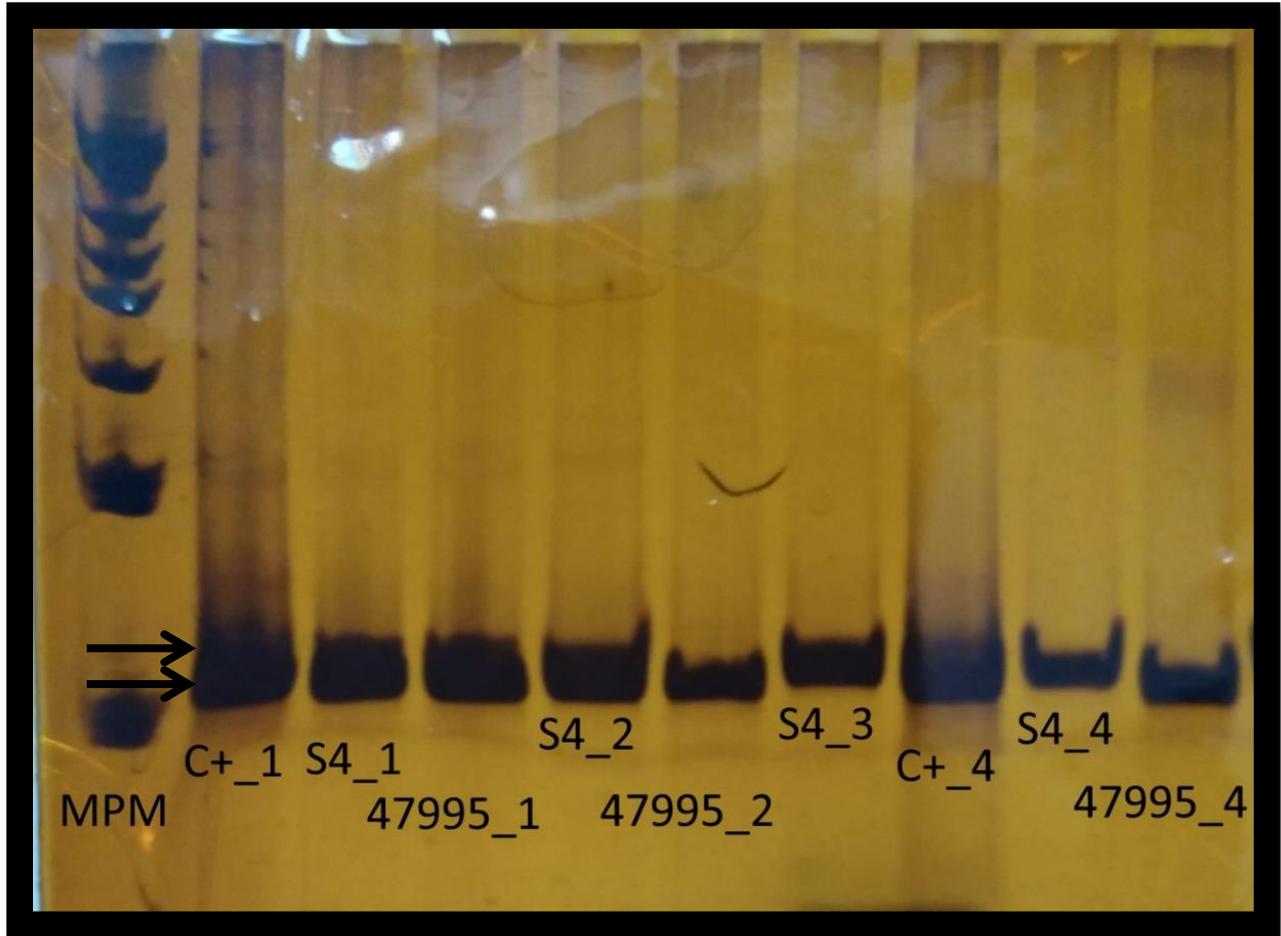


Fig. 13. Visualización de las bandas obtenidas para la amplificación de los genes AMEL X y AMELY en gel de poliacrilamida. C+_1 y C+_4 corresponden a los controles positivos, mientras que S4_1-S4_4 corresponden a cuatro amplificaciones del individuo S4, y 47995_1, 47995_2 y 47995_4 corresponden a las tres amplificaciones obtenidas para el individuo 47995. MPM: marcador de peso molecular en múltiplos de 100 pb; la banda inferior es de 100 pb. Las flechas marcan la posición de las bandas.

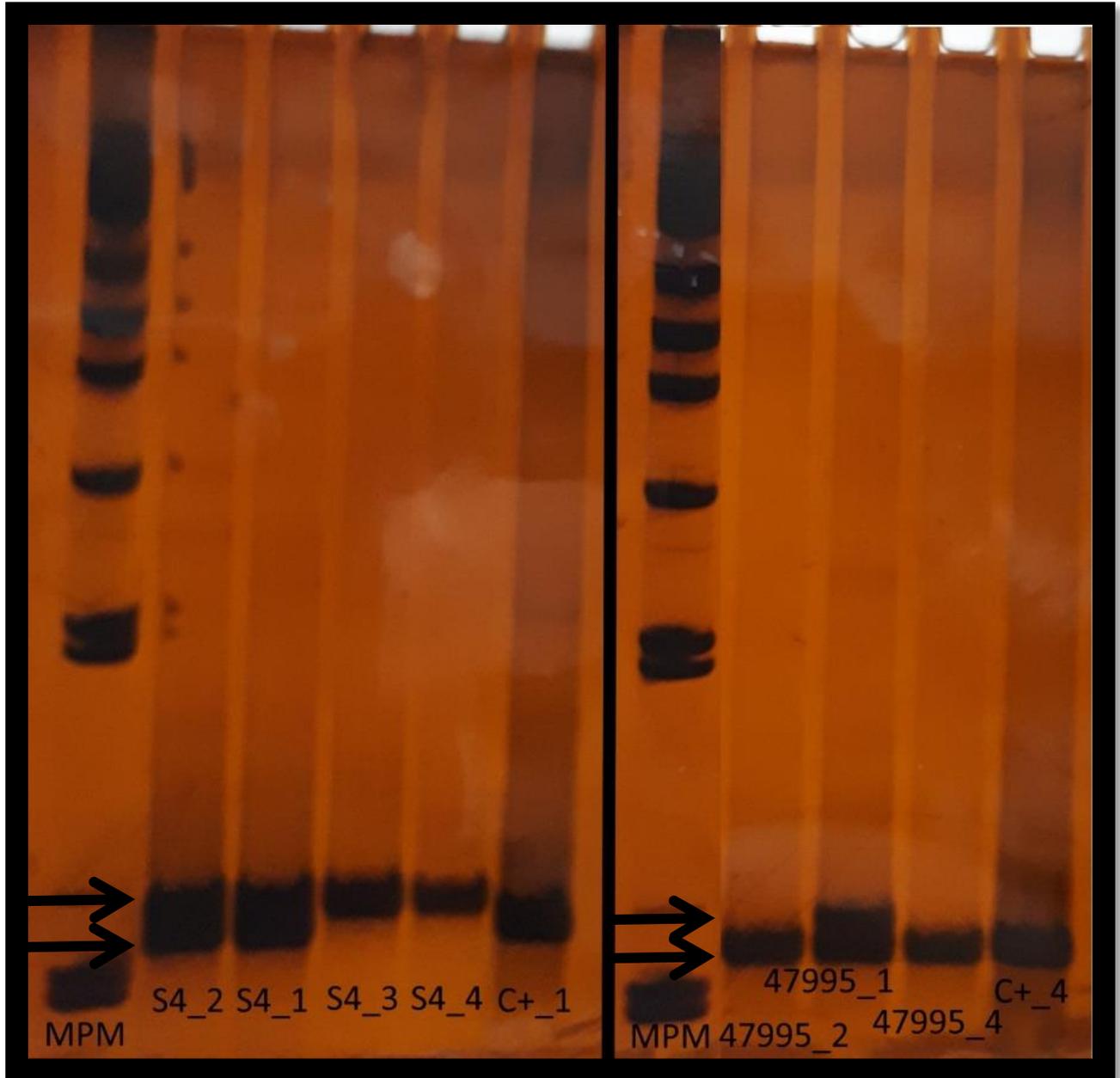


Fig. 14. Confirmación de los resultados obtenidos en la amplificaciones de los genes AMEL X y AMEL Y. Se utilizan las mismas referencias que en la Fig. 13. Las flechas marcan la posición de las bandas.

5.2.3.2. ESTUDIO DE LA VARIANTE T1540C DEL GEN EDAR

Se realizaron siete intentos de amplificación del gen EDAR utilizando los cebadores diseñados; en ninguno se pudo amplificar un fragmento para el individuo 47995, y en dos

se amplificó un fragmento correspondiente a la muestra S4. La secuencia obtenida presentó la variante asociada al diente en pala, correspondiente a la mutación de T a C en la posición 1540, siendo el individuo homocigota para dicha variante. En la Figura 15 se muestran los ferogramas obtenidos, donde se resalta un único pico para C en EDAR 1540.

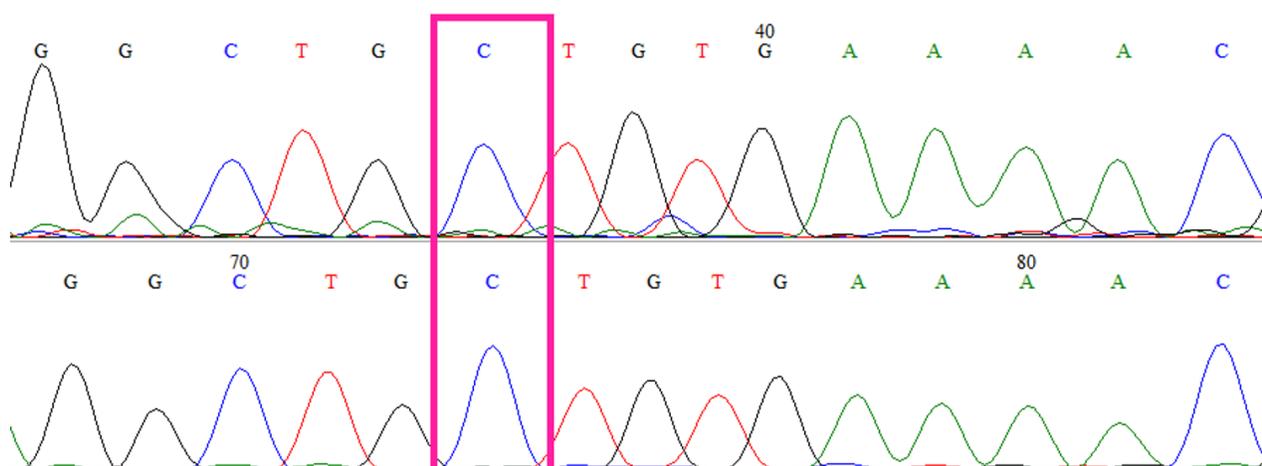


Fig. 15. Fragmento de las secuencias obtenidas para el gen EDAR del individuo S4. Se indica en el recuadro la posición 1540 mostrando un único pico para C. La variante se asocia al rasgo morfológico “incisivos en pala” detectado en poblaciones indígenas y asiáticas.

6. DISCUSIÓN

6.1. RENDIMIENTO DE LAS EXTRACCIONES DE ADN

Trabajar con ADN antiguo representa una dificultad muy grande por lo susceptibles que son los extractos a la contaminación, derivado de la poca cantidad de molde para la amplificación por PCR y debido al estado de degradación del ADN del resto arqueológico. Las condiciones de baja temperatura y humedad, como por ejemplo en regiones montañosas, favorecen la preservación del material genético antiguo, lo que contribuye a su recuperación (Carnese et al., 2010; Postillone et al., 2014).

En el presente trabajo la tasa de éxito en la obtención de ADN antiguo endógeno a través de amplificación y secuenciación de individuos precolombinos del Holoceno medio-tardío fue muy baja (11,8%), siendo menor que en otros trabajos (e.g. 57,1% en Arencibia et al. (2019), 73,7% en Postillone (2016), 26,2% en Figueiro (2013a)). Sin embargo, es de esperarse en un ambiente húmedo como lo es Colonia Concordia, dado a la cercanía con los cursos de agua de la cañada Saldaña y el Río Uruguay. Los procesos diagenéticos que actúan sobre los restos hallados en regiones de alta humedad dificultan la preservación del material genético (Hofreiter et al., 2015). La temperatura y el pH del suelo también podrían estar influyendo en la baja tasa de recuperación (O'Rourke et al., 2000b). No solamente la obtención de ADN endógeno fue exigua: también se observó que un alto porcentaje del ADN extraído corresponde a contaminación. La extensiva manipulación de los restos humanos durante la excavación del sitio y su acondicionamiento posterior en las colecciones, así como el tiempo transcurrido desde su hallazgo hasta el análisis molecular, han sido factores que también influyeron fuertemente en la baja tasa de éxito obtenida. En efecto, se interpreta que el mayor éxito de amplificación para la muestra S4 se debe a que fue en menor medida manipulada, dado a que no había sido reconocida como resto humano en un primer momento.

Previamente, Figueiro (2013a) utilizó en su análisis muestras de Colonia Concordia, teniendo resultados más favorables en cuanto a los individuos a los cuales se pudo asignar un haplogrupo (30%), con la diferencia que se utilizó el método de PCR-RFLP y no secuenciación como en el presente trabajo. Los individuos 37974, 47994 y 47996B, fueron los individuos asignados a un haplogrupo indígena mediante PCR-RFLP (Figueiro, 2013a). Estos resultados no pudieron reproducirse en el presente trabajo, ya que en las dos primeras muestras se constató contaminación.

Se puede postular diferentes grados de degradación entre las muestras; la ausencia de amplificación en individuos como 47992, cuya lectura fue alta en cuanto a la concentración de ADN, y en 47996 BIS, cuya concentración fue muy baja, podría tratarse de elevados niveles de degradación. Por otra parte, se puede suponer un alto grado de degradación del ADN endógeno también en los casos en que las secuencias mostraron haplogrupos no indígenas.

Los resultados de S4 y 47995 se corroboraron mediante 11 y 12 amplificaciones, respectivamente (Tabla 8), que señalaron tener variantes indígenas, es decir, no hubo inconsistencia entre las diferentes amplificaciones, siendo coherentes dentro del mismo haplogrupo. De acuerdo a los criterios de autenticidad de ADN antiguo (Pääbo et al., 2004), se deben realizar varias extracciones, sin embargo, no fue posible en este caso dado que no se contaba con el material suficiente. Por este motivo, se procedió a verificar que las secuencias obtenidas para un mismo individuo fueran coherentes filogenéticamente.

La coloración de los extractos está dada por complejos organominerales como los compuestos húmicos presentes en el suelo, de gran importancia ya que podrían inhibir la amplificación por PCR (Haile, 2012). Durante el procedimiento de digesterio de las piezas la coloración de los extractos fue variable, desde blanquecinos y amarillos translúcidos a marrones translúcidos y opacos, sin tener una relación con el contenido de ADN amplificable. Es decir, en el caso de los extractos de S4 y 47995 el aspecto fue marrón y

totalmente opacos, sin embargo, el rendimiento en amplificación fue notorio, por lo tanto no se asociaría con la presencia de inhibidores en los extractos de ADN.

A pesar de que tres individuos no pudieron ser amplificados, se puede considerar que el protocolo de extracción implementado aquí es efectivo para purificar ADN amplificable por PCR a partir de restos antiguos.

Cabe destacar que no se observaron productos de amplificación en ninguno de los controles negativos (blancos de extracción y de PCR), por lo cual los procedimientos anticontaminación intralaboratorio aquí aplicados fueron exitosos; sin embargo, sí se identificaron otras fuentes de contaminación, como se discute más abajo.

6.1.1. EFICIENCIA DEL MATERIAL DE PARTIDA

La porción interna del hueso petroso, que forma parte del hueso temporal del cráneo, y la capa de cemento de las raíces de los dientes han sido consideradas como las piezas de preferencia para el análisis de ADN antiguo, pudiéndose obtener un alto porcentaje de ADN endógeno (Hansen et al., 2017). El hueso petroso tiene la propiedad de ser el elemento más duro y de mayor densidad del esqueleto en mamíferos (Frisch et al., 1998). Además, se ha demostrado una buena preservación aún en climas cálidos (Llorente et al., 2015; Skoglund et al., 2016). En condiciones ambientales más duras, y en comparación con otras piezas, el hueso petroso es más resistente y ofrece una mayor protección al material genético (Hansen et al., 2017).

Si bien en este trabajo sólo se pudo amplificar ADN endógeno de dos individuos, el individuo S4, cuyo material de partida consiste en un hueso petroso, tuvo una mayor eficiencia de amplificación: no fue necesario ajustar en gran medida las condiciones de PCR para amplificar los diferentes fragmentos de ADNmt y tuvo mejores rendimientos en la amplificación de ADN nuclear. Como fue mencionado anteriormente, esta pieza se encontraba mezclada con restos identificados como de fauna y su preservación no parecía muy prometedora. Con la tasa de éxito de este trabajo no puede afirmarse que el hueso petroso sería el mejor sustrato para la obtención de ADN antiguo, pero dado a lo

mencionado anteriormente, los resultados estarían en línea con el análisis comparativo realizado por Hansen et al. (2017), donde distinguieron una mejor preservación molecular en esta pieza ósea.

Los dientes han sido calificados como menos propensos a la contaminación en comparación con las piezas óseas (Pilli et al., 2013). Los dientes se encuentran recubiertos por una capa de esmalte, que le otorga la propiedad de ser impermeables (Hillson et al., 2005), y, a su vez, como se encuentran dentro de alvéolos, se reduce en gran medida el posible ingreso de contaminantes a la porción más interna (Gilbert et al., 2006; 2005a). Además, dicho recubrimiento protegería al ADN de agentes de degradación y procesos tafonómicos ocurridos en los yacimientos (Pääbo et al., 2004). A pesar de dichas ventajas, los huesos, y particularmente las costillas, son una buena elección de piezas a utilizar, puesto que no son tan relevantes en las colecciones arqueológicas y se facilita, por lo tanto, la donación por parte de los museos para análisis de ADN (O'Rourke et al., 2000a). A diferencia de trabajos previos, por ejemplo Kemp et al. (2007) y Postillone (2016), en este trabajo se logró obtener ADN endógeno a partir de una costilla, sin embargo, no fueron favorables los resultados utilizando molares. Además, en trabajos previos realizados en el laboratorio se observó una tasa de éxito equivalente entre dientes y hueso (Figueiro, 2006, 2013a).

En el presente trabajo se utilizó el método de extracción a partir de columnas de sílice, sin embargo otros protocolos de extracción podrían ser probados, por ejemplo el método de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (e.g. Green & Sambrook, 2012), considerado más apropiado para muestras de gran antigüedad y altamente degradadas (Bolnick et al., 2012; Grier et al., 2013; Jenkins et al., 2012; Kemp et al., 2007; Postillone, 2016; Wilson et al., 2007). Cabe destacar que el procedimiento empleado aquí tiene la ventaja de reducir el número de pasos y por consiguiente la posibilidad de contaminación de las muestras, siendo ésta la gran utilidad de los *kits* comerciales (Yang et al., 1998).

Se ha demostrado que los procedimientos anticontaminación, como el lavado con hipoclorito de sodio y la irradiación con UV, sólo son efectivos cuando se trata de piezas

dentales extraídas de los alvéolos y para piezas óseas colectadas recientemente y que no fueron extensamente manipuladas (Pilli et al., 2013). Esto podría ser la razón por la cual la obtención de ADN endógeno con las piezas trabajadas en este estudio no fue fructífera.

6.1.2. DEGRADACIÓN DEL ADN EN LAS MUESTRAS ANALIZADAS

No es inusual que el ADN obtenido de restos antiguos sea bajo, siendo la cantidad esperada de ADN endógeno del 1%, debido a la degradación del material genético en el tiempo y a la acción de microorganismos (Hansen et al., 2017). En el caso de los restos analizados en la presente Tesis, la necesidad de diseñar nuevos juegos de cebadores, dado que cebadores disponibles en el laboratorio no funcionaron en la amplificación, da cuenta de la alta fragmentación del ADN en las muestras. En cuanto al tamaño de los fragmentos que pudieron amplificarse, se considera que el ADN de los restos de Colonia Concordia estaría fragmentado en tamaños menores a 160 pb. Los cebadores diseñados fueron exitosos en la amplificación, por lo cual se resalta su utilidad como herramienta molecular para la amplificación de fragmentos en muestras con ADN altamente degradado, quedando disponible para futuras investigaciones.

Figueiro (2013a) determinó la secuencia únicamente de una muestra del oeste de Uruguay, siendo también 17 los individuos analizados. En comparación con el este de Uruguay, donde el mismo estudio obtuvo seis secuencias de 19 individuos, hay una clara diferencia en relación a la preservación del ADN. Sin embargo, la tasa de éxito en la presente tesis es menor que la hallada por Figueiro (2013a), de un 18% utilizando secuencias en relación a las muestras de Uruguay.

Los fechados del sitio Colonia Concordia apuntan a edades de entre 1.840 y 1.780 años antes del presente (Castillo, 2004). Aunque en estudios previos no se encontró una correlación significativa entre antigüedad de la muestra y el éxito de las extracciones (Figueiro, 2013a), la antigüedad de los restos puede considerarse en parte explicativa de la baja cantidad de ADN endógeno obtenido.

Las técnicas utilizadas en el laboratorio no serían la causa de la baja tasa de éxito de las extracciones, dado que una muestra del individuo 55698 fue enviada al Centro de Geogenética de la Universidad de Copenhague (Dinamarca), e incluso aplicando tecnologías de última generación se obtuvo una muy baja cobertura. Además, otras muestras del oeste de Uruguay, con antigüedades equivalentes a las de Colonia Concordia, del sitio El Cerro (Gascue et al. 2016), fueron enviadas al laboratorio de Antropología de Emory University (Estados Unidos), y no se obtuvo ADN analizable (John Lindo, comunicación personal). Finalmente, en la zona del Delta del Paraná (Argentina), cercano al sitio de estudio, también se encontraron dificultades para extraer y amplificar ADN antiguo (Cardozo et al., 2021). Los autores lo asocian a las características húmedas del ambiente, que no permite la preservación del material hereditario; todo esto sugiere que la zona estudiada en este trabajo presenta problemas de conservación del ADN, más allá de las metodologías implementadas para su obtención.

6.1.3. CONTAMINACIÓN DE LAS EXTRACCIONES

En la gran mayoría de las muestras analizadas no fue posible una asignación confiable del software Haplogrep debido a la ausencia de mutaciones características de los haplogrupos.

La presencia de dobles picos en algunas posiciones de las muestras podría considerarse como heteroplasmia, dado que se ha estimado una tasa individual de 1,1% (Sigurðardóttir et al., 2000). Sin embargo, resulta imposible descartar la posibilidad de que sea producto de contaminación, ya que las extracciones de restos antiguos a menudo presentan una combinación de contaminantes bacterianos, fúngicos y humanos.

La proporción de ADN endógeno obtenido se incrementa notoriamente cuando se aplican protocolos para evitar la contaminación de las piezas comenzando durante las excavaciones arqueológicas, sin embargo, una situación completamente libre de contaminación no es posible (Deguilloux et al., 2011). Uno de los principales problemas es la contaminación ocasionada por la manipulación de las muestras sin ropa protectora,

guantes ni barbijo, su almacenamiento en contenedores no estériles así como el lavado de las piezas; todo ello dificulta o imposibilita amplificar ADN endógeno (Deguilloux et al., 2011). La manipulación directa de las piezas puede ocasionar la penetración del ADN del manipulador al interior de la pieza a través de los túbulos dentinarios hacia la cavidad pulpar en los dientes y del sistema de Havers en los huesos (Pilli et al., 2013). Se ha sugerido que la porosidad del hueso aumenta con la degradación de los restos, lo que puede llevar a la penetración de moléculas de ADN a través de los lavados de las piezas o a través de la transpiración que arrastra células de la piel (Gilbert et al., 2006). También se ha propuesto una correlación entre la humedad de la muestra y el transporte al interior de ADN exógeno (Gilbert et al., 2005b). Este tipo de contaminación “interna”, es difícilmente abatible con las técnicas de descontaminación a través de luz UV o el tratamiento con hipoclorito de sodio, que fundamentalmente eliminan los contaminantes presentes en la superficie de la pieza (Pilli et al., 2013). Hay estudios que sugieren que la contaminación ocurre durante o inmediatamente luego de la excavación (Gilbert et al., 2006; 2005a), remarcándose la importancia de conservar las piezas inmediatamente en condiciones frías y secas para evitar su degradación (Deguilloux et al., 2011). Considerando las condiciones en las que fueron extraídos los restos en Colonia Concordia, la probabilidad de contaminación sería bastante alta, dado que ningún procedimiento particular fue implementado para su colecta hace más de siete décadas, ni para su manipulación en la mayor parte del tiempo posterior. Además, las piezas pudieron ser lavadas, lo cual puede promover que los contaminantes penetren profundamente en la pieza, y, en algunos casos, se le han aplicado cola vinílica, lo cual dificulta aún más la extracción de ADN endógeno. Ninguno de los tratamientos de las piezas seguiría las recomendaciones señaladas por Yang & Watt (2005) para evitar la contaminación a la hora de la colecta de material en yacimientos arqueológicos; sin embargo, estas técnicas recién cobrarían importancia cuando surge el campo del ADN antiguo. Debido a ello, en la época en la que fueron colectadas las piezas (década de 1950), la contaminación de las muestras con ADN exógeno, no relacionado con la autora de esta Tesis, es lo esperable. La correspondencia del ADNmt de los investigadores con haplogrupos europeos permite su

distinción con el ADN endógeno, correspondiente a linajes nativos americanos, y así su identificación como contaminante. Como se señaló en los resultados, dos posibles muestras pudieron haber sido contaminadas con el ADN de uno de los investigadores del laboratorio, que presenta el haplogrupo europeo K, de cual se detectaron algunas de las mutaciones en las secuencias de los individuos analizados. A pesar de lo mencionado, se destaca que no hubo contaminación de la autora de esta Tesis por manipulación de las muestras, cuando fueron realizados los procedimientos de extracción y amplificación, dado a que no se encontraron las variantes del haplogrupo U2e, al cual pertenece la misma, en la secuencia de HVR I para los individuos analizados. Por todo ello, los procedimientos técnicos utilizados en esta Tesis para minimizar el riesgo de contaminación durante la extracción y amplificación del ADN antiguo podrían considerarse aceptables, teniendo en cuenta que los métodos para eliminar los contaminantes no son completamente efectivos.

Para identificar la fuente de contaminación y poder eliminarla, no es suficiente con analizar las variantes en el ADNmt de los integrantes del laboratorio en el cual se trabaja (Yao et al., 2007). Es de gran importancia poder identificar la fuente de contaminación de modo de poder encontrar la solución para eliminar los contaminantes y evitar su propagación con el fin de lograr resultados confiables (Yao et al., 2007). A pesar de aplicar estrictos protocolos para evitar la contaminación, el estudio de Yao et al. (2007) detectó ADN exógeno, observando que el 35% de los ADN exógenos correspondían a contaminación por los integrantes del laboratorio o por contaminación cruzada entre las muestras (Yao et al., 2007). En el caso de las muestras analizadas en esta Tesis, no es posible tener el conocimiento de todas las personas que manipularon las muestras, lo cual dificulta la identificación de la fuente de contaminación.

Entre los resultados obtenidos en esta Tesis, pese a que para muchas muestras el programa Haplogrep indicó linajes europeos, se resalta la presencia de linajes africanos entre los ADN presuntamente contaminantes. Esto sobresale particularmente porque los

motivos de secuencia en los linajes mitocondriales africanos encontrados no coinciden con ninguno de los integrantes del laboratorio de Uruguay donde se realizó el trabajo de esta Tesis. Además, se abre el debate en relación a si hubo personas con ascendencia africana excavando las muestras o manipulándolas en el museo, o, incluso, si esos restos corresponden a descendientes de africanos. El resultado obtenido a través del programa señalaba la pertenencia de los individuos al haplogrupo L3, de gran importancia ya que a partir de este haplogrupo surgen gran parte de los linajes de África Subsahariana así como todos los linajes no africanos (Soares et al., 2012). Asimismo, esta región es de donde provienen la mayor parte de los africanos traídos como esclavos a las Américas (Borucki et al., 2015).

La propuesta más probable podría ser que individuos que presentaban haplogrupos mitocondriales africanos (por ancestría materna de descendientes de esclavos africanos) hayan manipulado las muestras, y que de esa manipulación sea proveniente la contaminación.

Para el caso de la muestra 55698, el correspondiente haplogrupo fue finalmente obtenido mediante secuenciación masiva, confirmando que la secuencia consenso analizada por el método de Sanger era resultado de contaminación. Es importante recalcar que en la muestra obtenida por ambos métodos de secuenciación se encontraron las variantes 16223T y 16325C. Por lo tanto, podría considerarse que en la muestra analizada en el laboratorio de Uruguay se habían podido amplificar trazas de ADN endógeno, pero al ser de forma conjunta con secuencias contaminantes, el método de Sanger hizo imposible distinguirlas. Además, en ninguna de las secuencias obtenidas por el método de Sanger o por secuenciación masiva se observa la mutación C→T en la posición 16327, que es característica del haplogrupo C1. Al tratarse de una reversión de T a C en la secuencia, no se distingue de la rCRS, lo que dificultó aún más la asignación del individuo al haplogrupo C1 utilizando solamente la secuencia obtenida por el método de Sanger. De hecho, la presencia de las variantes 16320T y 16399G en esta secuencia generaron que a través de Haplogrep se le asignara el haplogrupo L3 (van Oven & Kayser, 2009). Si bien la mutación C16320T podría tratarse de un daño al ADN, no es probable para el caso de

A16399G. Las variantes observadas por secuenciación Sanger podrían tratarse de una contaminación cruzada con la muestra 61395, ya que se amplificaron en una misma tanda.

Finalmente, otras de las cuestiones a destacar es que las secuencias consenso construidas pueden tener variantes erróneas. El tratamiento con hipoclorito de sodio y radiación UV pueden degradar y dañar el ADN contaminante de forma similar a la presente en el ADN antiguo, de manera de no poder distinguir la autenticidad de la amplificación (Deguilloux et al., 2011). Por ello, las muestras pueden no sólo estar exhibiendo una alta proporción de secuencias contaminantes, sino que también pueden presentar secuencias con daño al ADN, haciendo aún más difícil su asignación a un haplogrupo de manera confiable.

6.2. ANÁLISIS DE LOS DATOS

6.2.1. SECUENCIAS HVR I Y II

Para S4 y 47995, dado que se han encontrado variantes indígenas en las sucesivas amplificaciones de los diferentes fragmentos, se puede considerar que el ADN amplificado de los dos individuos analizados es endógeno. Diferentes amplificaciones señalaron un mismo haplogrupo y dado que las mutaciones se hallan en otras muestras tanto antiguas como modernas, esto aumentaría la probabilidad de que los resultados obtenidos sean considerados como auténticos. Además, los polimorfismos particulares hallados no corresponden a las transiciones C→T y G→A, que son artefactos o errores frecuentes cuando se amplifica ADN antiguo dado al daño en el mismo, sino que corresponden a transiciones T→C, A→G y transversiones A→C, lo cual da pocas sospechas de que sean artefactos de amplificación.

6.2.2. SECUENCIAS MITOCONDRIALES COMPLETAS

A diferencia de la secuenciación por el método de Sanger, que sólo se obtiene una secuencia que representa el fragmento leído por el dispositivo mayor número de veces, la secuenciación masiva permite filtrar los contaminantes cuando se analizan las secuencias, por lo tanto no hay duda del carácter endógeno de las secuencias de los individuos 15736 y 55698. Asimismo, en el análisis de los genomas mitocondriales completos fueron identificados daños en la molécula de ADN, fundamentalmente la desaminación de citosinas, visualizadas como mutaciones artefactuales C→T o G→A, lo cual es otra evidencia de la autenticidad de las muestras. En el caso de las secuencias obtenidas por PCR, no se detectaron estos tipos de daño al ADN antiguo, siendo otro motivo por lo cual se siguió el criterio de coherencia filogenética de las amplificaciones para verificación de su autenticidad.

6.2.3. AFINIDADES GEOGRÁFICAS

Si bien la asignación de haplogrupos por parte del software Haplogrep es muy útil, se debe tener en cuenta que se basa en una filogenia de haplogrupos (Phylotree; van Oven & Kayser, 2009) cuya última actualización (versión 17) es de febrero de 2016. Por lo tanto, no todas las variantes conocidas para América del Sur se encuentran incluidas, y por esta razón el individuo S4 fue asignado al subhaplogrupo A2a. En la HVR I, S4 se diferencia del haplotipo nodal por las mutaciones 16131C, 16189C y 16192T. Individuos con la mutación en la posición 16192 forman parte de un haplotipo único ancestral presente en poblaciones actuales del centro de Argentina (Catelli et al., 2011; García et al., 2021) y correspondiente a un individuo antiguo del sitio Arroyo Seco 2, provincia de Buenos Aires, Argentina, datado en 6.860 ± 60 años antes del presente (Llamas et al., 2016). A partir de dicho haplotipo ancestral derivan otros linajes distanciados por un evento mutacional para un individuo Mapuche (de Saint Pierre et al., 2012b) y otro individuo actual de Río Negro, ambos del sur de Argentina (Bobillo et al., 2010), un individuo de Colombia (Tamm

et al., 2007), y dos individuos de Córdoba, en el centro de Argentina (Catelli et al., 2011); éstos últimos comparten la mutación en la posición 16248 con un individuo Quechua de Perú (Sandoval et al., 2009). Del mencionado haplotipo ancestral derivan con dos pasos mutacionales otro individuo de Córdoba (Catelli et al., 2011) y, también con dos eventos mutacionales, el individuo de Colonia Concordia.

En trabajos anteriores ya se había encontrado vínculos entre individuos antiguos de Argentina e individuos actuales de Uruguay y Perú (Carnese et al., 2010). También se ha encontrado linajes del haplogrupo A2 que comparten mutaciones entre un individuo actual de Uruguay y otro de Perú (Figueiro et al., 2022).

Cuando se estudian ambas HVR, el haplotipo de S4 deriva de uno de los haplotipos nodales que es particularmente frecuente en poblaciones actuales del norte (Catelli et al., 2011) y centro de Argentina (Bobillo et al., 2010; Catelli et al., 2011; García et al., 2021) y poblaciones nativas del norte de Argentina (Tamm et al., 2007). El individuo S4 comparte mutación en la posición 16192 con los ya mencionados individuos de Córdoba (Catelli et al., 2011; García et al., 2021) y Buenos Aires (Catelli et al., 2011). Dichos individuos comparten entre sí la mutación en la posición 152, que los diferencia de S4; sin embargo, el haplotipo ancestral del que derivan ambos clados no se encuentra representado en la base de datos construida. Ninguna secuencia antigua presenta el polimorfismo 16131C encontrado en S4, y dicha variante genética no fue observada en poblaciones actuales asociada al haplogrupo A2. Por lo tanto, el haplotipo al que corresponde S4 puede caracterizarse como único, siendo un linaje bastante derivado, dado que se encuentra en una posición distanciada por lo menos por tres eventos mutacionales de los haplotipos nodales. El individuo analizado en García et al. (2021), que corresponde a una secuencia mitocondrial completa, presenta la mutación 16192T y pertenece al linaje denominado A2ay1, propuesto como clado local originado en Argentina Central. Para asignarle un linaje específico al individuo S4 y un origen geográfico se deberían amplificar regiones codificantes del genoma mitocondrial.

La red de haplotipos de la HVR I para el subhaplogrupo C1d, ubica al individuo 47995 en el centro de la filogenia, lo que indica que presenta el estado ancestral con el

motivo 16051G, 16223T, 16298C, 16325C y 16327T. Este haplotipo sería portado por los primeros pobladores, por eso se encuentra ampliamente extendido. Como la región codificante no fue amplificada, no se conoce si en el individuo 47995 está presente la mutación en la posición 7697 que es característica de un clado particular de C1d: el C1d1 (Perego et al., 2010). El ancestro común más reciente para este linaje ha sido estimado entre 18.000 y 14.000 años antes del presente, tiempo que corresponde a un haplogrupo fundador (Perego et al., 2010). El haplogrupo nodal es compartido con un alto número de individuos nativos de Argentina Norte (4), pero también del Sur (1), Brasil (1), Ecuador (2), Bolivia (1) así como en poblaciones urbanas del centro (5) y norte de Argentina (3), y de Uruguay (3). La presencia en poblaciones nativas tan diversas y en ubicaciones geográficas tan distantes, hace referencia al origen ancestral de dicho linaje. Considerando la HVR II, la muestra 47995 presenta las mutaciones características del subhaplogrupo C1d, excepto en la posición 194, donde presenta el estado ancestral, 194C, lo cual difiere de las muestras de Uruguay analizadas por Figueiro et al. (2011), en las cuales solamente se encontró el estado 194T. En esta posición serían frecuentes las reversiones (Sans et al., 2015), lo cual podría justificar su ausencia en dicho individuo.

Este individuo también presenta proximidad con individuos de Argentina, ya que comparten la mutación 146C. Los individuos corresponden a poblaciones actuales de Río Negro (Bobillo et al., 2010) y de Buenos Aires, Argentina (Catelli et al., 2011). La mutación 195C está presente en otras muestras de la base de datos construida aquí, y por lo tanto no es informativa sobre el origen del haplotipo correspondiente a 47995. Esta posición ya había sido descrita previamente como particularmente hipervariable (Figueiro et al., 2011).

Los individuos 15736 y 55698 pertenecen a una de las ramas más frecuentes dentro del haplogrupo C1, que corresponde a uno de los ADNmt indígenas fundadores: C1b (Gómez-Carballa et al., 2015). La antigüedad del ancestro común más reciente de este linaje se ha estimado en 18.300 años (Gómez-Carballa et al., 2015). Un estudio previo (Figueiro, 2013a), ya había detectado la correspondencia del individuo 15736 al haplogrupo C1 mediante PCR-RFLP. El genoma mitocondrial completo del individuo 15736

presenta las mutaciones características del subhaplogrupo C1b respecto a C1 (493G) y nueve mutaciones adicionales (Figura 12), mientras que el individuo 55698 presenta una reversión en la posición 16327 y mutaciones particulares en las posiciones 13145 y 16209, que lo definen como un linaje único entre los individuos modernos y antiguos analizados correspondientes al subhaplogrupo C1b. La mutación 13145A ha sido definida para otro linaje americano el C4a2c1 y la mutación 16209C para el linaje C1d2a (van Oven & Kayser, 2009), sin embargo, ninguna de las dos ha sido previamente asociada al subhaplogrupo C1b. Debido a la baja cobertura de la secuencia de 55698, es muy probable que presente otras variantes que no pudieron ser detectadas.

El individuo 15736 comparte la mutación en la posición 207 con un individuo moderno de la provincia de Córdoba y cuatro antiguos de la región central de Argentina (García et al., 2021). Este individuo pertenecería al clado denominado por García et al. (2021) como “C1b₊₂₀₇”, cuya antigüedad fue calculada en entre 7.452,51 y 12.022,57 años, y dado que sólo comparte la variante 207 con las secuencias de Argentina (además de las mutaciones diagnósticas del subhaplogrupo C1b), es muy probable que el linaje que representa 15736 tenga una antigüedad similar.

A su vez, el individuo 15736 presenta mutaciones en las posiciones 60C, 61T, 234G, 522d, 523d, 961C, 1717C, 4952T, 8770G y 9581C, que no son compartidas con ningún otro individuo de la base de datos construida, y tampoco se encontraron como mutaciones que definan otros linajes dentro del haplogrupo C1 (van Oven & Kayser, 2009). Por lo tanto, es probable que 15736 comparta una ancestría común antigua con las secuencias del centro de Argentina, y que no represente movimientos poblacionales recientes.

Haplotipos del subhaplogrupo C1b ya habían sido reportados en ADN antiguo de individuos de Uruguay, recuperados del sitio Isla Larga en el departamento de Rocha (Figueiro et al., 2017). Sin embargo, los individuos analizados en la presente Tesis presentaron linajes particulares que no se agruparon con dichos individuos del este de Uruguay.

La presencia de los subhaplogrupos C1b y C1d en poblaciones antiguas de Uruguay sigue en línea con los resultados obtenidos utilizando genomas mitocondriales (Figueiro et

al., 2022), aunque los linajes hallados no se corresponden con los representados en la actualidad. Por otro lado, aunque el número de muestras analizadas es muy pequeño como para estimar frecuencias de forma precisa, se destaca la presencia en alta proporción de individuos pertenecientes al haplogrupo C1 en poblaciones antiguas del Uruguay. Si bien las frecuencias de C1 en poblaciones antiguas analizadas por secuenciación y PCR-RFLP son equivalentes a las halladas en la población uruguaya actual (Figueiro, 2013b), las secuencias analizadas durante la década siguiente de los haplogrupos C1b (Figueiro et al., 2017), C1c (Lindo et al., 2022) y C1d (Lindo et al., 2022; Sans et al., 2015) han incrementado esa proporción. Esto está en acuerdo con trabajos previos (e.g. Postillone et al., 2014), en el cual resalta una alta frecuencia del haplogrupo C en el Cono Sur.

Las vinculaciones encontradas en esta Tesis entre individuos de Uruguay y linajes presentes en Argentina, Bolivia, Brasil, Ecuador y Colombia no son nuevas, ya que para diferentes subhaplogrupos de la población actual se encontraron relaciones de cercanía entre linajes presentes en los mencionados países, a través de genomas mitocondriales completos (Figueiro et al., 2022). También se encontraron, al igual que en el mencionado trabajo, relaciones más distantes con individuos de Perú. Asimismo, eran esperables las afinidades con poblaciones del centro y sur de Argentina dada la alta frecuencia del haplogrupo C1 en estas regiones y el origen común de las poblaciones presentes en dichas regiones (García & Demarchi, 2009).

La proximidad de los individuos estudiados con linajes encontrados en poblaciones habitantes de Argentina, permite proponer un posible vínculo con la población antigua del oeste de Uruguay, ya sea por un ancestro materno común o por un contacto poblacional (Arencibia et al., 2019). Se ha reconocido la similitud de las estructuras monticulares entre el oeste de Uruguay y el Delta de Paraná en Argentina (Gascue et al., 2016); asimismo, la similitud entre individuos del oeste del país con individuos de Argentina, particularmente del Delta del Paraná, ha sido registrada a nivel de morfología craneal (Bertoni et al., 2000). También se observa una correspondencia entre los enterramientos datados en el Oeste y la cronología del registro arqueológico del Delta del Paraná (Scabuzzo et al., 2019),

encontrándose notables similitudes entre los contextos arqueológicos de ambas regiones (Gascue et al., 2016). El estilo tecnológico hallado ha sido asignado a la cultura Goya-Malabrigo en ambas regiones y también se han establecido semejanzas a nivel del tratamiento funerario como conducta simbólica (Gascue et al., 2016). Se ha señalado la interacción entre los grupos que habitaban la región del humedal del Paraná inferior con grupos habitantes de Uruguay (Cardozo et al., 2021), no pudiendo establecerse un intercambio genético dada a la ausencia de secuencias del sector inferior del río Paraná. Si bien en base a la evidencia arqueológica se puede proponer un intercambio cultural entre ambas regiones, de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo la vinculación genética con el territorio actual de Argentina parecería ser lejana, es decir, se reflejaría una ancestría profunda, dado que no se encontraron secuencias que compartan variantes tanto actuales como modernas.

La ausencia de haplotipos compartidos con Brasil es otro resultado a destacar. Se puede plantear un ancestría profunda con el actual territorio argentino, pero no con el territorio vecino de Brasil. Para el oeste del país observamos una ausencia de vinculación tanto genética como arqueológica con el sur de Brasil a diferencia de lo observado en el este, donde el fenómeno de los “cerritos de indios” se continúa con el sur de Brasil (Scabuzzo et al., 2019), aunque no se observan por el momento vinculaciones genéticas. Es de gran interés poder determinar las relaciones del este con el territorio de Brasil, dado a sus implicancias sobre el poblamiento del territorio. Como ha sido mencionado previamente, se ha evidenciado una relación de ancestría profunda a nivel genómico entre individuos antiguos del este de Uruguay con individuos antiguos del este de Brasil, con implicancias sobre una posible ruta migratoria por la costa atlántica de Sudamérica (Lindo et al., 2022). La ausencia de vinculación de la zona oeste de Uruguay con Brasil y su cercanía a poblaciones de Argentina, podrían indicar ya sea su poblamiento por parte de otras poblaciones o migraciones más recientes conformando el acervo génico de esta zona.

A diferencia de otros trabajos (Figueiro, 2013b; Postillone, 2016; Sans et al., 2012, 2015) este trabajo no encontró una continuidad poblacional con el Uruguay contemporáneo, y se encuentra más en línea con los resultados obtenidos por Llamas et al. (2016) con genomas mitocondriales completos antiguos, donde los linajes obtenidos no estaban presentes en el acervo de las poblaciones nativas actuales. Como los linajes encontrados en esta Tesis no están presentes en la población actual de Uruguay, podrían encontrarse en la baja frecuencia o bien podrían haberse extinguido. Esto es de esperarse reflejo de la drástica disminución de las poblaciones nativas a partir de la conquista de América. Estudios genéticos han demostrado una reducción a la mitad del tamaño efectivo de la población de mujeres como consecuencia de la colonización europea (Cardozo et al., 2021). El flujo génico entre las poblaciones de la región podrían haber contribuido a incrementar el tamaño efectivo en tiempos precolombinos y posteriores a la conquista (García et al., 2018). En un estudio reciente un número importante de secuencias del genoma mitocondrial obtenidas de individuos de ancestría indígena uruguayos correspondieron a linajes que no habían sido descritos anteriormente (Figueiro et al., 2022). Por lo cual es de gran importancia seguir trabajando con restos antiguos a nivel molecular, para poder definir antigüedad, lugar de origen y distribución de los linajes obtenidos.

6.2.4. ANÁLISIS COMPLEMENTARIOS: MARCADORES NUCLEARES

El ADN nuclear se degrada a un ritmo más alto que el ADNmt que es circular y, además, está más protegido (Hansen et al., 2017), lo que dificulta la amplificación de marcadores nucleares en ADN antiguo. Sin embargo, en este trabajo, con la utilización de cebadores que amplifican fragmentos muy pequeños, se pudo obtener resultados alentadores. Cabe destacar que solamente fue probado en dos de los individuos de la muestra; los cebadores utilizados podrían funcionar en restos mejor preservados como los recuperados en la región este del país.

6.2.4.1. DETERMINACIÓN DEL SEXO MEDIANTE EL MARCADOR AMELOGENINA

A través de los resultados obtenidos para la muestra S4, se considera que se trata de un individuo masculino. Si bien en dos amplificaciones no se observa el patrón de dos bandas, una banda única de 112 pb indicaría la amplificación del fragmento correspondiente al cromosoma Y. La amplificación de un único alelo se conoce como *allelic dropout* o pérdida de alelos, es un error durante la PCR que es frecuente cuando se trabaja con ADN degradado y en baja concentración (Kim et al., 2013; Pacioni et al., 2015). Para el caso del individuo 47995, los resultados obtenidos a través de la amplificación del gen AMEL no fueron concluyentes. En una amplificación se obtuvieron dos bandas, correspondiendo a un individuo masculino, lo cual coincide con el análisis morfológico (Rodríguez, 2019). En las dos siguientes amplificaciones sólo se observó una banda de 106 pb, lo que correspondería a un individuo femenino. Sin embargo, al igual que el individuo S4, podría considerarse como un error en la PCR generando una pérdida del alelo, en este caso el de mayor peso molecular, lo cual es esperable en esta muestra no tan bien preservada como S4. Como ya fue mencionado, en general la amplificación de la muestra 47995 tanto para el ADNmt como para el ADN nuclear fue más dificultosa; de hecho no fue posible su amplificación para el gen EDAR.

6.2.4.2. ESTUDIO DE LA VARIANTE T1540C DEL GEN EDAR

Los resultados obtenidos para el individuo S4 representan el primer dato respecto al gen EDAR en poblaciones antiguas de Uruguay. La variante T1540C de EDAR está presente con una frecuencia cercana al 100% en poblaciones actuales de indígenas americanos y del Este de Asia (Kamberov et al., 2013). Sin embargo, se constató que en poblaciones antiguas americanas no estaba fijada dicha variante, por lo cual el aumento en su frecuencia se dio en forma paralela en poblaciones del Este asiático y de América (Posth et al., 2018). En la presente Tesis se obtuvo la secuencia de un individuo antiguo

que resultó ser homocigota para la variante mencionada, genotipo que fue confirmado en repetidas amplificaciones. Por un lado, este resultado es otra línea de evidencia de la autenticidad del ADN obtenido de la muestra S4, sobre todo por el hecho de que el individuo es homocigota, lo cual es consistente con lo que se conoce de la composición genética de los pueblos originarios. En la población uruguaya actual la frecuencia alélica es 15% (Acosta, 2021); si suponemos equilibrio de Hardy-Weinberg, implica una presencia del 2,25% de homocigotas en la población, por lo que se infiere que la probabilidad de contaminación de la muestra con ADN moderno es igual de reducida. En particular, la autora de esta Tesis, si bien presenta el fenotipo “diente en pala”, es homocigota para el alelo T, por lo cual no presenta la variante indígena, y no es posible atribuir contaminación de la muestra a esta fuente. Además, como se analizaron polimorfismos presentes en el ADNmt y en el ADN nuclear, y se obtuvieron secuencias con variantes indígenas a partir de marcadores no ligados, se sostiene la autenticidad de los resultados.

Asimismo, estos resultados no solamente destacan la adecuación de la herramienta molecular diseñada en este trabajo sino que también abren la posibilidad de utilizar los cebadores diseñados en otras muestras para continuar estudiando la presencia de dicha variante en poblaciones antiguas. Esto permitirá establecer si en las poblaciones antiguas de Uruguay estaba fijada la variante T1540C, lo cual puede tener repercusiones en cuanto al poblamiento y microevolución de poblaciones del Cono Sur, dado que individuos de más de 6.000 años de antigüedad en Brasil presentaban el alelo ancestral (Posth et al., 2018).

7. CONSIDERACIONES FINALES Y PERSPECTIVAS

7.1. CONSIDERACIONES FINALES

La presente Tesis representa una contribución a la información genética de las poblaciones indígenas de Uruguay. El gran interés del trabajo con ADN antiguo se debe a su utilidad para estudiar de manera directa eventos ocurridos en el pasado. En esta Tesis se ha buscado hacer un aporte al estudio de ADN antiguo de la región oeste de Uruguay así como alentar futuras investigaciones que abarquen mayor parte del territorio y puedan aplicar las herramientas moleculares aquí implementadas, tanto para ADNmt como para ADN nuclear. Es necesario refinar el análisis al nivel de genomas mitocondriales completos para poder definir linajes y sublinajes, permitiendo inferir el origen geográfico de forma precisa.

A través de este estudio se llega a la misma conclusión que en trabajos anteriores (Deguilloux et al., 2011; Yang & Watt, 2005), los cuales resaltan que el tratamiento previo a los análisis moleculares son condicionantes para la exitosa obtención posterior de ADN endógeno. Si bien la metodología implementada en este trabajo ha demostrado ser adecuada, se destaca la importancia de aplicar un estricto protocolo anticontaminación desde la colecta de las piezas hasta el montado del experimento de PCR. De todas maneras, estudiar muestras antiguas que escapen a estos estrictos procedimientos merece el esfuerzo, dado que muchas veces es el material disponible y los resultados que pueden obtenerse son claves para el estudio de las poblaciones de nuestro país y para nuestra identidad nacional. En varios estudios de percepción por ejemplo a través de los censos (Sans et al., 2021; Sans & Figueiro, 2018), el porcentaje de personas que declaran ancestría indígena es mucho menor que lo que revelan los estudios genéticos. Además, las personas con ancestría indígena se suelen asociar con niveles socioeconómicos más bajos

(Sans et al. 2021), lo que alerta acerca de una historia de discriminación de los individuos con ancestría aborigen.

Por otra parte, los cuatro haplotipos analizados no han sido descritos para ningún otro individuo moderno o antiguo de la base de datos comparativa empleada en este trabajo. Linajes locales fueron propuestos previamente para Uruguay (Figueiro et al., 2022; Sans et al., 2012, 2015), y sumado a estos resultados, podría estar reflejando que las poblaciones antiguas no solamente fueron diversas sino que también restringidas a nivel de su distribución geográfica, con un intercambio genético limitado de acuerdo a las cuatro secuencias estudiadas en este trabajo. Aunque el tamaño de la muestra es muy pequeño, es posible plantearlo como hipótesis, que necesitarían más secuencias uruguayas antiguas para aceptar o refutar.

7.2. PERSPECTIVAS A FUTURO

El éxito de los trabajos con ADN antiguo no solamente depende de la manera en la que puedan sortearse las dificultades inherentes a su naturaleza degradada, sino que también se debe al limitado acceso a piezas óseas y dentales disponibles para este tipo de estudios. Esto es debido a la cantidad que se requiere para la realización de múltiples intentos y que significan la pérdida definitiva de material arqueológico, eliminando la posibilidad para futuros estudios. Sin embargo, la posibilidad de ampliar el número de muestras analizadas, tanto de colecciones de museo como de nuevas intervenciones arqueológicas al sitio podrían significar un aumento de la información obtenida en este trabajo, y proporcionar un mayor aporte al conocimiento de las poblaciones prehispánicas que habitaron la margen oriental del río Uruguay. Adicionalmente, para poder determinar con mayor precisión los linajes mitocondriales de los individuos de los cuales obtuvimos ADN endógeno sería necesario secuenciar el genoma mitocondrial completo, como se viene trabajando en forma creciente en el campo de ADN antiguo (por ejemplo García et al., 2021; Gómez-Carballa et al., 2015; Llamas et al., 2016).

La aplicación de tecnologías de secuenciación masiva permitirá obtener varias lecturas en paralelo de las diferentes variantes de secuencias que se encuentran en la extracción, ya que todas las moléculas presentes en la muestra tienen la misma probabilidad de ser secuenciadas (Knapp & Hofreiter, 2010). Esta alta sensibilidad de las nuevas tecnologías de secuenciación, acompañado con el desarrollo de métodos computacionales permiten detectar hasta el 1% de la contaminación dentro de una especie (Jun et al., 2012). Por lo tanto, puede obtenerse mayor información sobre el origen de los contaminantes y más fácilmente diferenciar el ADN endógeno a través de la detección de variantes indígenas.

Es de particular interés aplicar esta técnica a los individuos A1 y S3, cuyos restos fueron encontrados juntos y en una disposición particular, con el objetivo de discernir las relaciones de parentesco entre ambos individuos, como se ha hecho en otros contextos (por ejemplo Russo et al., 2016). Como se detalló en Materiales y Métodos, el esqueleto de A1, que correspondería a una mujer, se encontraba enterrada boca abajo, y entre sus dos fémures se ubicaban los restos de un subadulto, S3 (Maruca Sosa, 1957); si se obtiene y analiza su ADN se podría confirmar si son madre e hijo.

Más allá de todas las consideraciones que deben tomarse para el trabajo con restos arqueológicos y paleontológicos, el ADN antiguo se posiciona para convertirse en una herramienta de gran importancia en la investigación biológica y otros usos, como la búsqueda de vida extinta o existente en la biosfera profunda y en otros planetas (Willerslev & Cooper, 2005).

8. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, E. (2021). *Estudio de la variante T1540C del gen EDAR y su relación con diente en pala y ancestría indígena en el Uruguay*. Montevideo: Universidad de la República.
- Afonso Costa, H., Carvalho, M., Lopes, V., Balsa, F., Bento, A. M., Serra, A., Andrade, L., Anjos, M. J., Vide, M. C., Pantoja, S., Vieira, D. N. & Corte-Real, F. (2010). Mitochondrial DNA sequence analysis of native Bolivian population. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 17, 247-253.
- Allentoft, M. E., Collins, M., Harker, D., Haile, J., Oskam, C. L., Hale, M. L., Campos, P. F., Samaniego, J. A., Gilbert, M. T. P., Willerslev, E., Zhang, G., Scofield, R. P., Holdaway, R. N. & Bunce, M. (2012). The half-life of DNA in bone: measuring decay kinetics in 158 dated fossils. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 279, 4724-4733.
- Amorim, A., Fernandes, T. & Taveira, N. (2019). Mitochondrial DNA in human identification: A review. *PeerJ*, 7, e7314.
- Anderson, S., Barrell, B., de Bruijn, M., Coulson, A., Drouin, J., Eperon, I., Nierlich, D., Roe, B., Sanger, F., Schreier, P., Smith, A., Staden, R., Young, I. & Bankier, A. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290(5806), 457-465.
- Andrews, R. M., Kubacka, I., Chinnery, P. F., Lightowlers, R. N., Turnbull, D. M. & Howell, N. (1999). Reanalysis and revision of the cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nature Genetics*, 23(2), 147.
- Arencibia, V., Crespo, C. M., García Guraieb, S., Russo, M. G., Dejean, C. B. & Goñi, R. (2019). Análisis genético poblacional de grupos cazadores recolectores del Holoceno Tardío del Lago Salitroso (Santa Cruz, Argentina). *Revista Argentina de Antropología Biológica*, 21(2), 1-16.
- Arias, L., Barbieri, C., Barreto, G., Stoneking, M. & Pakendorf, B. (2017). High-resolution mitochondrial DNA analysis sheds light on human diversity, cultural interactions, and population mobility in Northwestern Amazonia. *American Journal of Physical Anthropology*, 165(2), 238-255.
- Baca, M., Molak, M., Sobczyk, M., Weglenski, P. & Stankovic, A. (2014). Locals, resettlers, and pilgrims: A genetic portrait of three pre-columbian andean populations. *American Journal of Physical Anthropology*, 154(3), 402-412.

- Bandelt, H. J., Forster, P. & Röhl, A. (1999). Median-Joining Networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16(1), 37-48.
- Bandelt, H. J., Herrnstadt, C., Yao, Y. G., Kong, Q. P., Kivisild, T., Rengo, C., Scozzari, R., Richards, M., Villems, R., Macaulay, V., Howell, N., Torroni, A. & Zhang, Y. P. (2003). Identification of native american founder mtDNAs through the analysis of complete mtDNA sequences: some caveats. *Annals of Human Genetics*, 67(6), 512-524.
- Barbieri, C., Heggarty, P., Castri, L., Luiselli, D. & Petterner, D. (2011). Mitochondrial DNA variability in the Titicaca basin: matches and mismatches with linguistics and ethnohistory. *American Journal of Human Biology*, 23, 89-99.
- Barbieri, C., Sandoval, J. R., Valqui, J., Shimelman, A., Ziemendorff, S., Schröder, R., Geppert, M., Roewer, L., Gray, R., Stoneking, M., Fujita, R. & Heggarty, P. (2017). Enclaves of genetic diversity resisted Inca impacts on population history. *Scientific Reports*, 7(1), 1-12.
- Batai, K. & Williams, S. R. (2014). Mitochondrial variation among the Aymara and the signatures of population expansion in the Central Andes. *American Journal of Human Biology*, 26(3), 321-330.
- Bertoni, B., Figueiro, G., Cabana, G., McDonough, J. E., Bluteau, C., Merriwether, D. & Sans, M. (2004). Primeras secuencias de ADN mitocondrial de indígenas prehistóricos del Uruguay. En L. Beovide, I. Barreto, & C. Curbelo (Eds.), *X Congreso Uruguayo de Arqueología: La Arqueología Uruguaya ante los desafíos del nuevo siglo*. Montevideo: Asociación Uruguaya de Arqueología.
- Bertoni, B., Portas, M. & Sans, M. (2000). Relaciones morfológicas de las poblaciones prehistóricas del Uruguay: Análisis de restos esqueléticos humanos. *Arqueología de las Tierras Bajas*, 369-384.
- Bobillo, M. C., Zimmermann, B., Sala, A., Huber, G., Röck, A., Bandelt, H. J., Corach, D. & Parson, W. (2010). Amerindian mitochondrial DNA haplogroups predominate in the population of Argentina: Towards a first nationwide forensic mitochondrial DNA sequence database. *International Journal of Legal Medicine*, 124(4), 263-268.
- Bolnick, D., Bonine, H., Mata-Miguez, J., Kemp, B., Snow, M. & LeBlanc, S. (2012). Nondestructive sampling of human skeletal remains yields ancient nuclear and mitochondrial DNA. *American Journal of Physical Anthropology*, 147, 293-300.
- Bonilla, C., Bertoni, B., González, S., Cardoso, H., Brum-Zorrilla, N. & Sans, M. (2004). Substantial Native American female contribution to the population of Tacuarembó, Uruguay, reveals past episodes of sex-biased gene flow. *American Journal of Human Biology : The Official Journal of the Human Biology Council*, 16(3), 289-297.

- Bortolotto, N., Del Puerto, L., Gascue, A., Loponte, D., Acosta, A., Azcune, G., Inda, H., Fleitas, M. & Rivas, M. (2020). Antrosoles arqueológicos del bajo río Uruguay: una aproximación geoarqueológica a los procesos de formación del sitio Isla del Vizcaíno 1 (departamento Río Negro - Uruguay). *Boletín de Arqueología PUCP*, 1(28), 101-122.
- Borucki, A., Eltis, D. & Wheat, D. (2015). Atlantic history and the slave trade to Spanish America. *The American Historical Review*, 120(2), 433-461.
- Bracco, R. (2006). Montículos de la cuenca de la Laguna Merín: tiempo, espacio y sociedad. *Latin American Antiquity*, 17(4), 511-540.
- Bracco, R., Cabrera, L. M. & López Mazz, J. (2000). La prehistoria de las tierras bajas de la cuenca de la Laguna Merín. En A. Durán & R. Bracco (Eds.), *Arqueología de las Tierras Bajas*, 13-39. Montevideo: Ministerio de Educación y Cultura.
- Brown, M. D., Hosseini, S. H., Torroni, A., Bandelt, H. J., Allen, J. C., Schurr, T. G., Scozzari, R., Cruciani, F. & Wallace, D. C. (1998). mtDNA Haplogroup X: An ancient link between Europe/Western Asia and North America? *The American Journal of Human Genetics*, 63(6), 1852-1861.
- Brown, T. A. & Brown, K. A. (1994). Ancient DNA: Using molecular biology to explore the past. *BioEssays*, 16(10), 719-726.
- Brown, W. M., George, M. & Wilson, A. (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 76, 1967-1971.
- Cabana, G. S., Merriwether, D. A., Hunley, K. & Demarchi, D. A. (2006). Is the genetic structure of Gran Chaco populations unique? Interregional perspectives on native South American mitochondrial DNA variation. *American Journal of Physical Anthropology*, 131(1), 108-119.
- Cabrera, L. (2005). Patrimonio y arqueología en el sur de Brasil y región este de Uruguay: los cerritos de indios. *Salvdie*, 5, 221-254.
- Cabrera, V. M., Marrero, P., Abu-Amero, K. K. & Larruga, J. M. (2018). Carriers of mitochondrial DNA macrohaplogroup L3 basal lineages migrated back to Africa from Asia around 70,000 years ago. *BMC Evolutionary Biology*, 18(1), 1-16.
- Cardena, M. M. S. G., Ribeiro-dos-Santos, Â., Santos, S., Mansur, A. J., Pereira, A. C. & Fridman, C. (2013). Assessment of the relationship between self-declared ethnicity, mitochondrial haplogroups and genomic ancestry in Brazilian individuals. *PLoS ONE*, 8(4), e62005.
- Cardoso, S., Palencia-Madrid, L., Valverde, L., Alfonso-Sánchez, M., Gómez-Pérez, L., Alfaro,

- E., Bravi, C., Dipierri, J., Peña, J. & de Pancorbo, M. (2013). Mitochondrial DNA control region data reveal high prevalence of Native American lineages in Jujuy Province, NW Argentina. *Forensic Science International Genetics*, 7, 52-55.
- Cardozo, D., Dejean, C. B., Russo, M. G., Mazza, B., Loponte, D., Acosta, A., Feuillet, M. R., Cornero, S., Kozameh, L. & Tapia, A. H. (2021). Impacto de la conquista hispánica en el Humedal del Paraná Inferior (Argentina). Una perspectiva histórica y genética mitocondrial. *RUNA, Archivo Para Las Ciencias Del Hombre*, 42(1), 409-433.
- Carnese, F., Mendisco, F., Keyser, C., Dejean, B., Dugounjon, J., Bravi, C., Ludes, B. & Crubezy, E. (2010). Paleogenetical study of pre-columbian samples from Pampa Grande (Salta, Argentina). *American Journal of Physical Anthropology*, 141, 452-462.
- Castillo, A. (2004). Excavaciones y museo: Profundizando en el conocimiento de los grupos "ceramistas" del litoral (Río Negro, Uruguay). En L. Beovide, I. Barretto & C. Curbelo (Eds.), *La Arqueología uruguaya ante los desafíos del nuevo siglo*. Montevideo: Asociación Uruguaya de Arqueología.
- Castro de Guerra, D., Figuera Pérez, C., Bravi, C. M., Saunier, J., Scheible, M., Irwin, J., Coble, M. D. & Rodríguez-Larralde, A. (2012). Sequence variation of mitochondrial DNA control region in North Central Venezuela. *Forensic Science International: Genetics*, 6(5), 2011-2013.
- Catelli, M. L., Álvarez-Iglesias, V., Gómez-Carballa, A., Mosquera-Miguel, A., Romanini, C., Borosky, A., Amigo, J., Carracedo, Á., Vullo, C. & Salas, A. (2011). The impact of modern migrations on present-day multi-ethnic Argentina as recorded on the mitochondrial DNA genome. *BMC Genetics*, 12(1), 77.
- Chinnery, P. F. (2006). Mitochondrial DNA in *Homo sapiens*. *Human Mitochondrial DNA and the Evolution of Homo Sapiens*, 18, 3-15.
- Corella, A., Bert, F., Pérez-Pérez, A., Gené, M. & Turbón, D. (2007). Mitochondrial DNA diversity of the Amerindian populations living in the Andean Piedmont of Bolivia: Chimane, Mosenen, Aymara and Quechua. *Annals of Human Biology*, 34(1), 34-55.
- Crawford, M. H. (1998). *The Origins of Native Americans: Evidence from Anthropological Genetics*. Cambridge: Cambridge University Press.
- de Araujo, L. F., Fonseca, A. S., Muys, B. R. et al. (2015). Mitochondrial genome instability in colorectal adenoma and adenocarcinoma. *Tumor Biology*, 36(11), 8869-8879.
- de Saint Pierre, M., Bravi, C. M., Motti, J. M. B., Fuku, N., Tanaka, M., Llop, E., Bonatto, S. L. & Moraga, M. (2012b). An alternative model for the early peopling of Southern South America revealed by analyses of three mitochondrial DNA haplogroups. *PLoS ONE*,

7(9), e43486.

de Saint Pierre, M., Gandini, F., Perego, U. A., Bodner, M., Gómez-Carballa, A., Corach, D., Angerhofer, N., Woodward, S. R., Semino, O., Salas, A., Parson, W., Moraga, M., Achilli, A., Torroni, A. & Olivieri, A. (2012a). Arrival of Paleo-Indians to the Southern Cone of South America: New clues from mitogenomes. *PLoS ONE*, 7(12), 1-9.

Deguilloux, M. F., Ricaud, S., Leahy, R. & Pemonge, M. H. (2011). Analysis of ancient human DNA and primer contamination: One step backward one step forward. *Forensic Science International*, 210(1-3), 102-109.

Drobnic, K. (2006). A new primer set in a SRY gene for sex identification. *International Congress Series*, 1288, 268-270.

Ephrussi, B., Hottinguer, H. & Chimenes, Y. (1949). Action de l'acriflavine sur les levures. 1. La mutation "petite colonie". *Annales de l'Institut Pasteur*, 76, 351-367.

Fagundes, N. J. R., Kanitz, R., Eckert, R., Valls, A. C. S., Bogo, M. R., Salzano, F. M., Smith, D. G., Silva, W. A., Zago, M. A., Ribeiro-dos-Santos, A. K., Santos, S. E. B., Petzl-Erler, M. L. & Bonatto, S. L. (2008). Mitochondrial population genomics supports a single Pre-Clovis origin with a coastal route for the peopling of the Americas. *American Journal of Human Genetics*, 82(3), 583-592.

Fehren-Schmitz, L., Haak, W., Mächtle, B., Masch, F., Llamas, B., Cagigao, E. T., Sossna, V., Schitteck, K., Cuadrado, J. I., Eitel, B. & Reindel, M. (2014). Climate change underlies global demographic, genetic, and cultural transitions in pre-Columbian southern Peru. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(26), 9443-9448.

Fernández-Silva, P., Enriquez, J. A. & Montoya, J. (2003). Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Experimental Physiology*, 88(1), 41-56.

Figueiro, G. (2006). *Estudio de las características y la continuidad de la población prehistórica de Arroyo Seco, Argentina, a través del ADN mitocondrial*. Montevideo: Universidad de la República.

Figueiro, G. (2013b). Continuidad temporal en la composición genética de las poblaciones indígenas del Uruguay. *Colección Avances de Investigación (Tomo Docentes)*, 127(4), 141-159.

Figueiro, G. (2013a). *Estudio de la variación temporal y espacial en el ADN mitocondrial de las poblaciones prehistóricas de la región pampeana*. Montevideo: Universidad de la República.

- Figueiro, G. (2014). Bioarqueología en el Uruguay: situación actual y perspectivas futuras. *Avances Recientes en la Bioarqueología Latinoamericana*, 47-68.
- Figueiro, G., Cabrera Pérez, L., Lindo, J., Mallott, E. K., Owings, A., Malhi, R. S. & Sans, M. (2017). Análisis del genoma mitocondrial de dos individuos inhumados en el sitio arqueológico CG14E01 “Isla Larga” (Rocha, Uruguay). *Revista Argentina de Antropología Biológica*, 19(1), 17.
- Figueiro, G., Hidalgo, P. C. & Sans, M. (2011). Control region variability of haplogroup C1d and the tempo of the peopling of the Americas. *PLoS ONE*, 6(6), e20978.
- Figueiro, G., Mut, P., Ale, L., Flores-Gutierrez, S., Greif, G., Hidalgo, P. C., Luna, S. L., Ackermann, E., Negro, R. G., Spangenberg, L., Naya, H. & Sans, M. (2022). Filogeografía de mitogenomas indígenas de Uruguay. *Revista Argentina de Antropología Biológica*, 24(1), 1-20.
- Figueiro, G., Mut, P. & Sans, M. (2021). Los estudios moleculares para análisis de orígenes poblacionales y ancestría. *Revista del Instituto de Estudios Genealógicos del Uruguay*, 37, 287-303.
- Figueiro, G. & Sans, M. (2011). Determinación de sexo y proporciones sexuales en restos prehistóricos del Uruguay. *Colección Avances de Investigación*, 1, 1-22.
- Filon, D., Faerman, M., Smith, P. & Oppenheim, A. (1995). Sequence analysis reveals a beta-thalassaemia mutation in the DNA of skeletal remains from the archaeological site of Akhziv, Israel. *Nature Genetics*, 9(4), 365-368.
- Flegenheimer, N., Bayón, C., Valente, M., Baeza, J. & Femenías, J. (2003). Long distance tool stone transport in the Argentine Pampas. *Quaternary International*, 109–110, 49-64.
- Forster, P., Harding, R., Torroni, A. & Bandelt, H. J. (1996). Origin and evolution of Native American mtDNA variation: A reappraisal. *American Journal of Human Genetics*, 59, 935-945.
- Frisch, T., Sørensen, M., Overgaard, S., Lind, M. & Bretlau, P. (1998). Volume-referent bone turnover estimated from the interlabel area fraction after sequential labeling. *Bone*, 22(6), 677-682.
- Fu, Q., Mittnik, A., Johnson, P. L. F., Bos, K., Lari, M., Bollongino, R., Sun, C., Giemsch, L., Schmitz, R., Burger, J., Ronchitelli, A. M., Martini, F., Cremonesi, R. G., Svoboda, J., Bauer, P., Caramelli, D., Castellano, S., Reich, D., Pääbo, S., & Krause, J. (2013). A Revised Timescale for Human Evolution Based on Ancient Mitochondrial Genomes. *Current Biology*, 23(7), 553-559.

- Fujimoto, A., Kimura, R., Ohashi, J., Omi, K., Yuliwulandari, R., Batubara, L., Mustofa, M. S., Samakkarn, U., Settheetham-ishida, W., Ishida, T., Morishita, Y., Furusawa, T., Nakazawa, M., Ohtsuka, R. & Tokunaga, K. (2008). A scan for genetic determinants of human hair morphology: EDAR is associated with Asian hair thickness. *Human Molecular Genetics*, 17(6), 835-843.
- Galtier, N., Nabholz, B., Glémin, S. & Hurst, G. D. D. (2009). Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: A reappraisal. *Molecular Ecology*, 18(22), 4541-4550.
- García-Alcalde, F., Okonechnikov, K., Carbonell, J., Cruz, L. M., Götz, S., Tarazona, S., Dopazo, J., Meyer, T. F., & Conesa, A. (2012). Qualimap: evaluating next-generation sequencing alignment data. *Bioinformatics*, 28(20), 2678-2679.
- García, A. & Demarchi, D. A. (2009). Incidence and distribution of native American mtDNA haplogroups in central Argentina. *Human Biology*, 81(1), 59-69.
- García, A., Nores, R., Motti, J. M. B., Pauro, M., Luisi, P., Bravi, C. M., Fabra, M., Gosling, A. L., Kardailsky, O., Boocock, J., Solé-Morata, N., Matisoo-Smith, E. A., Comas, D. & Demarchi, D. A. (2021). Ancient and modern mitogenomes from Central Argentina: New insights into population continuity, temporal depth and migration in South America. *Human Molecular Genetics*, 30(13), 1200-1217.
- García, A., Pauro, M., Bailliet, G., Bravi, C. M. & Demarchi, D. A. (2018). Genetic variation in populations from central Argentina based on mitochondrial and Y chromosome DNA evidence. *Journal of Human Genetics*, 63(4), 493-507.
- Gascue, A., Bortolotto, N., Loponte, D., Acosta, A., Boksar, R. B., Duarte, C., Noguera, A. L., Ferrari, A., Del Puerto, L., Poloni, E. & Rivas, M. (2022). Nuevos aportes para la arqueología de cazadores-recolectores de las tierras bajas de Sudamérica: El sitio Cañada Saldaña (Soriano, Uruguay). Reanálisis de la Colección Oliveras y nuevos datos contextuales y cronológicos. *Anuario de Arqueología, Rosario*, 14, 65-86.
- Gascue, A., Bortolotto, N., Loponte, D., Acosta, A., Borges, C., Fleitas, M. & Fodrin, A. (2019a). Contextos geomorfológicos y tecno-económicos del registro arqueológico del bajo río Uruguay (margen izquierda). Resultados preliminares de nuevas prospecciones. *Arqueología*, 25(3 Dossier), 87-117.
- Gascue, A., Loponte, D., Moreno, F., Bortolotto, N., Rodríguez, X., Figueiro, G., Teixeira de Mello, F. & Acosta, A. (2016). Tecnología, subsistencia y cronología del sitio El Cerro, departamento de Río Negro, Uruguay. *Anuario de Arqueología, Rosario*, 8, 113-139.
- Gascue, A., Scarabino, F., Bortolotto, N., Clavijo, C. & Capdepon, I. (2019b). El rol de los moluscos en las poblaciones prehispánicas de Uruguay. *COMECHINGONIA. Revista de Arqueología*, 23(1), 115-152.

- Gianotti, C. (2015). *Paisajes sociales, monumentalidad y territorio en las tierras bajas de Uruguay*. Tesis de Doctorado. Universidad de Santiago de Compostela.
- Gilbert, M. T. P., Bandelt, H. J., Hofreiter, M. & Barnes, I. (2005a). Assessing ancient DNA studies. *Trends in Ecology and Evolution*, *20*, 541-544.
- Gilbert, M. T. P., Hansen, A. J., Willerslev, E., Turner-Walker, G. & Collins, M. (2006). Insights into the processes behind the contamination degraded human teeth and bone samples with exogenous sources of DNA. *International Journal of Osteoarchaeology*, *16*(2), 156-164.
- Gilbert, M. T. P., Rudbeck, L., Willerslev, E., Hansen, A. J., Smith, C., Penkman, K., Prangenbergef, K., Nielsen-Marshe, C., Jans, M., Arthur, P., Lynnerup, N., Turner-Walker, G., Biddle, M., Kjølbye-Biddle, B. & Collins, M. (2005b). Biochemical and physical correlates of DNA contamination in archaeological human bones and teeth excavated at Matera, Italy. *Journal of Archaeological Science*, *32*(5), 785-793.
- Gómez-Carballa, A., Catelli, L., Pardo-Seco, J., Martínón-Torres, F., Roewer, L., Vullo, C. & Salas, A. (2015). The complete mitogenome of a 500-year-old Inca child mummy. *Scientific Reports*, *5*, 1-11.
- Green, M. & Sambrook, J. (2012). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 4^o Edición. (4^o Edición).
- Green, R. E., Krause, J., Briggs, A. W., Maricic, T., Stenzel, U., Kircher, M., Patterson, N., Li, H., Zhai, W., Fritz, M. H. Y., Hansen, N. F., Durand, E. Y., Malaspinas, A. S., Jensen, J. D., Marques-Bonet, T., Alkan, C., Prüfer, K., Meyer, M., Burbano, H. A., ... Pääbo, S. (2010). A draft sequence of the Neandertal genome. *Science*, *328*(5979), 710-722.
- Grier, C., Flanigan, K., Winters, M., Jordan, L., Lukowski, S. & Kemp, B. (2013). 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.
- Guevara, E. K., Palo, J. U., Översti, S., King, J. L., Seidel, M., Stoljarova, M., Wendt, F. R., Bus, M. M., Guengerich, A., Church, W. B., Guillén, S., Roewer, L., Budowle, B. & Sajantila, A. (2020). Genetic assessment reveals no population substructure and divergent regional and sex-specific histories in the Chachapoyas from northeast Peru. *PLoS ONE*, *15*, 1-24.
- Gustafsson, C. M., Falkenberg, M. & Larsson, N. G. (2016). Maintenance and expression of mammalian mitochondrial DNA. *Annual Review of Biochemistry*, *85*, 133-160.
- Hagelberg, E., Sykes, B. & Hedges, R. (1989). Ancient bone DNA amplified. *Nature*, *342*,

485.

- Haile, J. (2012). Ancient DNA extraction from soils and sediments. En B. Shapiro & M. Hofreiter (Eds.), *Ancient DNA. Methods in Molecular Biology* (840th ed.), 57-63. Humana Press.
- Hanihara, T. (2008). Morphological variation of major human populations based on nonmetric dental traits. *American Journal of Physical Anthropology*, 136(2), 169-182.
- Hänni, C., Laudet, V., Sakka, M., Begue, A. & Stehelin, D. (1990). Amplification de fragments d'ADN mitochondrial à partir de dents de d'os humains anciens. *Comptes Rendus de l'Academie Des Sciences, Paris, Series III*, 310, 365-370.
- Hansen, H. B., Damgaard, P. B., Margaryan, A., Stenderup, J., Lynnerup, N., Willerslev, E. & Allentoft, M. E. (2017). Comparing ancient DNA preservation in petrous bone and tooth cementum. *PLOS ONE*, 12(1), e0170940.
- Heintzman, P. D., Froese, D., Ives, J. W., Soares, A. E. R., Zazula, G. D., Letts, B., Andrews, T. D., Driver, J. C., Hall, E., Hare, P. G., Jass, C. N., Mackay, G., Southon, J. R., Stiller, M., Woywitka, R., Suchard, M. A. & Shapiro, B. (2016). Bison phylogeography constrains dispersal and viability of the Ice Free Corridor in western Canada. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(29), 8057-8063.
- Higuchi, R., Bowman, B., Freiberger, M., Ryder, O. A. & Wilson, A. C. (1984). DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature*, 312(5991), 282-284.
- Hillson, S., FitzGerald, C. & Flinn, H. (2005). Alternative dental measurements: Proposals and relationships with other measurements. *American Journal of Physical Anthropology*, 126(4), 413-426.
- Hlusko, L. J., Carlson, J. P., Chaplin, G., Elias, S. A., Hoffecker, J. F., Huffman, M., Jablonski, N. G., Monson, T. A., O'Rourke, D. H., Pilloud, M. A. & Richard Scott, G. (2018). Environmental selection during the last ice age on the mother-to-infant transmission of vitamin D and fatty acids through breast milk. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(19), E4426-E4432.
- Hofreiter, M., Jaenicke, V., Serre, D., Von Haeseler, A. & Pääbo, S. (2001). DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA. *Nucleic Acids Research*, 29(23), 4793-4799.
- Hofreiter, M., Paijmans, J. L. A., Goodchild, H., Speller, C. F., Barlow, A., Fortes, G. G., Thomas, J. A., Ludwig, A. & Collins, M. J. (2015). The future of ancient DNA: Technical advances and conceptual shifts. *BioEssays*, 37(3), 284-293.

- Horai, S., Hayasaka, K., Murayama, K., Wate, N., Koike, H. & Nakai, N. (1989). DNA amplification from ancient human skeletal remains and their sequence analysis. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 65, 229-233.
- Horai, S., Kondo, R., Nakagawa-Hattori, Y., Hayashi, S., Sonoda, S. & Tajima, K. (1993). Peopling of the Americas, founded by four major lineages of mitochondrial DNA. *Molecular Biology Evolution*, 10, 23-47.
- Höss, M., Jaruga, P., Zastawny, T. H., Dizdaroglu, M. & Pääbo, S. (1996). DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. *Nucleic Acids Research*, 24(7), 1304-1307.
- Höss, M. & Pääbo, S. (1993). DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method. *Nucleic Acids Research*, 21(16), 3913-3914.
- Hummel, S. & Herrmann, B. (1991). Y-chromosome-specific DNA amplified in ancient human bone. *Naturwissenschaften*, 78(6), 266-267.
- Iriarte, J. (2006). Landscape transformation, mounded villages and adopted cultigens: the rise of Early Formative communities in South-Eastern Uruguay. *World Archaeology*, 38(4), 644-663.
- Jenkins, D., Davis, L., Stafford, J. T., Campos, P., Hockett, B., Jones, G., Cummings, L., Yost, C., Connolly, T., Yohe II, R., Gibbons, S., Raghavan, M., Rasmussen, M., Paijmans, J., Hofreiter, M., Kemp, B., Barta, J., Monroe, C., Gilbert, M. & Willerslev, E. (2012). Clovis age Western stemmed projectile points and human coprolites at the Paisley Caves. *Science*, 337, 223-228.
- Jónsson, H., Ginolhac, A., Schubert, M., Johnson, P. L. F., & Orlando, L. (2013). mapDamage2.0: fast approximate Bayesian estimates of ancient DNA damage parameters. *Bioinformatics*, 29(13), 1682-1684.
- Jun, G., Flickinger, M., Hetrick, K. N., Romm, J. M., Doheny, K. F., Abecasis, G. R., Boehnke, M. & Kang, H. M. (2012). Detecting and estimating contamination of human DNA samples in sequencing and array-based genotype data. *American Journal of Human Genetics*, 91(5), 839-848.
- Kamberov, Y. G., Wang, S., Tan, J., Gerbault, P., Wark, A., Tan, L., Yang, Y., Li, S., Tang, K., Chen, H., Powell, A., Itan, Y., Fuller, D., Lohmueller, J., Mao, J., Schachar, A., Paymer, M., Hostetter, E., Byrne, E., ... Sabeti, P. C. (2013). Modeling recent human evolution in mice by expression of a selected EDAR variant. *Cell*, 152(4), 691-702.
- Kashani, B. H., Perego, U. A., Olivieri, A., Angerhofer, N., Gandini, F., Carossa, V., Lancioni, H., Semino, O., Woodward, S. R., Achilli, A. & Torroni, A. (2012). Mitochondrial

haplogroup C4c: A rare lineage entering America through the ice-free corridor?
American Journal of Physical Anthropology, 147(1), 35-39.

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. E., Heaton, T. H., Worl, R. & Smith, D. G. (2007). Genetic analysis of early Holocene skeletal remains from Alaska and its implications for the settlement of the Americas. *American Journal of Physical Anthropology*, 132(4), 605-621.

Kemp, B. M. & Schurr, T. G. (2010). Ancient and modern genetic variation in the Americas. En B. M. Auerbach (Ed.), *Human Variation in the Americas*. Carbondale: Center for Archaeological Investigations, Occasional Paper No. 38, 12-50. Southern Illinois University.

Kemp, B. M. & Smith, D. G. (2005). Use of bleach to eliminate contaminating DNA from the surface of bones and teeth. *Forensic Science International*, 154(1), 53-61.

Kemp, B., Tung, T. & Summar, M. (2009). 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.

Kim, K. Y., Kwon, Y., Bazaragchaa, M., Park, A. J., Bang, H., Lee, W. B., Lee, J., Lee, K. H., Kim, B. J. & Kim, K. (2013). A real-time PCR-based amelogenin y allele dropout assessment model in gender typing of degraded DNA samples. *International Journal of Legal Medicine*, 127(1), 55-61.

Kimura, R., Yamaguchi, T., Takeda, M., Kondo, O., Toma, T., Haneji, K., Hanihara, T., Matsukusa, H., Kawamura, S., Maki, K., Osawa, M., Ishida, H. & Oota, H. (2009). A common variation in EDAR is a genetic determinant of shovel-shaped incisors. *American Journal of Human Genetics*, 85(4), 528-535.

Knapp, M., Clarke, A. C., Horsburgh, K. A. & Matisoo-Smith, E. A. (2012). Setting the stage - Building and working in an ancient DNA laboratory. *Annals of Anatomy*, 194(1), 3-6.

Knapp, M. & Hofreiter, M. (2010). Next generation sequencing of ancient DNA: Requirements, strategies and perspectives. *Genes*, 1, 227-243.

Kress, W. J. & Erickson, D. L. (2012). DNA barcodes: Methods and protocols. En W. Kress & D. Erickson (Eds.), *DNA Barcodes. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, 858, 3-8. Humana Press, Totowa, NJ.

Krings, M., Stone, A., Schmitz, R. W., Krainitzki, H., Stoneking, M. & Pääbo, S. (1997). Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell*, 90, 19-30.

- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, *35*, 1547-1549.
- Lassen, C., Hummel, S. & Herrmann, B. (1996). PCR based sex identification of ancient human bones by amplification of X- and Y-chromosomal sequences: a comparison. *Ancient Biomolecules*, *1*, 25-33.
- Lewis, C. M., Lizárraga, B., Tito, R. & López, P. (2007). Mitochondrial DNA and peopling of South America. *Human Biology*, *79*(2), 159-178.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., & Genome Project Data Processing, S. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, *25*(16), 2078-2079.
- Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, *362*(6422), 709-715.
- Lindo, J., De La Rosa, R., Santos, A. L. C. d, Sans, M., DeGiorgio, M. & Figueiro, G. (2022). The genomic prehistory of the Indigenous peoples of Uruguay. *PNAS Nexus*, *1*(2), 1-7.
- Llamas, B., Fehren-Schmitz, L., Valverde, G., Soubrier, J., Mallick, S., Rohland, N., Nordenfelt, S., Valdiosera, C., Richards, S. M., Rohrlach, A., Romero, M. I. B., Espinoza, I. F., Cagigao, E. T., Jiménez, L. W., Makowski, K., Reyna, I. S. L., Lory, J. M., Torrez, J. A. B., Rivera, M. A., ... Haak, W. (2016). Ancient mitochondrial DNA provides high-resolution time scale of the peopling of the Americas. *Science Advances*, *2*(4), e1501385.
- Llorente, M. G., Jones, E. R., Eriksson, A., Siska, V., Arthur, K. W., Arthur, J. W., Curtis, M. C., Stock, J. T., Coltorti, M., Pieruccini, P., ... Manica, A. (2015). Ancient Ethiopian genome reveals extensive Eurasian admixture in Eastern Africa. *Science*, *350*(6262), 820-822.
- López Mazz, J. M. (2001). Las estructuras tumulares (cerritos) del litoral Atlántico uruguayo. *Latin American Antiquity*, *12*, 231-255.
- Luo, S., Valencia, C. A., Zhang, J., Lee, N. C., Slone, J., Gui, B., Wang, X., Li, Z., Dell, S., Brown, J., Chen, S. M., Chien, Y. H., Hwu, W. L., Fan, P. C., Wong, L. J., Atwal, P. S. & Huang, T. (2018). Biparental inheritance of mitochondrial DNA in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(51), 13039-13044.
- Lutz, S., Wittig, H., Weisser, H., Heizmann, J., Junge, A., Parson, W., Edelman, J., Anslinger, K., Jung, S. & Augustin, C. (2000). Is it possible to differentiate mtDNA by

means of HVIII in samples that cannot be distinguished by sequencing the HVI and HVII regions? *Forensic Science International*, 113, 97-101.

- MacHugh, D. E., Edwards, C. J., Bailey, J. F., Bancroft, D. R. & Bradley, D. G. (2000). The extraction and analysis of ancient DNA from bone and teeth: a survey of current methodologies. *Ancient Biomolecules*, 3, 81-102.
- Malhi, R. S., Kemp, B. . M., Eshleman, J. A., Cybulski, J., Smith, D. G., Cousins, S. & Harry, H. (2007). Mitochondrial haplogroup M discovered in prehistoric North Americans. *Journal of Archaeological Science*, 34(4), 642-648.
- Mannucci, A., Sullivan, K. M., Ivanov, P. L. & Gill, P. (1994). Forensic application of a rapid and quantitative DNA sex test by amplification of the X-Y homologous gene amelogenin. *International Journal of Legal Medicine*, 106(4), 190-193.
- Marrero, A. R., Bravi, C., Stuart, S., Long, J. C., Pereira Das Neves Leite, F., Kommers, T., Carvalho, C. M. B., Pena, S. D. J., Ruiz-Linares, A., Salzano, F. M. & Cátira Bortolini, M. (2007a). Pre- and post-Columbian gene and cultural continuity: The case of the Gaucho from southern Brazil. *Human Heredity*, 64(3), 160-171.
- Marrero, A. R., Silva-Junior, W. A., Bravi, C. M., Hutz, M. H., Petzl-Erler, M. L., Ruiz-Linares, A., Salzano, F. M. & Bortolini, M. C. (2007b). Demographic and evolutionary trajectories of the Guarani and Kaingang natives of Brazil. *American Journal of Physical Anthropology*, 132, 301-310.
- Maruca Sosa, R. (1957). Historia de un túmulo. *La nación Charrúa*, 175-194.
- McKeown, B., Sickley, J. & Riordan, A. (2000). Gender assignment by PCR of the SRY gene: an improvement on amelogenin. *Progress in Forensic Genetics*, 8(8), 433-435.
- Mendisco, F., Keyser, C., Seldes, V., Rivolta, C., Marcolli, P., Cruz, P., Nielsen, A., Crubezy, E. & Ludes, B. (2014). Genetic diversity of a late prehispanic group of the Quebrada de Humaahuaca, northwestern Argentina. *Annals of Human Genetics*, 78(5), 367-380.
- Milheira, R. & Gianotti, C. (2018). The Earthen Mounds (cerritos) of Southern Brazil and Uruguay. En C. Smith (Ed.), *Encyclopedia of Global Archaeology*. Springer: New York.
- Moraga, M., de Saint Pierre, M., Torres, F. & Ríos, J. (2010). Vínculos de parentesco por vía materna entre los últimos descendientes de la etnia Kawésqar y algunos entierros en los canales patagónicos: evidencia desde el estudio de linajes mitocondriales. *Magallania*, 38, 103-114.
- Moreno-Mayar, J. V., Vinner, L., De Barros Damgaard, P., De La Fuente, C., Chan, J., Spence, J. P., Allentoft, M. E., Vimala, T., Racimo, F., Pinotti, T., Rasmussen, S.,

- Margaryan, A., Orbegozo, M. I., Mylopotamitaki, D., Wooller, M., Bataille, C., Becerra-Valdivia, L., Chivall, D., Comeskey, D., ... Willerslev, E. (2018). Early human dispersals within the Americas. *Science*, 362(6419), eaav2621.
- Moreno, F., Figueiro, G. & Sans, M. (2014). Huesos mezclados: restos humanos de subadultos en el conjunto arqueofaunístico de un sitio prehistórico en el este de Uruguay. *Revista Argentina de Antropología Biológica*, 16(2), 65-78.
- Motti, J. M. B., Winingear, S., Valenzuela, L. O., Nieves-Colón, M. A., Harkins, K. M., García Laborde, P., Bravi, C. M., Guichón, R. A. & Stone, A. C. (2020). Identification of the geographic origins of people buried in the cemetery of the Salesian Mission of Tierra del Fuego through the analyses of mtDNA and stable isotopes. *Journal of Archaeological Science: Reports*, 33, 102559.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51(1), 263-273.
- Mut, P. (2013). Determinación de sexo a partir de técnicas moleculares en restos humanos prehistóricos del Uruguay y su aplicación en arqueología. *Anuario de Arqueología, Universidad de La República, Facultad de Humanidades y Ciencias de La Educación*, 273-305.
- Mut, P. (2015). Paleodieta de los pobladores prehistóricos del este del Uruguay: un retrato isotópico. *Anuario de Arqueología 2015*, 147-178.
- Mut, P. (2019). *Estudio de ancestría y linajes paternos en la población uruguaya a través del análisis de marcadores moleculares del cromosoma Y*. Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación, Universidad de la República.
- Nakahori, Y., Takenaka, O. & Nakagome, Y. (1991). A human X-Y homologous region encodes "amelogenin". *Genomics*, 9(2), 264-269.
- Nass, M. M. K. & Nass, S. (1963). Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. I. Fixation and electron staining reactions. *Journal of Cell Biology*, 19, 593-611.
- O'Rourke, D. H. (2006). Blood groups, immunoglobulins, and genetic variation. En D. Ubelaker (Ed.), *Handbook of North American Indians, vol 3: Environment, Origins, and Population*, 762-776. Washington, D.C.: Smithsonian Institution.
- O'Rourke, D. H., Hayes, M. G. & Carlyle, S. W. (2000a). Ancient DNA studies in physical anthropology. *Annual Review of Anthropology*, 29, 217-242.
- O'Rourke, D. H., Hayes, M. G. & Carlyle, S. W. (2000b). Spatial and temporal stability of

- mtDNA haplogroup frequencies in native North America. *Human Biology*, 72, 15-34.
- O'Rourke, D. H. & Raff, J. A. (2010). The human genetic history of the Americas: The final frontier. *Current Biology*, 20(4), R202-R207.
- Orlando, L., Allaby, R., Skoglund, P., Der Sarkissian, C., Stockhammer, P. W., Ávila-Arcos, M. C., Fu, Q., Krause, J., Willerslev, E., Stone, A. C. & Warinner, C. (2021). Ancient DNA analysis. *Nature Reviews Methods Primers*, 1(14), 1-26.
- Pääbo, S. (1985). Molecular cloning of ancient Egyptian mummy DNA. *Nature*, 314, 644-645.
- Pääbo, S., Higuchi, R. G. & Wilson, A. C. (1989). Ancient DNA and the polymerase chain reaction. The emerging field of molecular archaeology. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(17), 9709-9712.
- Pääbo, S., Poinar, H., Serre, D., Jaenicke-Després, V., Hebler, J., Rohland, N., Kuch, M., Krause, J., Vigilant, L. & Hofreiter, M. (2004). Genetic analyses from ancient DNA. *Annual Review of Genetics*, 38, 645-679.
- Pacioni, C., Hunt, H., Allentoft, M. E., Vaughan, T. G., Wayne, A. F., Baynes, A., Haouchar, D., Dortch, J. & Bunce, M. (2015). Genetic diversity loss in a biodiversity hotspot: Ancient DNA quantifies genetic decline and former connectivity in a critically endangered marsupial. *Molecular Ecology*, 24(23), 5813-5828.
- Pagano, S., Sans, M., Pimenoff, V., Cantera, A. M., Alvarez, J. C., Lorente, J. A., Peco, J. M., Mones, P. & Sajantila, A. (2005). Assessment of HV1 and HV2 mtDNA variation for forensic purposes in an uruguayan population sample. *Journal of Forensic Sciences*, 50(5), 1-4.
- Pakendorf, B. & Stoneking, M. (2005). Mitochondrial DNA and human evolution. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 6, 165-183.
- Palmirota, R., Verginelli, F., Di Tota, G., Battista, P., Cama, A., Caramiello, S., Capasso, L. & Mariani-Costantini, R. (1997). Use of a multiplex polymerase chain reaction assay in the sex typing of DNA extracted from archaeological bone. *International Journal of Osteoarchaeology*, 7(6), 605-609.
- Park, J. H., Yamaguchi, T., Watanabe, C., Kawaguchi, A., Haneji, K., Takeda, M., Kim, Y. Il, Tomoyasu, Y., Watanabe, M., Oota, H., Hanihara, T., Ishida, H., Maki, K., Park, S. B. & Kimura, R. (2012). Effects of an Asian-specific nonsynonymous EDAR variant on multiple dental traits. *Journal of Human Genetics*, 57(8), 508-514.
- 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., ... Torroni, A. (2010). The initial peopling of the Americas: A growing number of founding mitochondrial genomes from Beringia. *Genome Research*, 20(9), 1174-1179.
- Pilli, E., Modi, A., Serpico, C., Achilli, A., Lancioni, H., Lippi, B., Bertoldi, F., Gelichi, S., Lari, M. & Caramelli, D. (2013). Monitoring DNA contamination in handled vs. directly excavated ancient human skeletal remains. *PLoS ONE*, 8(1), 1-6.
- Pinz, K. G. & Bogenhagen, D. F. (1998). Efficient repair of abasic sites in DNA by mitochondrial enzymes. *Molecular and Cellular Biology*, 18(3), 1257-1265.
- Polzin, T. & Daneschmand, S. V. (2003). On Steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs. *Operat Res Lett*, 31, 12-20.
- Posth, C., Nakatsuka, N., Lazaridis, I., Skoglund, P., Mallick, S., Lamnidis, T. C., Rohland, N., Nägele, K., Adamski, N., Bertolini, E., Broomandkhoshbacht, N., Cooper, A., Culleton, B. J., Ferraz, T., Ferry, M., Furtwängler, A., Haak, W., Harkins, K., Harper, T. K., ... Reich, D. (2018). Reconstructing the deep population history of Central and South America. *Cell*, 175(5), 1185-1197.
- Postillone, M. B. (2016). *Estudio de ADN antiguo en muestras precolombinas de Argentina*. Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Naturales y Museo.
- Postillone, M. B., Crespo, C. M., Russo, M. G. & Cardozo, D. G. (2014). Distribución de haplogrupos mitocondriales amerindios en muestras arqueológicas de Sudamérica. En A. C. Esnal, M. L. Funes & G. Romero (Eds.), *Entre pasados y presentes IV. Estudios contemporáneos en Ciencias Antropológicas*, 347-362. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Editorial Asociación Amigos del Instituto Nacional de Antropología (AINA).
- Raff, J. A., Bolnick, D. A., Tackney, J. & O'Rourke, D. H. (2011). Ancient DNA perspectives on American colonization and population history. *American Journal of Physical Anthropology*, 146(4), 503-514.
- Raff, J., Tackney, J. & O'Rourke, D. H. (2010). South from Alaska: A pilot aDNA study of genetic history on the Alaska Peninsula and the Eastern Aleutians. *Human Biology*, 82, 677-693.
- Ramallo, V., Bisso-Machado, R., Bravi, C., Coble, M. D., Salzano, F. M., Hünemeier, T. & Bortolini, M. C. (2013). Demographic expansions in South America: Enlightening a complex scenario with genetic and linguistic data. *American Journal of Physical Anthropology*, 150(3), 453-463.
- Rasmussen, M., Li, Y., Lindgreen, S., Pedersen, J. S., Albrechtsen, A., Moltke, I., Metspalu,

- M., Metspalu, E., Kivisild, T., Gupta, R., Bertalan, M., Nielsen, K., Gilbert, M. T. P., Wang, Y., Raghavan, M., Campos, P. F., Kamp, H. M., Wilson, A. S., Gledhill, A., ... Willerslev, E. (2010). Ancient human genome sequence of an extinct Palaeo-Eskimo. *Nature*, *463*(7282), 757-762.
- Reich, D., Green, R. E., Kircher, M., Krause, J., Patterson, N., Durand, E. Y., Viola, B., Briggs, A. W., Stenzel, U., Johnson, P. L. F., Maricic, T., Good, J. M., Marques-Bonet, T., Alkan, C., Fu, Q., Mallick, S., Li, H., Meyer, M., Eichler, E. E., ... Pääbo, S. (2010). Genetic history of an archaic hominin group from Denisova Cave in Siberia. *Nature*, *468*(7327), 1053-1060.
- Rieux, A., Eriksson, A., Li, M., Sobkowiak, B., Weinert, L., Warmuth, V., Ruiz-Linares, A., Manica, A. & Balloux, F. (2014). Improved Calibration of the Human Mitochondrial Clock Using Ancient Genomes. *Molecular Biology and Evolution*. *31*(10), 2780-2792.
- Rodríguez, S. (2019). *Poblaciones Pasadas: Actividad y Patología de los grupos que habitaron en la localidad arqueológica de Colonia Concordia*. Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación, Universidad de la República.
- Ruiz-Pesini, E. & Wallace, D. C. (2006). Evidence for adaptive selection acting on the tRNA and rRNA genes of human mitochondrial DNA. *Human Mutation*, *27*(11), 1072-1081.
- Russo, M. G., Mendisco, F., Avena, S. A., Dejean, C. B. & Seldes, V. (2016). Pre-Hispanic Mortuary Practices in Quebrada de Humahuaca (North-Western Argentina): Genetic relatedness among individuals buried in the same grave. *Annals of Human Genetics*, *80*(4), 210-220.
- Saccone, E. (2020). Seafaring as a key element in the first peopling of the Americas: A perspective from the Southern Cone. *Journal of Maritime Archaeology*, *15*, 41-56.
- Sagan, L. (1967). On the origin of mitosing cells. *Journal of Theoretical Biology*, *14*, 255-274.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, *239*(4839), 487-491.
- Sala, A., Argüelles, C. F., Marino, M. E., Bobillo, C., Fenocchio, A. & Corach, D. (2010). Genetic analysis of six communities of Mbyá-Guaraní inhabiting Northeastern Argentina by means of nuclear and mitochondrial polymorphic markers. *Human Biology*, *82*(4), 433-456.
- Sala, A. & Corach, D. (2014). Analysis of admixture and genetic structure of two Native American groups of Southern Argentinean Patagonia. *Molecular Biology Reports*, *41*,

1533-1543.

- Salido, E. C., Yen, P. H., Koprivnikar, K., Yu, L. & Shapiro, L. J. (1992). The human enamel protein gene amelogenin is expressed from both the X and the Y chromosomes. *American Journal of Human Genetics*, 50(2), 303-316.
- Sandoval, J. R., Lacerda, D. R., Jota, M., Salazar-Granara, A., Vieira, P. P., Acosta, O., Cuellar, C., Revollo, S., Fujita, R., Santos, F. & Consortium., T. G. P. (2013). The genetic history of indigenous populations of the Peruvian and Bolivian Altiplano: the legacy of the Uros. *PLoS ONE*, 8(9), 73006.
- Sandoval, K., Buentello-Malo, L., Peñaloza-Espino, R., Avelino, H., Salas, A., Calafell, F. & Comas, D. (2009). Linguistic and maternal genetic diversity are not correlated in Native Mexicans. *Human Genetics*, 126, 521-531.
- Sanguinetti, C. J., Dias Neto, E. & Simpson, A. J. G. (1994). Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *BioTechniques*, 17(5), 914-921.
- Sans, M. & Figueiro, G. (2009). Continuidad indígena en la población uruguaya actual: ¿Guaraníes o Charrúas? En L. Beovide, C. Erchini, & G. Figueiro (Eds.), *La arqueología como profesión: los primeros 30 años XI Congreso Nacional de Arqueología Uruguaya*, 344-359. Montevideo: Asociación Uruguaya de Arqueología.
- Sans, M. & Figueiro, G. (2018). From genetics to identity and back again: Genetic continuity and indian reemergence in Uruguay. *American Anthropologist*, 120(2), 340-343.
- Sans, M., Figueiro, G., Bonilla, C., Bertoni, B., Cappetta, M., Artagaveytia, N., Ackermann, E., Mut, P. & Hidalgo, P. C. (2021). Ancestría genética y estratificación social en Montevideo, Uruguay. *Revista Argentina de Antropología Biológica*, 23(1), 1-19.
- Sans, M., Figueiro, G. & Hidalgo, P. C. (2012). A new mitochondrial C1 lineage from the prehistory of Uruguay: Population genocide, ethnocide, and continuity. *Human Biology*, 84(3), 287-305.
- Sans, M., Figueiro, G., Hughes, C. E., Lindo, J., Hidalgo, P. C. & Malhi, R. S. (2015). A south American prehistoric mitogenome: Context, continuity, and the origin of haplogroup C1d. *PLoS ONE*, 10(10), 1-14.
- Sans, M., Figueiro, G., Sanguinetti, C., Echarte-raffaelli, L., Portela, C., Taranto, L., Pizzarossa, C., Oliver, R., Manikowski, R., Barreto, I., Hidalgo, P., Berro, G., Barreto, I., Hidalgo, P. C. & Berro, G. (2010). The last Charrua Indian (Uruguay): analysis of the remains of Chief Vaimaca Perú. *Nature Precedings*, s/p.

- Sans, M., Merriwether, D. A., Hidalgo, P. C., Bentancor, N., Weimer, T. A., Franco, M. H. L. P., Alvarez, I., Kemp, B. M. & Salzano, F. M. (2006). Population structure and admixture in Cerro Largo, Uruguay, based on blood markers and mitochondrial DNA polymorphisms. *American Journal of Human Biology : The Official Journal of the Human Biology Council*, 18(4), 513-524.
- Sans, M. & Portas, M. (2001). Determinación del sexo en restos esqueléticos: morfología vs. biología molecular. En *Actas del IX Congreso Nacional de Arqueología Uruguaya. Arqueología uruguaya hacia el fin del milenio*, 241-253. Montevideo, Gráficos del Sur.
- Scabuzzo, C., Figueiro, G. & Gordón, F. (2019). Bioarcheology in Southern Cone of South America: The Pampas, Patagonia and Uruguay. En D. H. Ubelaker & S. Colantonio (Eds.), *Smithsonian Institution's Contributions to Anthropology*, 51, 281-293. Smithsonian Institution Scholarly Press.
- Schurr, T. G., Ballinger, S. W., Gan, Y. Y., Hodge, J. A., Andrew, D., Lawrence, D. N., Knowler, W. C., Weissii, K. M. & Wallace, D. C. (1990). Amerindian mitochondrial DNAs have rare asian mutations at high frequencies, suggesting they derived from four primary maternal lineages. *American Journal of Human Genetics*, 46(3), 613-623.
- Seersholm, F. V., Hansen, K. L., Heydenrych, M., Hansen, A. J., Bunce, M. & Allentoft, M. E. (2021). Ancient DNA preserved in small bone fragments from the P.W. Lund collection. *Ecology and Evolution*, 11(5), 2064-2071.
- Sevini, F., Vianello, D., Barbieri, C., Iaquilano, N., De Fanti, S., Luiselli, D., Franceschi, C. y Franceschi, Z. (2014). Human mitochondrial genomes reveal population structure and different phylogenies in Gran Chaco (Argentina). GenBank. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>
- Shokralla, S., Spall, J. L., Gibson, J. F. & Hajibabaei, M. (2012). Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Molecular Ecology*, 21, 1794-1805.
- Shook, B. A. (2005). *Ancient DNA and the biological history and prehistory of northeastern North America*. University of California, Davis.
- Sigurðardóttir, S., Helgason, A., Gulcher, J. R., Stefansson, K. & Donnelly, P. (2000). The mutation rate in the human mtDNA control region. *American Journal of Human Genetics*, 66(5), 1599-1609.
- Sikora, M., Pitulko, V. V., Sousa, V. C., Allentoft, M. E., Vinner, L., Rasmussen, S., Margaryan, A., de Barros Damgaard, P., de la Fuente, C., Renaud, G., Yang, M. A., Fu, Q., Dupanloup, I., Giampoudakis, K., Nogués-Bravo, D., Rahbek, C., Kroonen, G., Peyrot, M., McColl, H., ... Willerslev, E. (2019). The population history of northeastern Siberia since the Pleistocene. *Nature*, 570(7760), 182-188.

- Simão, F., Strobl, C., Vullo, C., Catelli, L., Machado, P., Huber, N., Schnaller, L., Huber, G., Xavier, C., Carvalho, E. F., Gusmão, L. & Parson, W. (2019). The maternal inheritance of Alto Paraná revealed by full mitogenome sequences. *Forensic Science International: Genetics*, 39, 66-72.
- Skoglund, P., Posth, C., Sirak, K., Spriggs, M., Valentin, F., Bedford, S., Clark, G. R., Reepmeyer, C., Petchey, F., Fernandes, D., Fu, Q., Harney, E., Lipson, M., Mallick, S., Novak, M., Rohland, N., Stewardson, K., Abdullah, S., Cox, M. P., ... Reich, D. (2016). Genomic insights into the peopling of the Southwest Pacific. *Nature*, 538(7626), 510-513.
- Skoglund, P. & Reich, D. (2016). A genomic view of the peopling of the Americas. *Current Opinion in Genetics & Development*, 41, 27-35.
- Soares, P., Alshamali, F., Pereira, J. B., Fernandes, V., Silva, N. M., Afonso, C., Costa, M. D., Musilová, E., MacAulay, V., Richards, M. B., Černý, V. & Pereira, L. (2012). The expansion of mtDNA haplogroup L3 within and out of Africa. *Molecular Biology and Evolution*, 29(3), 915-927.
- Soares, P., Ermini, L., Thomson, N., Mormina, M., Rito, T., Röhl, A., Salas, A., Oppenheimer, S., Macaulay, V. & Richards, M. B. (2009). Correcting for purifying selection: An improved human mitochondrial molecular clock. *American Journal of Human Genetics*, 84(6), 740-759.
- Stewart, N. A., Gerlach, R. F., Gowland, R. L., Gron, K. J. & Montgomery, J. (2017). Sex determination of human remains from peptides in tooth enamel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(52), 13649-13654.
- Stoneking, M. & Krause, J. (2011). Learning about human population history from ancient and modern genomes. *Nature Reviews Genetics*, 12(9), 603-614.
- Suárez, R. (2017). The human colonization of the Southeast Plains of South America: Climatic conditions, technological innovations and the peopling of Uruguay and south of Brazil. *Quaternary International*, 431, 181-193.
- Sullivan, K. M., Mannucci, A., Kimpton, C. P. & Gill, P. (1993). A rapid and quantitative DNA sex test : fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin. *BioTechniques*, 15(4), 636-641.
- Sutter, R. C. (2005). The prehistoric peopling of South America as inferred from epigenetic dental traits. *Andean Past*, 7, 183-217.
- Taboada-Echalar, P., Álvarez-iglesias, V., Heinz, T., Vidal-Bralo, L., Gómez-Carballa, A., Catelli, L., Pardo-Seco, J., Pastoriza, A., Carracedo, A., Torres-Balanza, A., Rocabado,

- O., Vullo, C. & Salas, A. (2013). The genetic legacy of the Pre-Colonial period in contemporary bolivians. *PLoS ONE*, 8(3), 58980.
- Tackney, J., Jensen, A. M., Kisielinski, C. & O'Rourke, D. H. (2019). Molecular analysis of an ancient Thule population at Nuvuk, Point Barrow, Alaska. *American Journal of Physical Anthropology*, 168(2), 303-317.
- 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., Ossipova, L. P., Damba, L., Voevoda, M. I., Dipierri, J. E., ... Malhi, R. S. (2007). Beringian standstill and spread of native American founders. *PLoS ONE*, 2(9), 1-6.
- Thorvaldsdóttir, H., Robinson, J. T. & Mesirov, J. P. (2013). Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Briefings in Bioinformatics*, 14, 178-192.
- Torroni, A., Schurr, T. G., Cabell, M. F., Brown, M. D., Neel, J. V., Larsen, M., Smith, D. G., Vullo, C. M. & Wallace, D. C. (1993). Asian affinities and continental radiation of the four founding Native American mtDNAs. *American Journal of Human Genetics*, 53(3), 563-590.
- Torroni, 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. & Wallace, D. C. (1992). Native American mitochondrial DNA analysis indicates that the Amerind and the Nadene populations were founded by two independent migrations. *Genetics*, 130(1), 153-162.
- Turner, C. G. (1979). Dental anthropological indications of agriculture among the Jomon people of central Japan. X. Peopling of the Pacific. *American Journal of Physical Anthropology*, 51(4), 619-635.
- Tuross, N. (1993). The other molecules in ancient bone: noncollagenous proteins and DNA. En J. Lambert & G. Grupe (Eds.), *Molecular Archaeology of Prehistoric Human Bone*, 275-294. Berlin: Springer.
- Tuross, N. (1994). The biochemistry of ancient DNA in bone. *Experientia*, 50, 530-35.
- Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R. & Leunissen, J. A. M. (2007). Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Research*, 35, w71-w74.
- van Oven, M. & Kayser, M. (2009). Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Human Mutation*, 30(2), 386-394.

- Vigilant, L., Pennington, R., Harpending, H., Kocher, T. D. & Wilson, A. C. (1989). Mitochondrial DNA sequences in single hairs from a southern African population. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 86, 9350-9354.
- Wallace, D. C., Garrison, K. & Knowler, W. C. (1985). Dramatic founder effects in Amerindian mitochondrial DNAs. *American Journal of Physical Anthropology*, 68(2), 149-155.
- Wang, S., Lewis, C. M. Jr., Jakobsson, M., Ramachandran, S., Ray, N., et al. (2007). Genetic Variation and Population Structure in Native Americans. *PLOS Genetics*, 3(11), e185.
- Waters, M. R. (2019). Late Pleistocene exploration and settlement of the Americas by modern humans. *Science*, 365(6449), eaat5447.
- Wei, Z., Wang, W., Hu, P., Lyon, G. J., & Hakonarson, H. (2011). SNVer: a statistical tool for variant calling in analysis of pooled or individual next-generation sequencing data. *Nucleic Acids Research*, 39(19), e132-e132.
- Weissensteiner, H., Forer, L., Fendt, L., Kheirikhah, A., Salas, A., Kronenberg, F. & Schoenherr, S. (2021). Contamination detection in sequencing studies using the mitochondrial phylogeny. *Genome Research*, 31(2), 309-316.
- Weissensteiner, H., Pacher, D., Kloss-Brandstätter, A., Forer, L., Specht, G., Bandelt, H. J., Kronenberg, F., Salas, A. & Schönherr, S. (2016). HaploGrep 2: mitochondrial haplogroup classification in the era of high-throughput sequencing. *Nucleic Acids Research*, 44(W1), W58-W63.
- Willerslev, E. & Cooper, A. (2005). Ancient DNA. *Proceedings of the Royal Society B*, 272, 3-16.
- 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. (2007). Stable isotopes and DNA evidence for ritual sequence in Inca child sacrifice. *Proceedings of the National Academy of Science*, 104, 16456-16461.
- Yang, D. Y., Eng, B., Wayne, J. S., Dudar, J. C. & Saunders, S. R. (1998). Technical Note: Improved DNA extraction from ancient bones using silica-based spin columns. *American Journal of Physical Anthropology*, 105, 539-543.
- Yang, D. Y. & Watt, K. (2005). Contamination controls when preparing archaeological remains for ancient DNA analysis. *Journal of Archaeological Science*, 32(3), 331-336.
- Yao, Y. G., Bandelt, H. J. & Young, N. S. (2007). External contamination in single cell mtDNA analysis. *PLoS ONE*, 2(8), 3-8.

Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S. & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13, 134.

Zierdt, H., Hummel, S. & Herrmann, B. (1996). Amplification of human short tandem repeats from medieval teeth and bone samples. *Human Biology*, 68(2), 185-199.

9. ANEXO

Tabla anexa 1. Base de datos de secuencias A2. Se indica la localidad, temporalidad, número de secuencias, regiones hipervariables y las referencias bibliográficas correspondientes.

Región geográfica/ Sitio arqueológico	Temporalidad	N	Secuencias	Referencias bibliográficas
Uruguay, Montevideo	Moderno	2	HVR I y II	Acosta, 2021
Bolivia, La Paz	Moderno	10	HVR I	Afonso Costa et al., 2010
Perú, Tampusillo II	474-416 AP	2	HVR I	Baca et al., 2014
Perú, Puca	950-416 AP	6	HVR I	Baca et al., 2014
Perú, Cuenca del Lago Titicaca	Moderno	3	HVR I	Barbieri et al., 2011
Altiplano Peruano-Boliviano	Moderno	6	HVR I	Batai et al., 2014
Argentina, Buenos Aires	Moderno	22	HVR I y II	Bobillo et al., 2010
Argentina, Río Negro	Moderno	5	HVR I y II	Bobillo et al., 2010
Argentina, Misiones	Moderno	7	HVR I y II	Bobillo et al., 2010
Argentina, Corrientes	Moderno	10	HVR I y II	Bobillo et al., 2010
Argentina, Formosa	Moderno	1	HVR I y II	Bobillo et al., 2010
Argentina, Santa Fe	Moderno	1	HVR I y II	Bobillo et al., 2010
Argentina, Chaco	Moderno	1	HVR I y II	Bobillo et al., 2010
Argentina, Formosa	Moderno	1	HVR I	Cabana et al., 2006
Argentina, Chaco	Moderno	1	HVR I	Cabana et al., 2006
Argentina, Jujuy	Moderno	23	HVR I	Cardoso et al., 2013
Argentina, Salta	1.310 AP	2	HVR I	Carnese et al., 2010
Argentina, Córdoba	Moderno	19	HVR I y II	Catelli et al., 2011
Argentina, Santa Fe	Moderno	1	HVR I y II	Catelli et al., 2011
Argentina, Buenos Aires	Moderno	16	HVR I y II	Catelli et al., 2011
Argentina, Buenos Aires	Moderno	1	HVR I	Catelli et al., 2011
Argentina, Córdoba	Moderno	1	HVR I	Catelli et al., 2011
Argentina, Chaco	Moderno	2	HVR I y II	Catelli et al., 2011
Argentina, Corrientes	Moderno	2	HVR I y II	Catelli et al., 2011
Argentina, Tucumán	Moderno	1	HVR I y II	Catelli et al., 2011
Argentina, Chubut	Moderno	1	HVR I y II	Catelli et al., 2011
Argentina, Santiago del Estero	Moderno	1	HVR I y II	Catelli et al., 2011
Bolivia, Beni	Moderno	9	HVR I	Corella et al., 2007
Uruguay	Moderno	8	HVR I y II	Datos sin publicar
Brasil, Riberão Preto	Moderno	1	HVR I y II	de Araujo et al., 2015
Chile, Arica y Parinacota	Moderno	2	HVR I	de Saint Pierre et al., 2012b

Chile, Antofagasta	Moderno	7	HVR I	de Saint Pierre et al., 2012b
Argentina, Río Negro	Moderno	5	HVR I	de Saint Pierre et al., 2012 b
Chile, Temuco	Moderno	5	HVR I	de Saint Pierre et al., 2012b
Chile, Trapa-trapa	Moderno	3	HVR I	de Saint Pierre et al., 2012b
Paraguay, Aché	Moderno	1	HVR I	Fagundes et al., 2008
Brasil, Surui	Moderno	1	HVR I	Fagundes et al., 2008
Brasil, Waiapi	Moderno	1	HVR I	Fagundes et al., 2008
Brasil, Yanomama	Moderno	2	HVR I	Fagundes et al., 2008
Brasil, Kayapo	Moderno	1	HVR I	Fagundes et al., 2008
Brasil, Katuena	Moderno	1	HVR I	Fagundes et al., 2008
Brasil, Waiwai	Moderno	2	HVR I	Fagundes et al., 2008
Brasil, Zoró	Moderno	1	HVR I	Fagundes et al., 2008
Brasil, Poturujara	Moderno	1	HVR I	Fagundes et al., 2008
Brasil, Guarani rio das Cobras	Moderno	1	HVR I	Fagundes et al., 2008
Perú, Cuenca de Río Grande	2.310-1.310 AP	1	HVR I	Fehren-Schmitz et al., 2014
Perú, Cuenca de Río Grande	770-500 AP	4	HVR I	Fehren-Schmitz et al., 2014
Perú, Cuenca de Río Grande	1.310-770 AP	2	HVR I	Fehren-Schmitz et al., 2014
Uruguay, Trinidad	Moderno	1	HVR I y II	Figueiro et al., 2022
Uruguay, Montevideo	Moderno	2	HVR I y II	Figueiro et al., 2022
Uruguay, Tacuarembó	Moderno	4	HVR I y II	Figueiro et al., 2022
Argentina, San Luis, Tilisarao	Moderno	1	HVR I y II	García et al., 2021
Argentina, Santiago del Estero, Sumampa	Moderno	1	HVR I y II	García et al., 2021
Argentina, Córdoba, Córdoba	Moderno	2	HVR I y II	García et al., 2021
Argentina, Córdoba, San Carlos Minas	Moderno	1	HVR I y II	García et al., 2021
Chile, Chiloé	Moderno	2	HVR I	Horai et al., 1993
Perú, Cuenca Ayacucho	850-550 AP	2	HVR I	Kemp et al., 2009
Perú, Cuenca Ayacucho	1.350-1.150 AP	1	HVR I	Kemp et al., 2009
Perú, Yungay	Moderno	1	HVR I	Lewis et al., 2007
Perú, Puno	Moderno	2	HVR I	Lewis et al., 2007
Argentina, Santa Fe, Arroyo Seco 2	7.928-7.591 AP	1	HVR I y II	Llamas et al., 2016
Brasil, Rio Grande do Sul	Moderno	6	HVR I	Marrero et al. 2007a
Brasil, Mato Grosso do Sul,	Moderno	10	HVR I	Marrero et al., 2007b

Paraná y Rio grande do Sul					
Argentina, Jujuy, Quebrada de Humahuaca	n.d.	1	HVR I	Mendisco et al., 2014	
Argentina, Jujuy, Quebrada de Humahuaca	970-483 AP	9	HVR I	Mendisco et al., 2014	
Argentina, Salta, Calchaqui valley	n.d.	1	HVR I	Mendisco et al., 2014	
Argentina, Jujuy, Quebrada de Humahuaca	961-728 AP	1	HVR I	Mendisco et al., 2014	
Argentina, Jujuy, Quebrada de Humahuaca	914-669 AP	1	HVR I	Mendisco et al., 2014	
Chile, Punta Arena	Moderno	1	HVR I	Moraga et al. 2010	
Uruguay	Moderno	2	HVR I y II	Pagano et al., 2005	
Argentina, Misiones	Moderno	5	HVR I	Sala et al., 2010	
Argentina, Río Negro	Moderno	7	HVR I	Sala y Corach, 2014	
Perú, Quechua	Moderno	5	HVR I	Sandoval et al., 2009	
Altiplano Peruano-Boliviano	Moderno	22	HVR I	Sandoval et al., 2013	
Uruguay, Montevideo	Moderno	24	HVR I	Sans et al., 2021	
Uruguay, Norte	Moderno	6	HVR I	Sans et al., 2021	
Uruguay, Sur	Moderno	7	HVR I	Sans et al., 2021	
Argentina, Chaco	Moderno	5	HVR I y II	Sevini et al., 2014	
Argentina, Wichí	Moderno	8	HVR I y II	Sevini et al., 2014	
Bolivia, Beni	Moderno	7	HVR I	Taboada-Echalar et al., 2013	
Bolivia, Santa Cruz	Moderno	5	HVR I	Taboada-Echalar et al., 2013	
Bolivia, Santa Cruz	Moderno	1	HVR I y II	Taboada-Echalar et al., 2013	
Bolivia, Beni	Moderno	1	HVR I y II	Taboada-Echalar et al., 2013	
Bolivia, La Paz	Moderno	3	HVR I	Taboada-Echalar et al., 2013	
Bolivia, Pando	Moderno	3	HVR I	Taboada-Echalar et al., 2013	
Bolivia, Cochabamba	Moderno	4	HVR I	Taboada-Echalar et al., 2013	
Colombia, Ijka	Moderno	10	HVR I y II	Tamm et al., 2007	
Ecuador, Cayapa	Moderno	5	HVR I y II	Tamm et al., 2007	
Colombia, Arsario	Moderno	14	HVR I y II	Tamm et al., 2007	
Argentina, Salta	Moderno	1	HVR I y II	Tamm et al., 2007	
Argentina, Catamarca	Moderno	4	HVR I y II	Tamm et al., 2007	
Colombia, Kogui	Moderno	5	HVR I y II	Tamm et al., 2007	
Argentina, Tucumán	Moderno	2	HVR I y II	Tamm et al., 2007	
Colombia, Vaupes	Moderno	5	HVR I y II	Tamm et al., 2007	
Colombia, Wayuu	Moderno	16	HVR I y II	Tamm et al., 2007	

Argentina, Catamarca	Moderno	2	HVR I	Tamm et al., 2007
Ecuador, Cayapa	Moderno	3	HVR I	Tamm et al., 2007
Argentina, Mocovi	Moderno	2	HVR I	Tamm et al., 2007
Argentina, Salta	Moderno	3	HVR I	Tamm et al., 2007
Argentina, Tucumán	Moderno	1	HVR I	Tamm et al., 2007
Argentina, Mocovi	Moderno	2	HVR I y II	Tamm et al., 2007
Ecuador, Secoya	Moderno	1	HVR I	Tamm et al., 2007
Oeste de Uruguay, Colonia Concordia	1.900 AP	1	HVR I y II	Este trabajo

AP = Años antes del presente; n.d. = no determinado.

Tabla anexa 2. Base de datos de secuencias C1d. Se indica la localidad, temporalidad, número de secuencias, regiones hipervariables y las referencias bibliográficas correspondientes.

Región geográfica/Sitio arqueológico	Temporalidad	N	Secuencias	Referencia bibliográfica
Argentina, Buenos Aires	Moderno	7	HVR I y II	Bobillo et al., 2010
Uruguay	Moderno	2	HVR I y II	Pagano et al., 2005
Bolivia, La Paz	Moderno	1	HVR I	Afonso Costa et al., 2010
Perú, Cuenca del Lago Titicaca	Moderno	1	HVR I	Barbieri et al., 2013
Argentina, Corrientes	Moderno	2	HVR I y II	Bobillo et al., 2010
Argentina, Río Negro	Moderno	2	HVR I y II	Bobillo et al., 2010
Argentina, Formosa	Moderno	1	HVR I	Cabana et al., 2006
Argentina, Jujuy	Moderno	1	HVR I	Cardoso et al., 2013
Argentina, Buenos Aires	Moderno	4	HVR I y II	Catelli et al., 2011
Argentina, Córdoba	Moderno	4	HVR I y II	Catelli et al., 2011
Argentina, Entre Ríos	Moderno	1	HVR I y II	Catelli et al., 2011
Argentina, San Juan	Moderno	1	HVR I y II	Catelli et al., 2011
Argentina, Santiago del Estero	Moderno	1	HVR I y II	Catelli et al., 2011
Bolivia, Beni	Moderno	1	HVR I	Corella et al., 2007
Argentina, Río Negro	Moderno	1	HVR I	de Saint Pierre et al., 2012b
Uruguay, Montevideo	Moderno	3	HVR I y II	Figueiro et al 2022
Uruguay, Tacuarembó	Moderno	2	HVR I y II	Figueiro et al 2022
Argentina, San Luis	Moderno	2	HVR I y II	García et al., 2021
Argentina, Córdoba	Moderno	4	HVR I y II	García et al., 2021
Argentina, Santiago del Estero	Moderno	3	HVR I y II	García et al., 2021
Argentina, Córdoba, Laguna Mar Chiquita, El Diquecito	2.520 AP	1	HVR I y II	García et al., 2021
Perú, Puno	Moderno	2	HVR I	Lewis et al., 2007

Brasil, Paraná y Rio grande do Sul	Moderno	3	HVR I	Marrero et al., 2007b
Chile, Punta Arena	Moderno	1	HVR I	Moraga et al. 2010
Argentina, Misiones	Moderno	1	HVR I	Sala et al., 2010
Argentina, Río Negro	Moderno	4	HVR I	Sala y Corach, 2014
Uruguay, Montevideo	Moderno	4	HVR I	Sans et al., 2021
Uruguay, Sur	Moderno	2	HVR I	Sans et al., 2021
Uruguay, Montevideo	Moderno	1	HVR I y II	Sans et al., 2021
Uruguay, Sur	Moderno	1	HVR I y II	Sans et al., 2021
Bolivia, Beni	Moderno	2	HVR I	Taboada-Echalar et al., 2013
Bolivia, Cochabamba	Moderno	1	HVR I	Taboada-Echalar et al., 2013
Colombia, Coreguaje	Moderno	9	HVR I y II	Tamm et al., 2007
Ecuador, Secoya	Moderno	1	HVR I y II	Tamm et al., 2007
Colombia, Vaupes	Moderno	2	HVR I y II	Tamm et al., 2007
Colombia, Coreguaje	Moderno	2	HVR I y II	Tamm et al., 2007
Ecuador, Cofan	Moderno	1	HVR I y II	Tamm et al., 2007
Argentina, Catamarca	Moderno	2	HVR I y II	Tamm et al., 2007
Argentina, Tucumán	Moderno	1	HVR I y II	Tamm et al., 2007
Ecuador, Cofan	Moderno	1	HVR I	Tamm et al., 2007
Uruguay, Montevideo	Moderno	1	HVR I y II	Acosta, 2021
Uruguay	Moderno	1	HVR I y II	Datos sin publicar
Argentina, Buenos Aires	Moderno	1	HVR I y II	Perego et al., 2010
Brasil, Rio Grande do Sul	Moderno	1	HVR I y II	Perego et al., 2010
Uruguay	Moderno	1	HVR I y II	Perego et al., 2010
Perú, Piura	Moderno	1	HVR I y II	Perego et al., 2010
Uruguay, Trinidad	Moderno	1	HVR I y II	Figueiro et al 2011, Sans et al., 2012
Brasil, Centro-Sur	Moderno	1	HVR I y II	Wang et al 2007; Reix et al., 2014
Uruguay, Norte	Moderno	1	HVR I y II	Sans et al., 2015
Oeste de Uruguay, Colonia Concordia	1.900 AP	1	HVR I y II	Este trabajo

AP = Años antes del presente.

Tabla anexa 3. Base de datos de secuencias C1b. Se indica la localidad, temporalidad, número de secuencias, región genómica y las referencias bibliográficas correspondientes.

Región geográfica/Sitio arqueológico	Temporalidad	N	Secuencias	Referencia bibliográfica
Argentina, Córdoba, Valle Hermoso, Ayampitín	577 AP	1	Mitogenoma completo	Garcia et al. 2021
Argentina, Córdoba	Moderno	9	Mitogenoma completo	Garcia et al. 2021
Argentina, Córdoba, Ischilin	431 AP	1	Mitogenoma completo	Garcia et al. 2021
Argentina, Córdoba, La Granja	1.200 AP	1	Mitogenoma completo	Garcia et al. 2021
Argentina, Córdoba, Laguna Mar Chiquita, Estancia La Elisa	4.500 AP	1	Mitogenoma completo	Garcia et al. 2021
Argentina, Córdoba, Potrerillo de Larreta	900 AP	1	Mitogenoma completo	Garcia et al. 2021
Argentina, Salta	Moderno	1	Mitogenoma completo	de Saint Pierre et al 2012a
Argentina, San Luis	Moderno	2	Mitogenoma completo	Garcia et al. 2021
Brasil, Yanomama	Moderno	3	Mitogenoma completo	Fagundes et al 2008
Chile	Moderno	2	Mitogenoma completo	De Saint Pierre et al 2012a
Chile, Aconcagua	Moderno	2	Mitogenoma completo	De Saint Pierre et al 2012a
Chile, Chiloé	Moderno	4	Mitogenoma completo	De Saint Pierre et al 2012a
Colombia, Guainia	Moderno	5	Mitogenoma completo	Arias et al 2017
Paraguay, Alto Paraná	Moderno	1	Mitogenoma completo	Simão et al. 2019
Perú	Moderno	2	Mitogenoma completo	Tito et al, sin publicar
Perú, Chachapoyas	Moderno	1	Mitogenoma completo	Guevara et al. 2020
Perú, Jívaro	Moderno	5	Mitogenoma completo	Guevara et al. 2020
Perú, Utcubamba	Moderno	1	Mitogenoma completo	Barbieri et al 2017
Perú, Waiku	Moderno	1	Mitogenoma completo	Barbieri et al 2017
Uruguay, Montevideo	Moderno	3	Mitogenoma completo	Figueiro et al 2022
Uruguay, Rocha	600 AP	2	Mitogenoma completo	Figueiro et al 2017

Uruguay, Tacuarembó	Moderno	4	Mitogenoma completo	Figueiro et al 2022
Oeste de Uruguay, Campo Morgan	1.900 AP	1	Mitogenoma completo	Datos sin publicar
Oeste de Uruguay, Colonia Concordia	1.900 AP	1	Mitogenoma completo	Datos sin publicar

AP = Años antes del presente.