

**PROGRAMA DE DESARROLLO DE LAS CIENCIAS BÁSICAS (PEDECIBA)**

**ÁREA BIOLOGÍA – SUBÁREA GENÉTICA**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**MAG. GONZALO FIGUEIRO**

**ESTUDIO DE LA VARIACIÓN TEMPORAL Y ESPACIAL  
EN EL ADN MITOCONDRIAL  
DE LAS POBLACIONES PREHISTÓRICAS  
DE LA REGIÓN PAMPEANA**

**ORIENTADORA:**

**DRA. MÓNICA SANS**

DEPARTAMENTO DE ANTROPOLOGÍA BIOLÓGICA, FHCE – UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

**CO-ORIENTADOR:**

**DR. DENNIS H. O’ROURKE**

DEPARTMENT OF ANTHROPOLOGY, UNIVERSITY OF UTAH

**TRIBUNAL:**

**DR. BERNARDO BERTONI**

**DRA. GRACIELA GARCÍA**

**DRA. SUSANA GONZÁLEZ**

**MONTEVIDEO, 2013**

## ÍNDICE

Resumen.....	9
Abstract .....	11
Agradecimientos.....	13
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>15</b>
<b>1.1. Breve retrospectiva histórica.....</b>	<b>15</b>
1.1.1. Sobre el origen y antigüedad del hombre americano.....	15
1.1.2. La genética y la variabilidad del hombre americano.....	17
<b>1.2. El ADN mitocondrial en el estudio de las poblaciones americanas .....</b>	<b>19</b>
1.2.1. Características del ADN mitocondrial.....	19
1.2.2. El ADN mitocondrial y el poblamiento de América.....	21
<b>1.3. ADN antiguo: aspectos técnicos e históricos.....</b>	<b>28</b>
1.3.1. Factores asociados a la conservación del ADN .....	28
1.3.2. Hitos, avances y retrocesos en la investigación con ADN antiguo .....	30
<b>1.4. La región pampeana: definición y síntesis arqueológica.....</b>	<b>34</b>
1.4.1. Pleistoceno final / Holoceno temprano (hasta 6500 a.A.P.) .....	35
1.4.2. Holoceno medio (6500-3500 a.A.P.) .....	37
1.4.3. Holoceno tardío (3500-500 a.A.P.).....	38
1.4.4. El registro esquelético de la región pampeana.....	40
1.4.4.1. Uruguay .....	41
1.4.4.2. Argentina .....	42
1.4.4.3. Brasil .....	42
<b>1.5. Análisis genéticos de poblaciones prehistóricas de la región pampeana.....</b>	<b>43</b>
<b>2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....</b>	<b>46</b>
<b>2.1. Objetivos .....</b>	<b>46</b>
2.1.1. Objetivo general.....	46
2.1.2. Objetivos específicos .....	46
<b>2.2. Hipótesis.....</b>	<b>47</b>

<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>49</b>
<b>3.1. Muestra</b> .....	<b>49</b>
3.1.1. Individuos prehistóricos analizados .....	49
3.1.2. Elección de las piezas .....	52
3.1.3. Características arqueológicas de las muestras analizadas .....	52
3.1.3.1. Uruguay .....	53
3.1.3.1.1. Sitios muestreados de la región Oeste .....	53
3.1.3.1.2. Sitios muestreados de la región Este.....	54
3.1.3.2. Argentina .....	57
3.1.3.3. Brasil .....	58
3.1.4. Muestra comparativa .....	59
3.1.4.1. Uruguay .....	59
3.1.4.1.1. Frecuencias de haplogrupos americanos de Uruguay.....	59
3.1.4.1.2. Secuencias de la región hipervariable I de Uruguay.....	60
3.1.4.2. América del Sur.....	61
3.1.4.2.1. Frecuencias de haplogrupos indígenas en el Cono Sur .....	61
3.1.4.2.2. Secuencias de la región hipervariable I de Argentina y Brasil .....	64
<b>3.2 Métodos</b> .....	<b>65</b>
3.2.1. Infraestructura y procedimientos estándar al trabajar con ADN antiguo.....	65
3.2.2. Extracción de ADN.....	66
3.2.2.1. Protocolos utilizados en el presente trabajo.....	66
3.2.2.2. Control de éxito de las extracciones .....	70
3.2.3. Análisis del ADN.....	71
3.2.3.1. Procedimiento general de PCR.....	71
3.2.3.2. PCR-RFLP y análisis de secuencias .....	73
3.2.4. Análisis de los datos .....	76
3.2.4.1. Análisis de las frecuencias de haplogrupos .....	76
3.2.4.1.1. Análisis de distancias .....	77
3.2.4.1.1.1. Escalamiento multidimensional no métrico .....	78
3.2.4.1.1.2. Coeficientes de correlación y test de Mantel .....	80
3.2.4.2. Análisis de secuencias de la región hipervariable I .....	80
3.2.4.2.1. Relación filogenética y ascendencia común .....	80
3.2.4.2.2. Distribución geográfica de linajes emparentados .....	82

<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>84</b>
<b>4.1. Extracción del ADN.....</b>	<b>84</b>
4.1.1. Contaminación de los extractos .....	87
4.1.1.1. Contaminación de los blancos de extracción .....	87
4.1.1.2. Contaminación de las muestras .....	88
4.1.2. Influencia del tejido de partida en el éxito de la extracción .....	89
4.1.3. Influencia del protocolo en el éxito de la extracción .....	89
4.1.4. Éxito de las extracciones en comparación con otros trabajos .....	90
4.1.5. Muestras excluidas del presente análisis .....	91
4.1.5.1. Muestras altamente degradadas .....	91
4.1.5.2. Muestras descartadas por otros motivos.....	92
<b>4.2. Análisis del ADN.....</b>	<b>94</b>
4.2.1. Análisis por PCR-RFLP .....	94
4.2.2. Secuencias de la HVRI.....	95
<b>4.3. Análisis de los datos .....</b>	<b>100</b>
4.3.1. Análisis de las frecuencias de haplogrupos .....	100
4.3.1.1. Perfiles de haplogrupos por región .....	100
4.3.1.2. Diversidad de haplogrupos de la muestra y su contexto del Cono Sur.....	103
4.3.1.3. Análisis de distancias .....	104
4.3.1.3.1. Comparación de las distancias empleadas .....	104
4.3.1.3.2. Escalamiento multidimensional de las distancias .....	105
4.3.1.3.2.1. Distancias $D_R$ .....	105
4.3.1.3.2.2. Distancias $D_A$ .....	107
4.3.1.3.2.3. Vinculaciones interpoblacionales observadas.....	107
4.3.1.3.3. Relación entre distancias genéticas y distancias geográficas.....	109
4.3.1.3.4. Variación latitudinal en las frecuencias de haplogrupos.....	109
4.3.2. Análisis de secuencias .....	111
4.3.2.1. Características de la muestra de secuencias antiguas .....	111
4.3.2.2. <i>Median-Joining networks</i> y contexto de las secuencias prehistóricas.....	112
4.3.2.2.1. Haplogrupo A2.....	112
4.3.2.2.2. Haplogrupo B2 .....	113
4.3.2.2.3. Haplogrupo C1 .....	113
4.3.2.2.4. Haplogrupo D1.....	114

4.3.2.3. Distribución geográfica de los linajes emparentados con las secuencias antiguas recuperadas .....	120
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>123</b>
<b>5.1. Extracción y análisis del ADN .....</b>	<b>123</b>
5.1.1. Éxito general de la extracción .....	123
5.1.2. Contaminación de los extractos .....	125
<b>5.2. Análisis de los datos .....</b>	<b>127</b>
5.2.1. Análisis de las frecuencias de haplogrupos .....	127
5.2.1.2. Análisis de distancias .....	133
5.2.2. Análisis de secuencias .....	137
5.2.2.1. Aspectos técnicos de las secuencias obtenidas .....	137
5.2.2.2. Distribución geográfica y cronológica de los linajes identificados .....	139
5.2.2.2.1. A2+16295T .....	139
5.2.2.2.2. C1+16311C .....	140
5.2.2.2.3. C1+16092C .....	141
5.2.2.2.4. C1d+16259T .....	142
5.2.2.2.5. D1+@16325 .....	143
5.2.2.2.6. C1d+16288C .....	145
5.2.3. Implicancias para un panorama diacrónico de la región pampeana .....	147
<b>6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS .....</b>	<b>151</b>
<b>6.1. Conclusiones.....</b>	<b>151</b>
<b>6.2. Perspectivas.....</b>	<b>154</b>
6.2.1. Sobre los análisis de ADN antiguo en muestras de la región pampeana .....	154
6.2.2. Sobre los análisis de ADN antiguo en el Uruguay.....	155
<b>7. REFERENCIAS CITADAS .....</b>	<b>157</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>176</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

1.1: Marcadores clásicos en poblaciones indígenas de América .....	18
1.2: Polimorfismos que definen a los haplogrupos y subhaplogrupos de ADNmt presentes en poblaciones americanas.....	25
1.3: Factores favorables para la preservación de ADN antiguo en materiales arqueológicos .....	30
1.4. Criterios para garantizar la autenticidad del ADN antiguo .....	32
3.1: Listado de los sitios muestreados .....	49
3.2: Detalle de las muestras analizadas, agrupadas por región y período.....	50
3.3: Frecuencias de haplogrupos indígenas en poblaciones modernas del Uruguay .....	60
3.4: Poblaciones antiguas empleadas en el análisis comparativo de la muestra de ADN antiguo .....	61
3.5: Poblaciones modernas empleadas en el análisis comparativo de la muestra de ADN antiguo .....	63
3.6: Cebadores empleados en el análisis de PCR-RFLP .....	74
3.7: Cebadores estándar empleados para la amplificación de la HVRI en los extractos realizados en Montevideo.....	74
3.8: Segundo juego de cebadores empleado para la amplificación de la HVRI en los extractos realizados en Montevideo.....	75
3.9: Cebadores estándar empleados para la amplificación de la HVRI en los extractos realizados en Salt Lake City .....	75
4.1.a. Resultados de los extractos de ADN realizados en Montevideo.....	84
4.1.b. Resultados de los extractos de ADN realizados en Salt Lake City.....	86
4.1.c. Resultados del análisis de los extractos de ADN de muestras del Este del Uruguay realizados por Bernardo Bertoni.....	86
4.2: Mutaciones halladas en tres blancos de extracción .....	88
4.3: Tasa de éxito del presente trabajo en comparación con diversos trabajos en muestras de América .....	91
4.4: resultados de los PCR-RFLP de los extractos de ADN analizados en Uruguay .....	95
4.5: Segmentos y motivos de secuencia válidos obtenidos en Montevideo .....	96
4.6: Segmentos y motivos de secuencia válidos obtenidos en Salt Lake City.....	97
4.7: Determinaciones de haplogrupo por PCR-RFLP y secuencia de la HVRI.....	99

4.8: Conteos de haplogrupos por período y región .....	100
4.9: Diversidad de haplogrupos $h$ de las poblaciones analizadas .....	103
4.10: Correlaciones $r_s$ entre haplogrupos y ejes del MDS sobre distancias $D_R$ .....	106
4.11: Correlaciones $r_s$ entre haplogrupos y ejes del MDS sobre distancias $D_A$ .....	107
4.12: Estadísticos $U$ entre los linajes C1+16092, C1d+16295 y D1+@16325 .....	122

## ÍNDICE DE FIGURAS

1.1: Esquema del genoma mitocondrial humano .....	20
1.2: Sitios de daño al ADN .....	28
1.3: Mapa de la región pampeana y áreas fitogeográficas vecinas .....	35
3.1: Localización de los restos humanos prehistóricos analizados en este trabajo.....	52
3.2: Localización geográfica de las poblaciones empleadas en el análisis comparativo.....	62
3.3: Ejemplo de <i>median-joining network</i> .....	82
4.1: Ejemplo de secuencia obtenida de los extractos de Montevideo .....	96
4.2: Frecuencias de los haplogrupos A, B, C y D en la totalidad de la muestra analizada .....	101
4.3: Frecuencias de haplogrupos de todas las muestras incluidas en este trabajo .....	102
4.4: Frecuencias de los haplogrupos A, B, C y D en las muestras antigua y moderna del Uruguay.....	102
4.5: Relación entre las distancias $D_R$ y $D_A$ .....	105
4.6: Gráfico los primeros dos ejes del MDS de la matriz de distancias $D_R$ .....	106
4.7: Gráfico de los primeros dos ejes del MDS de la matriz de distancias $D_A$ .....	108
4.8: Relación entre las distancias geográficas y genéticas.....	110
4.9: Correlación entre latitud y frecuencia de los cuatro haplogrupos fundadores.....	111
4.10: <i>Median-joining network</i> de las secuencias compiladas del haplogrupo A2 .....	116
4.11: <i>Median-joining network</i> de las secuencias compiladas del haplogrupo B2 .....	117
4.12: <i>Median-joining network</i> de las secuencias compiladas del haplogrupo C1 .....	118
4.13: <i>Median-joining network</i> de las secuencias compiladas del haplogrupo D1 .....	119
4.14: Distribución geográfica de los linajes descriptos .....	120
4.15: Gráfico de densidad de las distancias interpoblacionales .....	121
5.1: Localización geográfica de los linajes compartidos y sus orígenes.....	142

## RESUMEN

La región pampeana ha estado poblada por grupos humanos durante por lo menos 12.000 años, planteándose varios modelos e hipótesis acerca de su poblamiento y los eventuales vínculos interpoblacionales ocurridos desde el Pleistoceno final hasta la llegada del europeo. En particular, se plantea la intensificación en el correr del Holoceno tardío final de una serie de contactos interregionales, visualizados a través de diversas evidencias arqueológicas. Dado que el análisis de ADN antiguo ha aportado evidencia crucial en la puesta a prueba de hipótesis de vínculos y continuidades poblacionales en otras regiones de América (como el sudoeste de EE.UU. y los Andes centrales), se plantea la posibilidad de emplearlo en la región pampeana a fin de analizar la profundidad temporal de algunas de las dinámicas poblacionales propuestas. Este trabajo se propone como objetivo analizar la variación espacial y temporal de la poblaciones humanas de la región pampeana durante el Holoceno, mediante el uso del ADN mitocondrial.

Se efectuó la extracción y análisis de ADN mitocondrial de los restos prehistóricos de un total de 85 individuos: veinticuatro datan del Holoceno temprano y medio de la región pampeana argentina (7800-6300 años antes del presente), en tanto que 61 datan del Holoceno tardío (2300-250 años antes del presente) provenientes de la región pampeana argentina (n=9), Uruguay (n=36) y el sur del Brasil (n=14). La extracción se realizó sobre hueso o diente, siguiendo protocolos estándar de prevención de la contaminación con ADN moderno. Los extractos fueron analizados por PCR-RFLP para determinar su pertenencia a un haplogrupo fundador americano, procurando asimismo amplificar y secuenciar la región hipervariable I (HVRI). Las frecuencias de haplogrupos obtenidas para cada muestra fueron comparadas con las de otras poblaciones, antiguas y modernas, del Cono Sur, y las afinidades filogenéticas y geográficas de las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante la construcción de *median-joining networks* incluyendo las secuencias antiguas y la totalidad de las secuencias indígenas disponibles de Uruguay (n=252), además de muestras representativas de secuencias indígenas de Argentina (n=386) y el sur de Brasil (n= 359). El análisis de afinidades por *networks* fue complementada con una búsqueda de secuencias similares en la literatura y en bases de datos *on line*.

Se logró determinar exitosamente el haplogrupo mediante PCR-RFLP en 31 casos, y obtener secuencias de la HVRI en 14 casos, totalizando una tasa de éxito de 53%. Los casos no exitosos se debieron ya sea al fracaso en la extracción de ADN o a la contaminación del extracto con ADN moderno proveniente del investigador u otros individuos que hubieran manipulado previamente las piezas, o de otras muestras antiguas. Los resultados obtenidos a nivel de frecuencias de haplogrupos fundadores y secuencias de HVRI llevan a las siguientes inferencias sobre la dinámica, temporal y espacial, de las poblaciones humanas de la región pampeana durante el Holoceno: a) La presencia de los haplogrupos B, C y D en la muestra del Holoceno temprano es coherente con otros resultados obtenidos en muestras prehistóricas del Cono Sur, indicando una posible pérdida de haplogrupos por efecto fundador a medida que las poblaciones avanzaban hacia el sur. Por ende, se sugiere que la presencia del haplogrupo A en muestras modernas se debe a su arribo desde latitudes menores luego del poblamiento inicial; b) a lo largo del Holoceno medio, las distintas poblaciones analizadas evolucionaron de diferente forma, resultando en diferentes estructuras genéticas: si bien todas experimentaron algún grado de flujo génico, el Este de Uruguay habría pasado por un período de relativo aislamiento, en tanto que el Oeste de Uruguay y la región pampeana argentina habrían experimentado flujo génico extensivo con el Chaco. Esto es especialmente notable en el caso de la muestra del Holoceno tardío de la región pampeana argentina, de una antigüedad de 2300 años, que presenta linajes presentes actualmente en el Chaco, a 1400km de distancia, y ningún linaje compartido con la Patagonia, región inmediatamente adyacente hacia el sur del sitio muestreado. Por último, se destaca la continuidad en el acervo materno indígena del actual territorio de Uruguay, evidenciado por una fuerte similitud entre las frecuencias de haplogrupos antiguas y actuales y la presencia en la población actual de un linaje de una antigüedad mínima de 1600 años. Tanto los contactos interregionales de larga distancia sugeridos por los datos observados en Argentina como la continuidad observada en el Uruguay constituyen perspectivas fértiles para análisis futuros.

## ABSTRACT

The Pampas region of South America has been inhabited by human groups for at least 12,000 years, and several models and hypotheses have been proposed about the peopling of the region and the population dynamics that occurred from the Late Pleistocene until the European arrival. In particular, various archaeological lines of evidence suggest the intensification of inter-regional contacts during the final stages of the Late Holocene. Considering that ancient DNA has contributed with crucial evidence for the testing of population relationships and continuities in other regions of America (e.g. Southwestern United States and the Central Andes), it is proposed that it could be useful for testing the chronological depth of some of the population dynamics proposed for the Pampas region. The aim of this work is to analyze the spatial and chronological variation of the human populations of the Pampas through mitochondrial DNA.

Mitochondrial DNA was extracted and analyzed from a total 85 individuals: twenty-four of them are Early to Middle Holocene specimens from the Argentine Pampas (7800-6300 years before present), and the other 61 are Late Holocene individuals (2300-250 years before present) from the Argentine Pampas (n=9), Uruguay (n=36) and Southern Brazil (n=14). Teeth and bones were used for the extractions, and standard contamination prevention protocols were followed. The extracts were analyzed by means of PCR-RFLP in order to determine if they belonged to a Native American founding haplogroup; the amplification and sequencing of hypervariable region I (HVRI) was also attempted. The haplogroup frequencies for each of the population samples were compared with those of ancient and modern populations from Southern South America; the phylogenetic and geographic affinities of the successful ancient mitochondrial DNA sequences were analyzed through the construction of median-joining networks including the ancient sequences in the context of the entire set of Native American sequences available from Uruguay (n=252), and two sets of Native American sequences from the modern populations of Argentina (n=386) and Southern Brazil (n= 359). The networks were complemented with a search for sequences similar to the ancient sample in the literature and internet-based databases.

In 31 cases, a Native American haplogroup could successfully be determined by PCR-RFLP, and in another 14 individuals, Native American HVRI sequences were obtained: The overall success rate was 53%. The unsuccessful cases were due to failure to extract DNA, or due to contamination with modern DNA from the researcher or people who had previously manipulated the material, or from cross-contamination with other ancient samples. The results from both haplogroup frequencies and HVRI sequences lead to the following inferences about the dynamics, in space and time, of the human populations of the Pampas region during the Holocene: a) The presence of haplogroups B, C, and D in the Early Holocene sample is coherent with other results on early samples from Southern South America, suggesting the possibility of the loss of haplogroups through founder effect as the peopling advanced further south. Therefore, it is suggested that the presence of haplogroup A in modern samples of the region is due to its arrival from locations further north after the initial peopling; b) through the Middle Holocene, the analyzed populations evolved in different directions, with different genetic structures as a result: even though all experienced some degree of gene flow, Eastern Uruguay might have gone through a period of isolation. Meanwhile, Western Uruguay and Argentina experienced an extensive gene flow with the Chaco region. This is especially noteworthy in the case of the Late Holocene sample from the Argentine Pampas region, dated at 2300 years, which shows mtDNA lineages found in present-day Chaco, located 1400km away, and lacks lineages from Patagonia, immediately adjacent south of the sampled site. Finally, it is important to mention the detected continuity in the Native American maternal component of present-day Uruguay, supported by the strong similarity between ancient and modern haplogroup frequencies, and the presence in the modern population of a lineage with a minimum age of 1600 years. Both the long distance contacts suggested by the Argentine data and the continuity found in Uruguay are potentially fruitful perspectives for future analyses.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo dependió en forma crucial de la generosa donación de muestras por múltiples investigadores, responsables de varios sitios y colecciones: Roberto Bracco, Leonel Cabrera Pérez, Andrea Castillo, María Elida Farías, Andrés Gascue, Alberto Marcellino, Gustavo Politis, Pedro Ignacio Schmitz y Arturo Toscano. Se agradece profundamente la colaboración en la colecta de muestras de Carina Erchini, Sara Campos, Federica Moreno y Mónica Portas.

En el laboratorio, Carolina Abud, Elizabeth Ackermann, Ana Lia Ciganda y Patricia Mut contribuyeron con incontables horas de trabajo y *feedback* sin los cuales seguramente hubiera decidido dedicarme a actividades menos frustrantes. Bernardo Bertoni, Mónica Cappetta y Pedro C. Hidalgo contribuyeron con numerosos consejos y *know-how*. Agradezco asimismo a los investigadores de la Universidad de Utah (Salt Lake City, EE.UU.), Jennifer Raff y Justin Tackney, por otras incontables horas de laboratorio y asesoría técnica. Corresponde además agradecer a Gimena Dorado por proporcionar una compilación de secuencias americanas que me facilitó enormemente la tarea comparativa, y a Claudio Bravi (IMBICE, La Plata) por su asesoría en materia de secuencias. Al momento de empezar a interpretar los datos surgidos de este trabajo de Tesis, Isabel Barreto proporcionó un oído interesado, puntos de vista y bibliografía etnohistórica imprescindible.

Debo mi más profundo agradecimiento a mi orientadora y mi co-orientador de Tesis, Mónica Sans (Facultad de Humanidades) y Dennis H. O'Rourke (Universidad de Utah). El *insight* y la experiencia del Dr. O'Rourke, y su dosis de hospitalidad personal y académica, fueron factores críticos para que recuperara la confianza en el ADN antiguo y en mí mismo. Por su parte, la Dra. Sans ha sido mi guía en el mundo académico por casi tres lustros. A ella corresponde el mérito de haber leído y releído varios trabajos de mi autoría, puliéndolos, corrigiéndolos y bajándolos a tierra hasta el hartazgo. Por ello, si este trabajo contiene errores, omisiones o inexactitudes, naturalmente soy el único responsable.

A lo largo de estos años estuvo presente un número importante de gente que brindó diversos tipos de apoyo para hacer mi esfuerzo académico más llevadero. Mi madre, Cristina Lastreto, siempre estimuló mi carrera científica, sabiendo que la pasión es tan importante como una adecuada compensación económica. En el búnker de la calle Paysandú, gente como Alfonso Machado y Moira Sotelo asomaron en múltiples ocasiones la cabeza en el cubículo saturado de *Heavy Metal* para ver de qué iba la vida y el trabajo del bicho raro que se vestía de astronauta y manipulaba tubos. Durante los primeros dos años como doctorando, mis ahora excamaradas de armas Lucía Calleros, Mariana Cosse y María José Ferreiro me perdonaron horas de ausencia del trabajo docente, y el vínculo construido en esos años persiste. Pablo Alí y el resto del club de cine Z estuvieron presentes desde siempre y en forma incondicional. La lista puede extenderse, y hay mil personas más que saben quiénes son y que perdonarán mi omisión.

Por último, en plena redacción de esta Tesis, entre horas en vela frente a la pantalla con párrafos a medio terminar y análisis de último momento, apareció Cecilia, cuya presencia hizo que todo esto valiera mucho más la pena. Mil gracias por ser.

Esta Tesis fue parcialmente financiada por la Comisión Académica de Posgrado (CAP – UdelaR), la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC – UdelaR) y el Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA).

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. BREVE RETROSPECTIVA HISTÓRICA

### 1.1.1. SOBRE EL ORIGEN Y ANTIGÜEDAD DEL HOMBRE AMERICANO

Con la lenta aceptación de la teoría de Darwin en el seno de la antropología, la interpretación de la variabilidad del hombre americano se dividió entre hereditaristas y ambientalistas. Los primeros negaban el peso de las fuerzas evolutivas en el hombre, por lo que cualquier variación “racial” hallada en América debía ser de larga data. Entre los representantes de esta vertiente estaban aquellos que, dentro del marco teórico del difusionismo histórico-cultural, afirmaban la inmigración de tipos humanos diversos, cada uno de los cuales representaría una de las “razas” o “variedades” existentes al momento de la conquista, y que no habrían sufrido modificaciones en América. Desde esta perspectiva, la variabilidad encontrada en el Nuevo Mundo es inseparable de las circunstancias que condujeron al poblamiento del continente: cada tipo humano habría ingresado al continente proveniente de una región con características físicas y culturales semejantes a las encontradas en América (véase revisión en Comas 1974; Pucciarelli 2004). Estas teorías se basan fundamentalmente en datos morfológicos, utilizando un criterio tipológico según el cual todas las poblaciones se pueden clasificar según su ajuste a “tipos” asimilables en muchos casos a “razas”. Este criterio fue cayendo en desuso en el marco de los estudios morfológicos, y los análisis se fueron orientando a una perspectiva métrica de carácter multivariado (*e.g.* Powell y Neves 1999; Cocilovo et al. 2004; González-José et al. 2005; Pérez et al. 2007; Hubbe et al. 2011, entre otros) A pesar de su grado de plasticidad frente a factores ambientales, los análisis comparativos a nivel morfológico son actualmente considerados útiles en la reconstrucción de historias evolutivas, incluso a nivel intraespecífico (von Cramon-Taubadel 2009; véase no obstante Collard y Wood 2000), si bien se ha constatado el efecto de la selección natural en esta variabilidad, sobre todo relacionada con factores climáticos (Roseman 2004; Pérez y Monteiro 2009).

Por su parte, los ambientalistas atribuían la variación observable a la influencia del ambiente, enfatizando por lo tanto, aún cuando en forma al principio muy vaga, fuerzas evolutivas. Uno de los representantes tempranos de esta vertiente fue Aleš Hrdlička, quien en 1912 acuñó el término *American homotype*, defendiendo enfáticamente la tesis de la esencial uniformidad “racial” (y por lo tanto, de origen) del hombre americano. Los nativos americanos representarían de acuerdo a esta posición una rama poblacional única, derivada de las razas de Asia y Polinesia, y su llegada a las Américas habría ocurrido por el noroeste durante el Holoceno, después de que el hombre hubiese alcanzado un alto grado de evolución y diferenciación racial (Hrdlička 1912).

Con respecto al lugar de origen del hombre americano, la *História Natural y Moral de las Indias*, escrita por el sacerdote jesuita José de Acosta, fue la primera obra en plantear el ingreso de los primeros pobladores del continente a través del extremo noroccidental del mismo. Sin descartar la posibilidad de una llegada por mar, propone como más probable un poblamiento por tierra, y especula que la tendencia en dirección noroeste de la costa occidental de América podría implicar una conexión de la misma con Asia (Beals 1957). Esta hipótesis fue repetida en forma independiente por I. Pfefferkorn en 1794, poco tiempo después de que el tercer viaje de James Cook navegara el estrecho de Bering (Wilmsen 1965).

En los análisis antropológicos del siglo XX, el ingreso de todas o parte de las poblaciones por el noroeste a través de un puente de tierra en la zona del estrecho de Bering durante el último máximo glacial tiene peso de dogma. Puede rastrearse su origen al trabajo de Gidley (1912) que establece, sobre la base de evidencia paleontológica, que un puente de tierra debió unir Alaska y Siberia a principios del Pleistoceno y, muy probablemente, también durante el último máximo glacial. Sin embargo, hasta mediados de ese siglo, la posibilidad del origen pleistocénico del hombre americano estaba relativamente silenciada por el peso académico de Hrdlička. Su fuerte argumentativo se encontraba en un conocimiento profundo de la variabilidad morfológica del esqueleto (y en particular del cráneo) del hombre moderno americano. Se basó en este conocimiento para refutar argumentos de “hombres primitivos” en América, ya sea usando a su favor el contexto geológico, como en el caso de la refutación de los argumentos de Florentino Ameghino

(Hrdlička et al. 1912), ya sea empleando el dato morfológico en exclusiva. Fue necesaria la acumulación sistemática de información que asociaba artefactos de manufactura humana con fauna del Pleistoceno para que el umbral de edades del ingreso del hombre en América aumentara. Estos hallazgos comenzaron con el descubrimiento del sitio Folsom en 1927 y continuaron en forma sostenida desde entonces (Roberts 1937). La aplicación en 1951 de la recientemente inventada técnica de datación radiocarbónica en Folsom no tuvo éxito; años después se obtuvieron dataciones en el rango de 10.260 a 10.890 años radiocarbónicos antes del presente (a.A.P.) (Meltzer 2006). Posteriormente, se obtuvieron dataciones radiocarbónicas más antiguas, en el orden de 11.500-10.900 a.A.P. en sitios con artefactos del denominado "complejo Clovis". (Waters y Stafford 2007). Estos fechados fueron, en su momento, relacionados directamente con la fecha de ingreso definitiva del ser humano en América del Norte (Meltzer 2006).

### 1.1.2. LA GENÉTICA Y LA VARIABILIDAD DEL HOMBRE AMERICANO

En las primeras síntesis de datos a nivel genético de los nativos americanos, el concepto del American homotype de Hrdlička parecía estar justificado: los trabajos hechos sobre grupos sanguíneos (Boyd 1951) y sobre algunos caracteres fenotípicos de herencia aparentemente monogénica (Spuhler 1951) llegaban a dos conclusiones generales. En primer lugar, la homogeneidad de las poblaciones indígenas muestreadas, con un virtual monomorfismo de los grupos sanguíneos O, M y Rh+; en segundo lugar, una semejanza a nivel de frecuencias génicas y presencia/ausencia de algunos polimorfismos sanguíneos compartidos con poblaciones de Asia Oriental y Polinesia (Stewart 1960). Efectivamente, aparte de una serie de caracteres fenotípicos visibles (como el cabello oscuro, la relativa falta de vello facial y corporal, arcos cigomáticos anchos, pliegue epicántico y alta frecuencia de rasgos dentarios como incisivos en forma de pala y primeros molares inferiores con tres raíces – Crawford 1998), a nivel de polimorfismos proteicos, las poblaciones nativas americanas tienen características marcadas que, en muchos casos, las asemejan a poblaciones asiáticas y, en particular, de Siberia (Tabla 1.1).

Tabla 1.1: Marcadores clásicos con frecuencias distintivas en poblaciones indígenas de América (O'Rourke 2006).

Alta frecuencia / Presentes	Baja frecuencia / Ausentes
ABO*O	ABO*A2, ABO*B
MN*M	RH*R0
RH*R1	LU*A
FY*A	KEL*K
DI*A	HLAA*1, HLAA*3, HLAA*11
HLAA*2, HLAA*9	HLB*29, HLB*18
HLAB*35, HLAB*27	GM*F B, GM*A,F B
GM*A G, GM*A T	BF*F
GC*CHIP, GC*IGL	Hemoglobinas anormales en general
ALB*Naskapi, ALB*Mexico	
TF*DCHI, TF*B0-1	
BCHE1*U, CHE2*50-	

A medida en que se fueron refinando las técnicas analíticas en procura de la detección de polimorfismos proteicos – y en especial a partir de los trabajos seminales de Harris (1966) y Hubby y Lewontin (1966) – se fue detectando variación entre poblaciones en el continente americano. Asimismo, se realizaron análisis de diversos sistemas proteicos pretendiendo desentrañar los diversos procesos, tanto previos como posteriores al poblamiento, que resultaron en la conformación genética de las poblaciones del continente.

Con respecto a la multiplicidad de ingresos poblacionales al Nuevo Mundo, sin ser los primeros en plantear la posibilidad de un origen tripartito de las poblaciones americanas, el trabajo seminal de Greenberg et al. (1986) plantea un modelo de tres oleadas de poblamiento del continente americano, basado en datos lingüísticos, dentarios y genéticos. El trabajo plantea fechas estimadas de ingreso al continente sobre bases lingüísticas; las entradas de las oleadas, nombradas en términos lingüísticos como amerindia, na-dene y esquimal, fueron fechadas entre 9000 y 11000 años, 4500 o 9000 años y 2500 años, respectivamente. La teoría propone también que una única oleada – la primera de estas – llegó a Sudamérica, lo que reduce la variabilidad de los indígenas sudamericanos a aquella que pudiera obtenerse *a posteriori* del evento de poblamiento. El trabajo fue criticado especialmente en lo referente al fechado glotocronológico (basado en tasas de divergencia entre lenguas y grupos de lenguas, cuya limitación en el orden temporal es reconocida por el propio Greenberg) y ciertos criterios en el orden lingüístico que habrían sobresimplificado el panorama interno del grupo llamado “amerindio” (Weiss y Woolford 1986), pero resultó una

hipótesis fértil que desencadenó la proliferación de trabajos, empleando múltiples marcadores, destinados a verificarla. La mayor parte de los análisis los análisis se basaron en lo que en ese momento emergía como un marcador de ADN de alta utilidad para estudios evolutivos, que será analizado a continuación: el ADN mitocondrial.

## 1.2. EL ADN MITOCONDRIAL EN EL ESTUDIO DE LAS POBLACIONES AMERICANAS

### 1.2.1. CARACTERÍSTICAS DEL ADN MITOCONDRIAL

Las mitocondrias y los cloroplastos constituyen sistemas genéticos secundarios de las células eucariotas, y presentan el fenómeno de herencia citoplasmática, caracterizada por proporciones de segregación no mendelianas. Su origen más probable es el de organismos procariotas de vida libre, que habrían sido incorporados en simbiosis en protozoarios en el correr de la transición a una atmósfera oxidante, produciéndose desde allí la evolución a las actuales células eucariotas (Sagan 1967). La presencia de ADN en las mitocondrias fue descubierta en 1963 (Nass y Nass 1963), y desde entonces se fue dilucidando la variabilidad interespecífica en este genoma, así como su modo de herencia en diferentes grupos de organismos.

Jorde (1985) sintetiza las ventajas del ADN mitocondrial (ADNmt) con respecto a otros marcadores de ADN: a) El ADNmt de mamíferos no recombina; b) en animales superiores, el ADNmt es de herencia materna; c) su tasa de cambio es mayor que en el ADN nuclear. Las dos primeras características del ADNmt garantizan que las variantes del ADNmt no se “diluyan” en la historia evolutiva de la especie debido a la reproducción sexual. A su vez, la rápida tasa evolutiva del ADNmt lo hace ideal como marcador de historias evolutivas recientes.

El ADNmt humano es una molécula circular de 16.568 pares de bases (pb) (Andrews et al. 1999). Codifica 22 ARN de transferencia, sus propios ARN ribosomales, y 13 polipéptidos de más de 50 aminoácidos (Figura 1.1.A). A semejanza de la mayor parte de los genomas mitocondriales de mamíferos, es extremadamente compacto, con regiones intergénicas reducidas y ausencia de intrones (Anderson et al. 1981). Asimismo, como en muchos animales, su transmisión es materna (Giles et al. 1980) y no experimenta recombinación. El ritmo evolutivo del ADNmt humano, es de aproximadamente en promedio  $1,67 \cdot 10^{-8}$  mutaciones por nucleótido y año, es decir, una mutación cada 3624

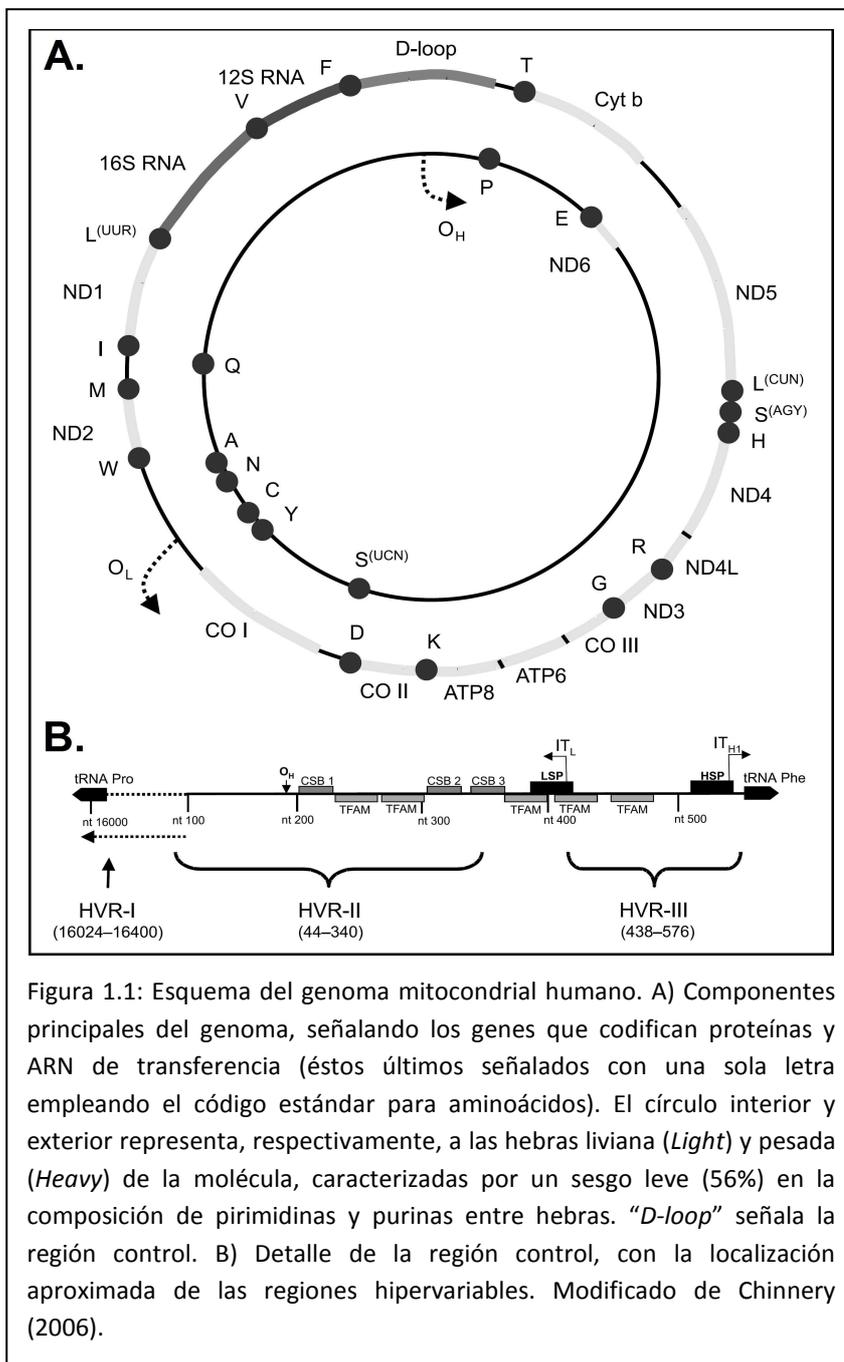


Figura 1.1: Esquema del genoma mitocondrial humano. A) Componentes principales del genoma, señalando los genes que codifican proteínas y ARN de transferencia (éstos últimos señalados con una sola letra empleando el código estándar para aminoácidos). El círculo interior y exterior representa, respectivamente, a las hebras liviana (*Light*) y pesada (*Heavy*) de la molécula, caracterizadas por un sesgo leve (56%) en la composición de pirimidinas y purinas entre hebras. “D-loop” señala la región control. B) Detalle de la región control, con la localización aproximada de las regiones hipervariables. Modificado de Chinnery (2006).

años (Soares et al. 2009), tasa que se multiplica por diez en la región control, una región no codificante ubicada entre las posiciones 16024 y 576, portadora de tres regiones hipervariables (Figura 1.1.B) (siguiendo la numeración de la secuencia de referencia – Anderson et al. 1981). A su vez, en la región control se han detectado “sitios calientes”

(*mutational hotspots*) (Macaulay et al. 1999; Stoneking 2000) cuya variabilidad fue interpretada originalmente como resultado de recombinación (Eyre-Walker et al. 1999; Hagelberg et al. 1999). Sobre la base del conocimiento disponible a la fecha, no obstante, se puede asumir que toda variación en el genoma mitocondrial humano proviene de eventos de mutación. Por lo tanto, es posible calcular diversidad intrapoblacional y distancias interpopulacionales aún en casos de poblaciones que han divergido en tiempos relativamente recientes. Ha de tenerse en cuenta sin embargo que las características que determinan la utilidad del ADNmt son también sus principales desventajas: la ausencia de recombinación hace que el genoma mitocondrial se herede como un solo locus, y en virtud de su herencia uniparental es especialmente sensible a fenómenos de deriva (Bennett et al. 1998).

Es notable, considerando la alta tasa de mutación del genoma mitocondrial, que las mitocondrias de un mismo individuo no presenten, en general, variantes detectables en su ADN, fenómeno conocido como homoplasmia. La heteroplasmia – esto es, la presencia de genomas mitocondriales con diferentes alelos en un mismo individuo – es un fenómeno de baja frecuencia, lo cual indica la presencia de algún mecanismo, posiblemente selectivo, responsable de reducir la variabilidad en el ADNmt de generación en generación (Wallace 2007).

### 1.2.2. EL ADN MITOCONDRIAL Y EL POBLAMIENTO DE AMÉRICA

Aportando al debate en torno al modo de poblamiento del Nuevo Mundo, los análisis tempranos de polimorfismos de fragmentos de restricción (RFLP) de muestras de ADNmt de distintos continentes mostraron que los patrones de restricción para una endonucleasa en particular (que fueron llamados “morfos”) se asociaban con el origen poblacional del individuo portador (Denaro et al. 1981). A su vez, Johnson et al. (1983) observaron que los patrones de restricción polimórficos generados por seis enzimas se podían representar como ramificaciones basadas en mutaciones únicas a partir de dos tipos centrales, especialmente frecuentes en Europa y Asia.

Posteriormente, el trabajo de Wallace et al. (1985) mostró que los ADNmt americanos presentaban variantes asiáticas, pero en frecuencias diferentes, lo cual era

explicado por un efecto “cuello de botella” que apoyaría el escenario de poblaciones asiáticas cruzando el puente de tierra de Beringia en el último máximo glacial y dispersándose por el continente en grupos reducidos. Trabajos posteriores (*e.g.* Schurr et al. 1990) arrojaron la presencia de cuatro variantes designadas como “haplogrupos fundadores”, todos ellos de origen asiático. Estos datos sugerían que el ADN mitocondrial amerindio derivaba de por lo menos cuatro linajes maternos, y que se habrían acumulado variantes en su dispersión por el continente. A los cuatro haplogrupos mencionados, respectivamente llamados actualmente A, B, C y D (Torroni et al. 1992), se agrega el haplogrupo X, presente en poblaciones europeas (Easton et al. 1996; Brown et al. 1998; Smith et al. 1999) y aparentemente presente sólo en poblaciones norteamericanas (Dornelles et al. 2005) lo cual en un principio dio lugar a un debate en cuanto al carácter “fundador” del haplogrupo. Este debate estaría actualmente resuelto en virtud de su descubrimiento en poblaciones siberianas (Derenko et al. 2001) y de su presencia en poblaciones precolombinas (Malhi y Smith 2002). Asimismo, Eshleman et al. (2003) descartan en principio la posibilidad de una ruta trasatlántica de migración prehistórica desde Europa, planteada sobre la base de este haplogrupo y sobre datos arqueológicos (Bradley y Stanford 2004), en virtud de que tal migración habría traído otros haplogrupos europeos, los cuales no han sido descubiertos en poblaciones antiguas.

Los trabajos desarrollados en el correr de las décadas de 1990 y 2000 han contribuido a exponer un panorama detallado, y considerablemente complejo, del acervo de ADN mitocondrial de las poblaciones americanas, y de las implicancias de dicho panorama para la dispersión del hombre en las Américas. Diversos trabajos realizados sobre la región control mostraron una alta variabilidad intrapoblacional agrupable igualmente en *clusters* (Ward et al. 1991; Horai et al. 1993; Bailliet et al. 1994) que pudieron identificarse posteriormente con los patrones de restricción de los haplogrupos A, B, C y D, definiéndose además una serie de subdivisiones para cada uno de estos (Forster et al. 1996). En cuanto a la nomenclatura de los *clusters*, y siguiendo un intento reciente de estandarización terminológica (Kemp y Schurr 2010), definimos *haplogrupo* como una agrupación a gran escala comprendiendo variantes con ancestría común definidos por una o unas pocas mutaciones en la región codificante. En este sentido, se considera que las subdivisiones de los haplogrupos A, B, C, D y X halladas

con posterioridad a los primeros trabajos (*e.g.* A2, B2, D4) retienen su condición de haplogrupos por ajustarse a la definición de los mismos, siendo simplemente un resultado del aumento en resolución de los análisis. Por *subhaplogrupo* entendemos una variante derivada de un haplogrupo (*e.g.* A2a, B4b, D4h3, X2a). Por último, *haplotipo* o *linaje* es una variante derivada local o individual.

Si bien existe cierto grado de acuerdo en cuanto a las características del ADNmt de las poblaciones americanas, no lo hay en cuanto al significado de éstas para la forma de poblamiento de América. Las primeras interpretaciones indicaban que las poblaciones amerindias (representadas por los haplogrupos A, B, C y D) y las poblaciones na-dene (representadas fundamentalmente por el haplogrupo A y en menor medida por el B) representaban distintas migraciones (Torroni et al. 1992). Por su parte, Horai et al. (1993) consideraron a cada haplogrupo una migración independiente, situación altamente improbable considerando que incluso una muestra pequeña de cualquier población siberiana oriental contendrá representantes de más de uno de los haplogrupos fundadores (Merriwether et al. 2000; Eshleman et al. 2003). Por añadidura, Merriwether et al. (1995) demostraron que los tres grupos lingüísticos considerados por Greenberg et al. (1986) presentan los cuatro haplogrupos en cuanto se emplean tamaños muestrales grandes, circunstancia que raramente podría repetirse en tres eventos migratorios, por lo que arguyen que las Américas habrían sido pobladas por un solo evento migratorio desde Asia. Esta afirmación es apoyada por Bonatto y Salzano (1997a, 1997b), quienes también plantean una entrada única de los antepasados de los indígenas de los tres grupos lingüísticos. Debe señalarse que todos los trabajos mencionados analizan la posibilidad de distinción entre las oleadas amerindia y na-dene, excluyendo la oleada aleuto-esquimal.

Por otra parte, la mayor parte de los trabajos sobre el poblamiento de América basados en ADNmt aceptan el supuesto original de Wallace et al. (1985) de que la diversificación de los haplogrupos sucedió tras el evento de inmigración que, al incluir un cuello de botella, habría “puesto a cero” el cronómetro evolutivo. Esta asunción debe hacerse con prudencia ya que, si los primeros pobladores ingresaron con algún grado de diversidad haplotípica, las edades de ingreso estarán sobrestimadas (Ward et al. 1991). Este aspecto fue tomado en cuenta para elaborar modelos más refinados de la dinámica

poblacional en el puente de tierra Pleistoceno de Beringia: Tamm et al. (2007), empleando secuencias mitocondriales completas, plantean un período de “maduración” (crecimiento poblacional y acumulación de variabilidad) de los haplogrupos asiáticos A, B, C y D en Beringia, tras el cual ciertos grupos derivados habrían ingresado a continente. El número y nomenclatura de estos grupos han variado en las sucesivas investigaciones, y en especial el número de subhaplogrupos, va en constante aumento (Tabla 1.2). Trabajos posteriores, también empleando genomas mitocondriales completos, han contribuido a dar más detalle a este panorama (Fagundes et al. 2008a, 2008b; Perego et al. 2009, 2010; Bodner et al. 2012; de Saint Pierre et al. 2012).

Las inferencias mencionadas en cuanto a cantidad y antigüedad de los contingentes que ingresaron al Nuevo Mundo se basan enteramente en muestras de ADN mitocondrial de individuos modernos. Sin embargo, en cuanto fue posible analizar ADN antiguo, se comenzó a trabajar con restos de América buscando verificar si las poblaciones pasadas poseían los mismos haplogrupos que los encontrados en las poblaciones actuales o si, por el contrario, hubo haplogrupos en tiempos precolombinos extintos luego de la llegada del europeo. Varios análisis tempranos de ADN antiguo hallaron características que no correspondían con ninguno de esos haplogrupos (Pääbo et al. 1988; Hauswirth et al. 1994; Ribeiro-dos-Santos et al. 1996); actualmente, esos trabajos son puestos en duda por no conformar completamente con los estándares de análisis de ADN antiguo (ver *infra*, tabla 1.4). No obstante, en 2007 el análisis realizado sobre dos individuos de 5000 años de antigüedad de la Columbia Británica demostró que ambos portaban el macro-haplogrupo asiático M (del cual derivan los haplogrupos americanos C y D), nunca antes hallado en ninguna población, antigua o moderna, de América (Malhi et al. 2007).

El estudio mencionado constituye un caso excepcional: en general, las muestras antiguas analizadas en América presentan los haplogrupos fundadores registrados en poblaciones modernas. Estos haplogrupos no muestran menor variabilidad en muestras antiguas: Kemp et al. (2007) analizaron restos humanos de 10.300 años de antigüedad provenientes de la Isla Prince of Wales, Alaska, los cuales resultaron pertenecer al subhaplogrupo D4h3, lo que demostraría la presencia de un subhaplogrupo derivado en

América poco después del poblamiento, contradiciendo el postulado de una reducida variabilidad de las poblaciones fundadoras.

Tabla 1.2: Polimorfismos de restricción (RFLP) y de nucleótido simple (SNP) que definen a los haplogrupos y subhaplogrupos de ADNmt presentes en poblaciones americanas. Modificado de O'Rourke y Raff (2010).

Variante	Motivo RFLP	SNPs región control	SNPs región codificante
A A2 A2a A2b	+HaeIII 663	235, 16290, 16319 146, 153, 16111, 16362 16192 16265	663, 1736, 4248, 4824, 8794 8027, 12007 3330 11365
B B4 B4b B2	Reg. V -9pb	16189 16217 499	8281-8289d  827, 4820, 13590, 15535 8913, 12397, 14502
X X2 X2a	-Ddel 1715, +16517 HaeIII	153, 16189, 16278 195 200, 16213	6221, 6371, 13966, 14470 1719 8913, 12397, 14502
C C1 C1b C1c C1d C4 C4c	-HincII 13259, +AluI 13262, +AluI 10287, +Ddel 10284	249d, 16327  290-290d, 16325 493  16051  16245	3552A, 9545, 11914, 13263, 14318   1888, 15930  2232A, 6026, 11969, 15204 11440, 13368, 14433, 15148
D D4 D4h3 D1 D2 D2a D4b1	-AluI 5176, + AluI 10287, +Ddel 10284	16362  152, 16301, 16342 16325 16129, 16271  16319	4883, 5178A  3010, 8414, 14668 3396, 8414, 5048 2092 3316, 7493, 8703, 9536, 11215 11959 8020, 10181, 15440, 15951

Se ha propuesto que la situación actual del ADNmt nativo representa una situación distorsionada respecto a las poblaciones precolombinas, lo cual es plausible considerando que, como consecuencia de la conquista, se habría producido una reducción de las poblaciones aborígenes de 90% a 95% (Denevan 1992). En ese sentido, se constata que la diversidad intrahaplogrupo suele ser mayor en las muestras antiguas: los análisis de la región hipervariable I de una muestra del sitio Norris Farms (EE.UU) arrojaron una diversidad a nivel de linajes únicos más alta que la que se halla en poblaciones modernas (Stone y Stoneking 1998, 1999). En cuanto a la estabilidad de las frecuencias de haplogrupos, el análisis comparativo de las frecuencias de haplogrupos de varias muestras antiguas norteamericanas con las de 41 poblaciones contemporáneas arrojó que la diferenciación en América del Norte de patrones locales de frecuencias de ADNmt se estableció en tiempos tempranos, manteniéndose más allá de las interrupciones producidas por el contacto con el europeo

(O'Rourke et al. 2000). Un análisis basado en datos más recientes corrobora parcialmente estos resultados, detectando sin embargo disrupciones significativas en algunas regiones de Norteamérica (Raff et al. 2011).

Recientemente, varios trabajos han contribuido a verificar la estabilidad de la estructura genética a nivel de ADNmt en América del Sur: los análisis realizados en la región de los Andes centrales por Lewis et al. (2007), Kemp et al. (2009) y Fehren-Schmitz et al. (2011) comparando varias muestras precolombinas del área con poblaciones contemporáneas arrojan como síntesis un panorama en el cual los linajes maternos no habrían sufrido cambios sustanciales, a pesar de dinámicas poblacionales y culturales variadas. Sin embargo, el análisis de 35 individuos precolombinos de la provincia de Córdoba, realizado por Nores y Demarchi (2011) muestra una diferencia entre las frecuencias de haplogrupos de las poblaciones precolombinas y las actuales indicativa de una alteración de la estructura genética posterior al contacto con el europeo.

En Uruguay, país carente de poblaciones aborígenes, se constata un aporte materno indígena sustancial, que va de 20% en Montevideo (Gascue et al. 2005) hasta un 62% en Tacuarembó (Bonilla et al. 2004) y 64% en Artigas (Sans et al. en preparación). La verificación de la continuidad a nivel de haplogrupos y linajes de ADNmt en nuestro territorio es crítica para evaluar la factibilidad de la reconstrucción, a partir del componente indígena de las poblaciones actuales, de la historia de las poblaciones pasadas. En este sentido, el análisis de ADN extraído de esqueletos recuperados en sitios arqueológicos del Departamento de Rocha reveló la presencia de la misma secuencia del haplogrupo C, con una mutación rara en la posición 16288 (Bertoni et al. 2004). Poco después, el análisis de los restos del Charrúa Vaimaca Perú mostró que era portador del motivo de secuencia 16051G-16223T-16288C-16298C-16325C-16327T (Sans et al. 2010). Este linaje, además de coincidir con el de los individuos analizados por Bertoni et al. (2004), fue hallado en individuos actuales de Melo (Sans et al. 2006), Montevideo (Pagano et al. 2005), Trinidad (Sans et al. 2011), Mercedes y Rocha (Figueiro et al. 2011). Esto plantea una continuidad poblacional en nuestro territorio entre los pobladores prehistóricos de la región Este y los cazadores-recolectores conocidos en tiempos históricos (Sans y Figueiro 2009; Sans et al. 2010).

Los análisis genéticos de poblaciones antiguas tienen como dificultad fundamental el lograr una muestra temporalmente consistente: en la medida en que muchas veces se trabaja con muestras atribuibles a períodos amplios, en el orden de siglos, cualquier generalización que se haga de la muestra a la población debe manejarse con prudencia. No obstante, los análisis de ADNmt en muestras americanas antiguas han arrojado resultados relevantes no sólo en lo relativo al poblamiento de América, sino también respondiendo preguntas relacionadas con aspectos de la dinámica de las poblaciones muestreadas, especialmente problemas de reemplazo poblacional o flujo génico local y regional. Ejemplo de ello son los trabajos de Parr et al. (1996), Carlyle et al. (2000) y Kaestle y Smith (2001) apoyando la hipótesis, propuesta a partir del registro arqueológico, de una migración reciente a la región de la “gran cuenca” del sudoeste norteamericano de poblaciones externas a la misma, y el trabajo de Moraga et al. (2005) aportando evidencia en favor de las hipótesis, formuladas también sobre evidencia arqueológica, de la influencia en los grupos de la costa Pacífica del norte de Chile de las culturas del Titicaca y los Andes centrales.

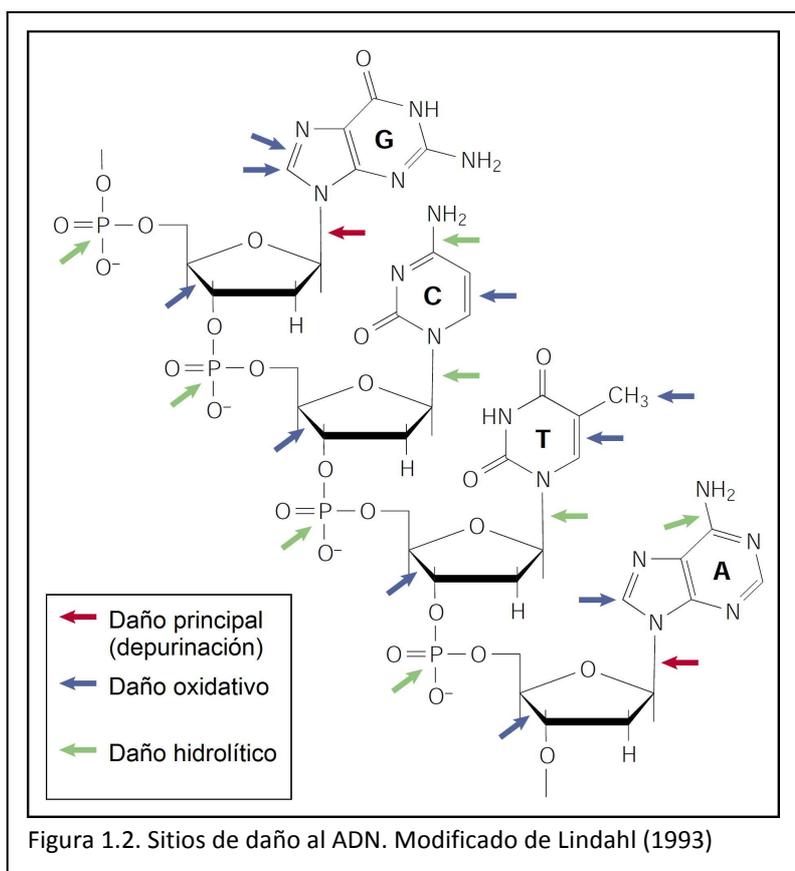
En resumen, los resultados de los análisis de ADN mitocondrial antiguo en América apuntan a la existencia de una mayor variabilidad genética en poblaciones precolombinas de que lo que se suponía, ya sea a nivel de haplotipos (Stone y Stoneking 1998; Kemp et al. 2007) como a nivel de haplogrupos (Malhi et al. 2007). Sin embargo, a escala geográfica menor, cuando se han comparado frecuencias de haplogrupos en poblaciones antiguas y actuales de las mismas regiones, éstas muestran cierta constancia en la mayoría de los estudios. En otros casos, las discontinuidades observadas han servido para sustentar hipótesis planteadas sobre evidencias del registro arqueológico (Kaestle y Smith 2001). El ADN antiguo constituye por lo tanto una fuente de información importante a nivel de la reconstrucción de historias poblacionales locales, regionales y globales; su análisis implica, sin embargo, una serie de desafíos técnicos.

### 1.3. ADN ANTIGUO: ASPECTOS TÉCNICOS E HISTÓRICOS

#### 1.3.1. FACTORES ASOCIADOS A LA CONSERVACIÓN DEL ADN

De acuerdo a Lindahl (1993), los mayores daños ocurridos al ADN en la célula viva son daños hidrolíticos y oxidativos (Figura 1.2). Los daños por hidrólisis atacan el enlace N-glicosídico entre el azúcar y la base, implicando fundamentalmente la pérdida de purinas.

Tras la pérdida de la base se suele producir un corte en la cadena de azúcar-fosfato ( $\beta$ -eliminación), con lo que se da una ruptura de la cadena de ADN. Otro daño producido por hidrólisis es la desaminación, que afecta a la citosina (convirtiéndola en uracilo) y a su homóloga la 5-metilcitosina (convirtiéndola en timina); este daño no afecta generalmente a las purinas. Por otro lado, el daño oxidativo se basa en el modo en que radicales



hidroxilo y peróxido modifican las bases o distorsionan la hélice. La modificación de bases oxidativas ataca en principio a las purinas, consistiendo fundamentalmente en la conversión de la guanina en 8-hidroxiguanina, que aparea mejor con la adenina que con la citosina. El daño oxidativo a las pirimidinas produce en última instancia la desintegración de las mismas. Por último, las distorsiones de la hélice producidas por el daño oxidativo se deben al

establecimiento de enlaces covalentes dobles entre las purinas y la cadena de azúcar-fosfato, y a la formación de dímeros de purinas (Lindahl 1993).

La mayor parte de los daños mencionados se revierten con relativa eficacia en la célula viva por una serie de mecanismos de reparación. No obstante, una vez muerto el organismo, estos daños se acumulan. Los daños son más intensos en el período inmediatamente siguiente a la muerte, con la liberación de enzimas autolíticas por los lisosomas y la ruptura de la lámina nuclear, que presumiblemente deja susceptibles a la mayor parte del ADN y el ARN al ataque de nucleasas. Por añadidura, la morfología de los ácidos nucleicos extraídos de restos momificados revelan uniones interhebra (*inter-strand cross-linking*; Pääbo et al. 1989). La dificultad de unión de agentes intercalantes como el bromuro de etidio al ADN antiguo es consistente con la posibilidad de que la hélice esté fuertemente deformada (Rogan y Salvo 1990).

Se puede esperar que el ADN totalmente hidratado, desprovisto de mecanismos de reparación, se reduzca por completo a fragmentos pequeños (< 10 pb) en unos pocos miles de años. La velocidad de degradación puede reducirse en presencia de sales, y la unión del ADN a la hidroxiapatita (que constituye la matriz mineral del hueso) reduce la velocidad de desintegración a la mitad (MacHugh et al. 2000; Götherström et al. 2002). Eso explica una mejor conservación del ADN en hueso que en tejidos blandos.

Estas consideraciones están directamente relacionadas con la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*, PCR). La desaminación oxidativa hace que las citosinas (convertidas en uracilo) sean reconocidas como timinas por la *Taq* polimerasa, y por consiguiente en la extensión se agregará una adenina. Como resultado, se produce en la PCR la sustitución de un par CG por otro AT; un exceso de mutaciones G→A o C→T debe ser observado como producto del daño por desaminación (Hofreiter et al. 2001). Otro fenómeno resultante en una sustitución CG→AT es el "cambio de molde" o "salto de cebador" (*primer jumping*), basado en la tendencia de la *Taq* polimerasa a agregar residuos A en el extremo 3' de los productos de extensión. Como resultado, la interrupción en la extensión por la fragmentariedad del molde puede dar lugar a que, en el siguiente ciclo, el producto parcialmente extendido se una a otro blanco o a un

producto de contaminación, dando lugar a una amplificación “recombinante” (Pääbo et al. 1990).

Hay otros factores, relacionados con el medio en el cual se encuentra la muestra, que pueden influir positivamente en la preservación del ADN (Tabla 1.3). A grandes rasgos, se considera que la preservación de la materia orgánica sigue trayectorias semejantes, por lo que una baja tasa de racemización de aminoácidos será buena señal (aunque no garantía) de preservación del ADN (Poinar y Stankiewicz 1999). Otros autores consideran que en el caso del hueso, el grado de cristalinidad de hidroxiapatita es mejor indicador que la preservación del colágeno (proteína mayoritaria del hueso) (Götherström et al. 2002).

Tabla 1.3: Factores favorables para la preservación de ADN antiguo en materiales arqueológicos. Modificado de MacHugh et al. (2000).

<b>Factor favorable</b>	<b>Comentarios</b>
Ausencia de microorganismos	Los microorganismos y su metabolitos son capaces de destruir el ADN por completo.
Aridez	La ausencia de agua reduce el daño oxidativo e hidrolítico.
Adhesión del ADN a superficies minerales	Las superficies minerales como la hidroxiapatita estabilizan el ADN.
Inhumación rápida tras la muerte	La formación de gases y la degradación de los tejidos acelera la invasión por microorganismos.
Sequedad / dureza de los tejidos	Los tejidos duros y secos previenen reacciones físicas y químicas. Huesos y dientes proveen de protección contra reacciones químicas y ataque por microorganismos.
Temperaturas bajas	Las temperaturas reducidas retardan la mayor parte de las reacciones químicas, así como la reproducción de microorganismos.
pH neutro o levemente alcalino	El aumento del pH conlleva la destrucción de los tejidos y con ellos del ADN.
Presencia de ácidos húmicos y fúlvicos	Los geopolímeros fenólicos previenen la actividad aeróbica.

### 1.3.2. HITOS, AVANCES Y RETROCESOS EN LA INVESTIGACIÓN CON ADN ANTIGUO

Los primeros análisis de ADN extraído de restos arqueológicos se remontan a 1984, año en el que se extrajo y clonó un fragmento de 229 pb de ADN mitocondrial de la piel desecada del *quagga*, un caballo extinto. El árbol filogenético resultante del análisis lo coloca

en una rama común con la cebra, y separado del caballo y el burro (Higuchi et al. 1984). Al año inmediato siguiente, se extrajo y clonó un fragmento de 300 pb de un repetido *Alu* de una momia egipcia (Pääbo 1985). La extracción y caracterización – con medios técnicos mucho más refinados que en 1985 – de ADN nuclear de las momias de Tutankamón (Hawass et al. 2010) confirma la factibilidad al trabajo de Pääbo, que fue cuestionada en retrospectiva por Marota et al. (2002) quienes consideraban imposible la conservación de ADN en el medio egipcio más allá de unos pocos siglos.

La técnica de clonado es especialmente problemática al trabajar con ADN degradado como el que se recupera de restos arqueológicos: El ADN modificado puede inhibir o no ser reconocido por las polimerasas, endonucleasas y ligasas empleadas; los productos de ligación con moléculas alteradas puede afectar la capacidad de replicación del plásmido y la eficiencia de transformación; por último, los tamaños de los fragmentos de ADN recuperados (en el orden de los  $10^2$  pb) hacen que se requieran bibliotecas en el orden de los millones de clones para recuperar información útil. Por ello, no fue sino hasta la implementación de la PCR (Mullis et al. 1986; Saiki et al. 1988) que se produjo un aumento en los intentos de recuperación y estudio de ADN conservado en tejidos antiguos durante la década de 1990 (Hagelberg 1994). La elección más frecuente en cuanto a ADN a amplificar fue el mitocondrial, en virtud de que está presente en miles de copias por célula (Robin y Wong 1988), haciendo asimismo más probable la amplificación de un segmento mitocondrial que la de un segmento nuclear.

En retrospectiva, los estudios pioneros trabajaron sobre dos conceptos erróneos: el primero, que el ADN podría recuperarse únicamente de restos antiguos de conservación excepcional; el segundo, que en caso de conservarse ADN, lo haría en forma indefinida. Con respecto al primer preconcepto, los primeros intentos de extraer ADN antiguo se hicieron sobre tejidos blandos excepcionalmente conservados (Higuchi et al. 1984; Pääbo et al. 1988), pero los trabajos de Hagelberg y Clegg (1991) y Cooper et al. (1992) mostraron que el tejido esquelético rendía mejores resultados que los tejidos blandos al momento de extraer ADN. El segundo preconcepto dio lugar a un optimismo desmedido en cuanto a las antigüedades de los restos de los que se podía recuperar ADN amplificable – por ejemplo, insectos de 130 millones de años conservados en ámbar (Cano et al. 1993) – olvidando que

la sensibilidad de la PCR es, a la vez que una ventaja, su principal inconveniente. El intento de reproducir extracciones de ADN de insectos incluidos en ámbar fracasó, dando lugar a la categórica afirmación de que aislar y amplificar ADN de especímenes de antigüedad mayor a 100.000 e incluso 50.000 años sería una tarea imposible (Austin et al. 1997), y que todas las secuencias de antigüedad mayor a un millón de años son artefactos (Pääbo et al. 2004). Otra consecuencia de la reacción contra el exceso de confianza inicial fue un ajuste en los requerimientos para dar por auténticos los trabajos realizados con ADN antiguo (Cooper y Poinar 2000; tabla 1.4), incluyendo la realización de análisis de racemización de aminoácidos de las muestras a fin de evaluar la factibilidad de la conservación de ADN en los mismos (Poinar y Stankiewicz 1999), lo cual en ocasiones llevó al descarte masivo de potenciales muestras (e.g. Vernesi et al. 2004).

Tabla 1.4: Criterios para garantizar la autenticidad del ADN antiguo. Modificado de Pääbo et al. (2004).

<b>Criterio</b>	<b>Propósito</b>
1. Clonado de productos de amplificación y secuenciado de clones múltiples	Detección de heterogeneidad en los productos de amplificación, sea por contaminación, daño al ADN o PCR saltatorio (" <i>jumping PCR</i> ")
2. Controles de extracción y de PCR	Identificar contaminación y distinguir entre contaminación introducida durante la extracción de ADN y contaminación introducida durante la preparación de la PCR.
3. Repetición de amplificaciones a partir del mismo o diferentes extractos	a) Detección de contaminación esporádica b) Detección de cambios consistentes debidos a lesiones inductoras de error (" <i>miscoding lesions</i> ") en extractos con número muy bajo de moléculas de molde.
4. Cuantificación del número de moléculas amplificables de ADN	Con más de 1000 moléculas de molde bastaría una sola amplificación para obtener resultados fiables.
5. Correlación inversa entre eficiencia de la amplificación y tamaño del fragmento amplificado	Puesto que el ADN antiguo está fragmentado, esta correlación debería darse en cualquier tipo de extracto.
6. Ensayos bioquímicos de preservación macromolecular	La mala preservación bioquímica indica baja probabilidad de contener ADN. La buena preservación bioquímica es un argumento a favor de la autenticidad de una secuencia antigua.
8. Reproducción en un segundo laboratorio	Detectar contaminación de reactivos o muestras en el laboratorio. Nótese que los contaminantes presentes en la muestra antes de su manipulación serán reproducidos en el segundo laboratorio.

Trabajando con más prudencia se ha ido sin embargo rompiendo barreras en cuanto a la antigüedad de los especímenes de los cuales se ha recuperado y analizado ADN, siendo probablemente el análisis más notable y debatido el del Neandertal de Feldhofer, Alemania, (Kriings et al. 1997), datado en aproximadamente 40.000 años (Schmitz et al. 2002). Este análisis fue seguido por el de otros restos de Neandertal de Europa (Kriings et al. 2000; Ovchinnikov et al. 2000; Lalueza-Fox et al. 2005) y, en conjunto con los análisis de restos de humanos modernos de cronologías similares (Caramelli et al. 2003) parecía descartar definitivamente la posibilidad de un aporte Neandertal al acervo genético del hombre moderno. Sin embargo, como señaló Nordborg (1998), el ADNmt no es un marcador adecuado para refutar una hipótesis de mezcla por tratarse de un marcador uniparental. Los análisis realizados por el mismo equipo, secuenciando el genoma nuclear completo de un espécimen de Neandertal de Vindija, Croacia, datado aproximadamente en 38.000-44.000 años (Green et al. 2010), proporcionan evidencias para refutar las interpretaciones proporcionadas por el ADNmt. Los análisis del genoma del Neandertal de Vindija indican un 4% de identidad de secuencia con los genomas europeos modernos, indicando algún grado de cruzamiento entre las poblaciones neandertales y el *Homo sapiens* europeo del Pleistoceno. Los análisis del espécimen Neandertal de Croacia, junto con los de un paleoesquimal de 4000 años (Rasmussen et al. 2010) y restos de homínido hallados en Siberia (Reich et al. 2010) marcan el ingreso de los sistemas de secuenciación de alto rendimiento (*high-throughput sequencing*) en el ámbito de ADN antiguo, aunque aún no en cantidades que garanticen el tamaño muestral necesario para genética de poblaciones antiguas.

Por otra parte, el análisis de ADN antiguo de otras especies ha generado resultados útiles en ámbitos arqueológicos, aportando evidencia en cuanto a la domesticación de plantas (Jaenicke-Després et al. 2003) y animales (Edwards et al. 2004; Cai et al. 2009, 2011; Deguilloux et al. 2009; Speller et al. 2010; Bjørnstad et al. 2012), el manejo de recursos faunísticos salvajes (Sykes et al. 2011; Grier et al. 2013), el estudio de patógenos en restos antiguos (Raoult et al. 2000; Taylor et al. 2009; Wilbur et al. 2009), entre muchos otros temas.

#### 1.4. LA REGIÓN PAMPEANA: DEFINICIÓN Y SÍNTESIS ARQUEOLÓGICA

La región de llanuras que se extienden entre el Océano Atlántico y el pie de las Sierras Centrales y la precordillera mendocina, a grandes rasgos entre los 54º y 63º de longitud oeste y los 31º y 40º de latitud sur, recibe el nombre de Pampa o Pampas (Figura 1.3). Incluye, completamente o en parte, a las provincias argentinas de Buenos Aires, La Pampa, San Luis, Mendoza, Córdoba, Santa Fe y Entre Ríos, al Uruguay y al Estado brasileño de Rio Grande do Sul. Su clima actual es templado, caracterizado por un gradiente de humedad que declina en dirección este-oeste, con un promedio anual de lluvias que presenta la misma tendencia: las precipitaciones más altas (mayores a 900 mm anuales) se registran en el noreste y las más bajas (menos de 500 mm anuales) en el sudoeste. Las temperaturas medias en el noreste oscilan entre los 24°C en verano y los 10°C en invierno, con una variación general 4°C menor en el sudoeste de la región. En síntesis, el área se clasifica como subhúmeda-húmeda en el este y subhúmeda-seca en el oeste, con un borde semiárido al sur (Politis et al. 2004). La región está delimitada por el Planalto al noroeste, y al oeste y al sur por las provincias fitogeográficas del Espinal y el Monte. Estas dos provincias son usualmente integradas dentro de la arqueología pampeana, aún cuando no se trata de ambientes de pastizales, como los que predominan en la región pampeana propiamente dicha (Politis 2008).

El desarrollo de la arqueología de esta región es desparejo, con diferencias notorias en la profundidad de las investigaciones así como de los marcos teóricos asociados a las mismas. Sin embargo, en términos generales se ha logrado un avance sustancial en las investigaciones de su poblamiento y procesos culturales, que se extienden como mínimo hasta el Pleistoceno final, hace 12000 años (Berón y Politis 1997). A continuación se presenta una síntesis de la prehistoria de la región pampeana, basada en Berón y Politis (1997); Noelli (1999-2000); Politis (2000, 2008); Politis y Madrid (2001) y Politis et al. (2004), señalándose otras fuentes en caso de ser pertinente.

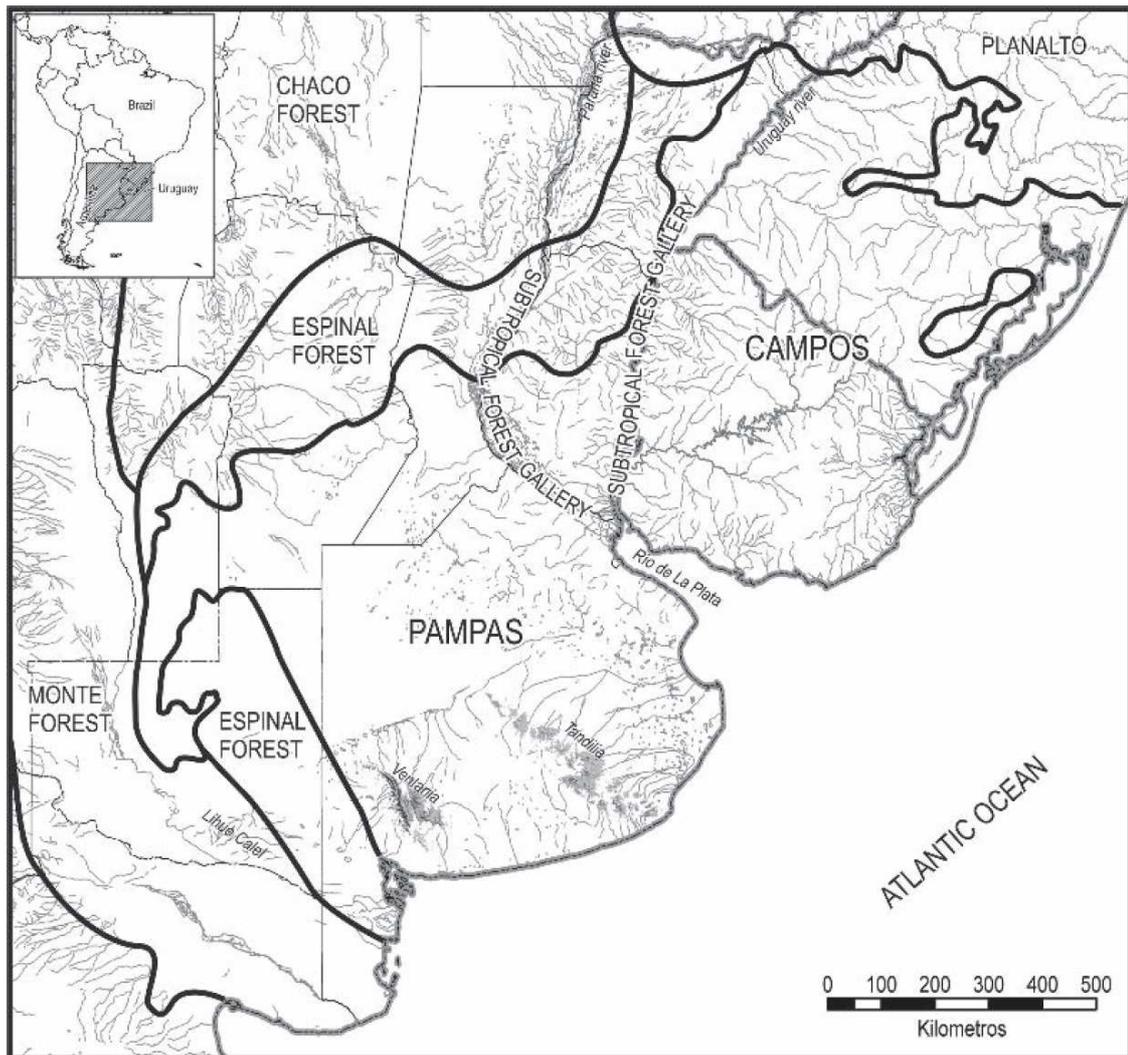


Figura 1.3: Mapa de la región pampeana y áreas fitogeográficas vecinas (tomado de Politis 2008). Nótese que Politis (2008) emplea la palabra “Pampas” para las llanuras pampeanas de la actual Argentina, empleando la palabra “Campos” para referirse a la Mesopotamia argentina y las llanuras de Uruguay y Brasil.

#### 1.4.1. PLEISTOCENO FINAL / HOLOCENO TEMPRANO (HASTA 6500 A.A.P.)

A fines del Pleistoceno (12.000-10.000 a.A.P.) primaban condiciones climáticas frías y ambientes semiáridos a áridos. Los estudios realizados indican que hace 11.000 años el nivel del mar se encontraba a unos 60m por debajo del nivel actual, con lo cual el actual Río de la Plata se presentaba como una gran planicie costera dominada por una red de drenaje con brazos deltaicos, lagunas costeras y sistemas de dunas. Desde los inicios del Holoceno se registra paulatinamente una tendencia hacia el incremento de los niveles de temperatura y

humedad que culminaron aproximadamente en el 1000 A.P. con el establecimiento de las condiciones actuales.

Durante finales del Pleistoceno se produce el poblamiento de la región, con dataciones de hasta 11.200 a.A.P. en la zona de Tandilia y de 12.300 a.A.P. en la zona interserrana bonaerense, y un aumento de la visibilidad arqueológica a partir de los 11.000 a.A.P en esta área y en el Uruguay. En esta región, los fechados más antiguos de evidencia de ocupación humana se encuentran en el río Uruguay medio (Salto Grande, 11.200 ± 500 a.A.P., Gif 4412) y en el río Cuareim (Pay Paso 1, 9890 ± 75 a.A.P., Rt 1445).

En Brasil, las investigaciones arqueológicas, fuertemente influenciadas por métodos histórico-culturales basados en atribuir conjuntos más o menos definidos de artefactos a “culturas” arqueológicas que a menudo son atribuidas a grupos humanos concretos, definen para el límite Pleistoceno/Holoceno la presencia en el sur del país de poblaciones portadoras de la tradición Umbú, fundamentalmente definida por artefactos de talla unifacial y puntas de proyectil. Con fechados radiocarbónicos de antigüedad máxima de 13.000 a.A.P., los sitios se extenderían hasta el sur del Estado de San Pablo. Esta tradición presenta además una notable estabilidad, con sitios pertenecientes a la misma hasta aproximadamente 2000 a.A.P.

Durante el Holoceno temprano, entre 10.000 y 7000-6500 a.A.P., la región pampeana, especialmente en su porción oriental, era más fría y árida que en la actualidad. Se registran múltiples sitios relacionados con actividades múltiples y reocupación por un lado, y actividades específicas (caza, procesamiento, ocupaciones de corta duración) por otro. Estos sitios se caracterizan por un elemento ergológico común a toda la porción sur de Sudamérica, las puntas de tipo “Cola de pescado”, halladas también en el río Negro y en el litoral Atlántico del Uruguay, con semejanzas tecnológicas notables con las recuperadas en la Pampa y Patagonia argentinas (Suárez y López Mazz 2003). Hacia el 8000 A.P. se registran en el litoral Atlántico del Uruguay evidencias de la adopción de una economía de amplio espectro, con un mayor procesamiento de recursos, presencia marcada de recursos acuáticos y recolección intensiva del fruto de palma (*Butia capitata*) (López Mazz et al. 2003-2004).

Desde el 8000 A.P., en Brasil se registran sitios que se adscriben a una tradición diferente de Umbú, y que se extienden desde el sur del Estado de San Pablo hasta el río Jacuí. Esta tradición, conocida como Humaitá, se caracteriza por artefactos bifaciales tallados sobre núcleos; tradicionalmente (y sin mayores evidencias de orden paleoambiental) se establece la dicotomía Humaitá y Umbú afirmando que mientras los primeros ocuparían ambientes de floresta, los segundos ocuparían ambientes de llanura abierta.

#### 1.4.2. HOLOCENO MEDIO (6500-3500 A.A.P.)

A mediados del Holoceno, el progresivo aumento en la temperatura registra un pico en el cual se desarrollaron los eventos transgresivos del avance marino (de 2 a 4,5m por encima del nivel actual), cuyas fechas son controvertidas (entre 8000 y 5000 a.A.P.). Finalmente, aproximadamente entre el 4000 y el 3000 A.P. se establece la actual línea costera. Hacia el inicio de este período se extinguen los últimos representantes de la megafauna pleistocénica. En la Pampa argentina se registran las primeras ocupaciones de la zona costera y las zonas áridas del oeste así como eventos de inhumación y representaciones simbólicas.

En este período, hay una hipótesis concreta de reemplazo poblacional planteada para la región suroriental de la Pampa, sobre la base de dos líneas de evidencia. En primer lugar, se observa una disminución en la densidad de fechados radiocarbónicos entre 5960 y 5060 a.A.P. En segundo lugar, los análisis morfométricos de cráneos humanos del Holoceno medio y el Holoceno tardío sugieren que pertenecerían a distintas poblaciones biológicas (Barrientos y Pérez 2005).

Las evidencias datadas para Uruguay durante el Holoceno medio son escasas y se concentran en el litoral Atlántico y en las costas del Río de la Plata. En el litoral Atlántico, se dan hacia el 5000 A.P. las primeras evidencias relacionadas con la construcción de estructuras monticulares (“cerritos de indios”) que constituirán el escenario de una importante evolución de complejidad sociocultural en el correr del Holoceno tardío (López Mazz 2001; Bracco 2006), registrándose asimismo ocupaciones en la orilla de la Laguna de Castillos y en la costa Atlántica hacia el 4500 A.P. (López Mazz 2001). En las costas del Río de

la Plata, el componente más antiguo de ocupación del sitio La Tuna está datado en 4800 a.A.P, y constituye la evidencia más temprana de un conjunto relativamente denso de ocupaciones en la cuenca del río Santa Lucía registrado para el Holoceno tardío (Beovide y Malán 2009).

#### 1.4.3. HOLOCENO TARDÍO (3500-500 A.A.P.)

Este período muestra evidencias de intensificación de la ocupación humana de la región, con cambios significativos en cuanto a la tecnología, como ser la producción de una mayor variedad de instrumentos, la introducción del arco y la flecha, y la adquisición de la alfarería. Varios de los cambios observados en el registro arqueológico apuntan también a un decremento en la movilidad de los grupos en la región y posible aumento en la complejidad social (Bayón y Flegenheimer 2004).

A la par de la intensificación de la ocupación humana de la Pampa, se intensifica también el establecimiento de redes sociales que llevarían a la generación de mecanismos de intercambio con grupos de regiones extrapampeanas, incluyendo la Patagonia, el Valle Central de Chile, las Sierras Centrales y el Noroeste, todo esto identificado a través de materiales exóticos hallados en el registro arqueológico pampeano. Finalmente, hacia el final del Holoceno tardío e inmediatamente antes de la llegada del europeo se identifica el ingreso de grupos Guaraníes por el noreste, así como Tehuelches septentrionales por el sur hacia el 1500 A.P. y Araucanos por el sur y el oeste hacia el siglo XVI. La interacción con éstos últimos, junto con la adopción del caballo y el ganado traídos por el europeo, produjo cambios sustanciales en la dinámica de los grupos pampeanos.

Las investigaciones realizadas en el Delta del río Paraná, comenzadas a principios del siglo XX, muestran un panorama de alta complejidad social, con presencia de estructuras tumulares a partir del 2000 A.P., que mostrarían menor variabilidad que las estructuras análogas del Este de Uruguay (Castiñeira et al. 2013). Estas estructuras presentan evidencias de explotación de especies locales y entierros humanos. Un rasgo arqueológico notable es la presencia en varios túmulos de cerámica con apéndices zoomorfos, con dataciones de contexto en el Delta superior entre  $860 \pm 40$  y  $560 \pm 80$  a.A.P (Politis et al. 2011). Esta

cronología se correspondería al límite inferior del rango temporal de la cultura de los “ribereños plásticos”, caracterizada por cerámica con aditamentos zoomorfos, a cuyos portadores se atribuye clásicamente una influencia de pueblos del grupo lingüístico Arawak (Serrano 1972). En el registro arqueológico del área, el desarrollo de estas sociedades es testigo de una disrupción por el arribo de los Guaraníes aproximadamente hacia el 1400 d.C. Los trabajos clásicos relacionan a los productores del registro del Holoceno tardío del Delta a poblaciones Chaná-Timbú y Chaná-Mbeguá, tendencia que se repite por parte de las investigaciones recientes (Loponte et al. 2006; Bonomo et al. 2011).

En el Uruguay, las evidencias arqueológicas atribuidas al Holoceno tardío son múltiples, si bien las evidencias fechadas provienen de dos grandes zonas: en el Este, la Cuenca de la Laguna Merín, y en el Oeste, el litoral del Río Uruguay y la cuenca del río Santa Lucía. El fenómeno arqueológico mejor conocido asociado a zona Este es el correspondiente a los “cerritos de indios”, estructuras monticulares de origen antrópico distribuidas por el noreste del Uruguay y el sur del Brasil, con un rango temporal desde aproximadamente 3500 a.A.P. hasta el siglo XVII, con antigüedades máximas arrojadas por fechados radiocarbónicos de 5400 años (Bracco 2006).

En Brasil, los “cerritos de indios” son conocidos por el nombre de “aterros” y fueron abordados por la arqueología brasileña en especial durante las décadas de 1960 y 1970, siendo el fenómeno adscrito a la tradición Vieira, caracterizada fundamentalmente por cerámica de manufactura simple. Sin embargo, las últimas publicaciones sobre la temática en el Brasil datan de principios de la década de 1990 (Schmitz et al. 1991); estas fueron realizadas dentro de un marco teórico histórico cultural que aún impera, con variantes y modificaciones, en gran parte de América Latina (Politis 2003). Aproximadamente en la misma época empiezan a sucederse las publicaciones de resultados de los trabajos realizados en el Uruguay, que cuestionan el modelo histórico cultural propuesto por investigadores brasileños. En general se habla de sociedades que habrían alcanzado mayores niveles de integración sociocultural que sus vecinos del área, mediando una creciente densidad de población, planificación de estrategias de subsistencia y control de recursos (Cabrera Pérez 1999).

En el litoral Oeste, la mayor parte de la información procede de sitios ubicados en torno a la desembocadura del Río Negro, estudiados en forma poco sistemática hasta fines del siglo XX (Arredondo 1928; Maruca Sosa 1957; Boretto et al. 1973; Maeso 1977; Castillo 2004 entre otros). En síntesis, los yacimientos arqueológicos remiten a grupos ceramistas, con un patrón de asentamiento basado en la adaptación a ambientes fluviales.

La información cronológica relacionada con la desembocadura del Río Negro es escasa. Es posible, sin embargo, establecer un marco cronológico general para el registro arqueológico de la región: Un análisis de las dataciones radiocarbónicas publicadas por Castillo (2004) y Farias (2005) arroja cuatro agrupaciones de fechas: La más antigua, representada por los sitios Pingüino, Colonia Concordia, El Cerro y una datación de La Blanqueada, cuenta con una media ponderada de  $1803 \pm 32$  a.A.P. La siguiente, representada por varias fechas de La Blanqueada, cuenta con una media ponderada de  $1292 \pm 45$  a.A.P. El tercer *cluster*, representado por los sitios Vizcaíno, Román y Puente, tiene una media de dataciones de  $855 \pm 46$  a.A.P., y las fechas obtenidas para La Yeguada, con una media de  $525 \pm 38$  a.A.P. constituyen la agrupación más reciente. En suma, la cronología actual para el Oeste del Uruguay se extiende, aproximadamente, desde 1850 a 500 a.A.P. para los sitios cerámicos de la desembocadura del Río Negro.

Por otra parte, sobre las costas del Río de la Plata, diversos trabajos revelaron un denso conjunto de sitios arqueológicos en la cuenca del río Santa Lucía; las dataciones radiocarbónicas de capa indican una antigüedad máxima para la mayor parte de estas ocupaciones en el entorno de 2500 a.A.P. (Beovide et al. 2004).

#### 1.4.4. EL REGISTRO ESQUELETAL DE LA REGIÓN PAMPEANA

El análisis genético poblacional empleando ADN antiguo tiene como requisitos principales la disponibilidad de material esquelético de base y una resolución cronológica adecuada del material. A continuación revisaremos estos dos aspectos en cuanto a los tres países que abarca la región pampeana a fin de establecer la factibilidad de un análisis diacrónico de la estructura genética de las poblaciones que la habitaban.

#### 1.4.4.1. URUGUAY

Prácticamente todos los hallazgos de esqueletos del Uruguay se concentran en dos regiones definidas, Este y Oeste. Los restos del Oeste del país fueron recuperados en su mayoría en Salto Grande y en el entorno de la desembocadura del Río Negro, en tanto que los restos del Este están asociados a estructuras monticulares (“cerritos de indios”) de la cuenca de la Laguna Merín. En el caso del Oeste, los restos fueron recuperados en condiciones poco sistemáticas, lo cual dificulta su asociación con los elementos culturales del contexto (Sans 1988). La mayoría de los restos del Este analizados fueron recuperados en condiciones sistemáticas, con contexto y estratigrafía adecuados.

En la *región Oeste* se ubican 12 sitios con restos humanos; Sans (1988) da cuenta de un total de 59 restos con conservación de cráneo y aparato masticador, la mayor parte de ellos parte de colecciones privadas donadas a museos. Sin embargo, el panorama cronológico de la región Oeste es fragmentario: se cuenta con una sola datación sobre estos óseos, de  $1910 \pm 50$  a.A.P. (URU 0311) en el sitio El Cerro en el departamento de Río Negro (Castillo 2004).

En cuanto a la *región Este*, Brum (2008) registra un total de 104 entierros en diez sitios prehistóricos. La mayoría de los restos están enterrados en el interior de “cerritos de indios”, y las características de los entierros han servido de apoyo para la generación de hipótesis en cuanto a la dinámica sociocultural de sus constructores (López Mazz 2001). Sin embargo, la asociación de los restos humanos y las estructuras monticulares indica que la inhumación de individuos en los “cerritos” es una conducta adoptada en forma tardía por parte de los grupos constructores. En forma consistente se observan discrepancias entre las dataciones de los esqueletos y las de las capas de las que fueron recuperados, siendo éstas hasta 2000 años más antiguas (Bracco 2006). El rango cronológico de los entierros, basados en los 11 fechados radiocarbónicos disponibles sobre restos óseos, es de  $1610 \pm 46$  a.A.P. (AA 81800) a  $220 \pm 50$  a.A.P. (URU0014).

#### 1.4.4.2. ARGENTINA

De acuerdo a Barrientos y Pérez (2005), se han registrado 49 sitios arqueológicos con restos humanos en la Pampa suroriental, con un número mínimo estimado de 215 individuos. Se constatan tres series de fechados radiocarbónicos sobre hueso humano: Holoceno temprano final – Holoceno medio inicial (8000-6000 a.A.P.), Holoceno tardío inicial (3500-2000 a.A.P.), y Holoceno tardío final (500-400 a.A.P.), registrándose un hiato de 2500 años entre los primeros dos períodos, y un hiato de 500 años entre los últimos dos. Esta región, correspondiente a la Pampa húmeda, es la que presenta mayor cantidad, resolución cronológica y extensión temporal en los entierros, en tanto que en el resto de la región pampeana, la resolución y extensión temporal son menores. En la Pampa seca se registran inhumaciones con fechados radiocarbónicos que se extienden de  $1029 \pm 43$  hasta  $370 \pm 40$  a.A.P. (Berón 2003). En la provincia de Córdoba, las dataciones sobre hueso ubican el rango temporal de las inhumaciones en el área de  $4525 \pm 20$  a  $328 \pm 58$  a.A.P. Los entierros humanos en el delta del Paraná presentan dataciones que se extienden de  $1420 \pm 80$  a.A.P. hasta  $310 \pm 80$  a.A.P (Bonomo et al. 2011). Por último, los entierros humanos de las provincias de Mendoza y San Luis se asignan al Holoceno tardío por datación radiocarbónica del contexto (Novellino et al. 2004; Fabra y Demarchi 2011).

#### 1.4.4.3. BRASIL

No hay información publicada respecto a fechados radiocarbónicos sobre restos óseos humanos de sitios arqueológicos de Rio Grande do Sul. Considerando que los restos que se analizan en el presente trabajo pertenecen a la manifestación arqueológica de los “cerritos de indios” que también se presenta en el Este del Uruguay, podemos con reservas asignar a los restos de Rio Grande do Sul al mismo marco cronológico, esto es, de  $1610 \pm 46$  a  $220 \pm 50$  a.A.P.

## 1.5. ANÁLISIS GENÉTICOS DE POBLACIONES PREHISTÓRICAS DE LA REGIÓN PAMPEANA

En el correr de las últimas dos décadas se han realizado análisis de restos antiguos de varias regiones de Sudamérica, incluyendo Colombia (Monsalve et al. 1996; Jara et al. 2007; Casas-Vargas et al. 2011), la región amazónica de Brasil (Ribeiro-dos-Santos et al. 1996), Perú (Shimada et al. 2004; Shinoda et al. 2006; Lewis et al. 2007; Kemp et al. 2009; Fehren-Schmitz et al. 2010, 2011), Bolivia (Rothhammer et al. 2003), el norte de Chile (Moraga et al. 2001; Moraga et al. 2005), el Noroeste argentino (Demarchi et al. 2001; Carnese et al. 2010), Patagonia (Demarchi et al. 2001; Crespo et al. 2012; Dejean 2012) y Tierra del Fuego (Lalueza et al. 1997; García-Bour et al. 2004). A la fecha se han realizado tres análisis de muestras de lo que a efectos de este trabajo, y siguiendo el criterio arqueológico, hemos definido como región pampeana:

*Arroyo Seco 2 (Holoceno temprano – Holoceno medio inicial):* Los restos humanos del sitio Arroyo Seco 2, provincia de Buenos Aires, Argentina, han sido asignados a cuatro eventos de inhumación, acotados por fechados radiocarbónicos: los primeros tres entre 7800 y 6300 a.A.P., y el cuarto a 4800-4400 a.A.P. (Politis et al. 2013 en prensa). El primer análisis de ADN de restos de Arroyo Seco 2 es el realizado por Demarchi et al. (2001) de tres individuos de este sitio, determinando la presencia de la delección de 9 pb que define al haplogrupo B, no detectándose la delección en ninguno de los individuos analizados.

Posteriormente, logramos extraer ADN y establecer el haplogrupo de 8 individuos de un total de 22 analizados; todos estaban asignados a alguno de los tres eventos más antiguos, y sus frecuencias de haplogrupos fundadores indígenas A (n = 0), B (n = 3), C (n = 4) y D (n = 1) fueron comparadas con las de otras poblaciones de América (Figueiro 2006). Este análisis constituyó el primer estudio sobre la frecuencia de los cuatro haplogrupos fundadores en la población prehistórica de la región pampeana argentina, y la muestra más antigua de la región pampeana en general. El conjunto de los análisis comparativos de la muestra con muestras modernas de la porción sur de Sudamérica arrojó una agrupación significativa basada en la latitud, y asociada con la presencia/ausencia del haplogrupo A, así como una relación de similitud a nivel de frecuencias con los esqueletos analizados hasta la

fecha del Este uruguayo. Se infirió a partir de estos análisis que las poblaciones pampeanas del Holoceno temprano eran posibles representantes de un *stock* común que habría poblado el Cono Sur sudamericano en el límite Pleistoceno-Holoceno, y de las cuales en principio serían descendientes las poblaciones del sur de Chile, Tierra del Fuego y Patagonia, caracterizadas por la baja o nula frecuencia del haplogrupo A y frecuencias bajas a intermedias del haplogrupo B (Figueiro 2006; Figueiro y Sans 2007).

*Uruguay (Holoceno tardío):* En un estudio preliminar realizado sobre ADN extraído de esqueletos recuperados en sitios arqueológicos del Departamento de Rocha, con fechados de entre 2000 y 400 años A.P., se secuenció la región hipervariable I de 5 individuos; 4 de ellos pudieron ser incluidos en los haplogrupos previamente establecidos, perteneciendo 3 al haplogrupo C y 1 al haplogrupo B (Bertoni et al. 2004). Por añadidura, dos de los individuos de haplogrupo C, recuperados en el mismo sitio, mostraron pertenecer al mismo linaje. Este linaje fue hallado también en el Charrúa Vaimaca Perú y en poblaciones modernas, resultado que ya se discutió a propósito de la continuidad en el componente indígena de la población uruguaya (supra, p. 26). Sans y Figueiro (2009) dan cuenta de un total de 7 individuos prehistóricos analizados en el Este, con un predominio de los haplogrupos B y C (A=1, B=3, C=3), situación análoga a la registrada en diversas muestras de la población uruguaya actual (Bonilla et al. 2004; Sans et al. 2006).

*Córdoba (Holoceno tardío):* El primer análisis de restos prehistóricos de Córdoba es el realizado por Demarchi et al. (2001) de un individuo de Pampa de Olaén, del Holoceno tardío final. El trabajo, que analizaba únicamente la presencia de la delección de 9 pb que define al haplogrupo B, determinó su ausencia en este individuo. Más recientemente, Nores y Demarchi (2011) analizaron 35 muestras precolombinas de un rango de antigüedad de  $3360 \pm 20$  a.A.P. a  $345 \pm 20$  a.A.P. Sus resultados indican un aumento a lo largo del tiempo en los haplogrupos C y D que habrían comenzado a incrementarse en frecuencia antes de la conquista, predominando en la población actual de la provincia (García y Demarchi 2006). Asimismo, los análisis muestran una diferencia entre las frecuencias de haplogrupos de las

poblaciones precolombinas y las actuales, indicativa de una interrupción de la estructura genética posterior al contacto con el europeo.

\* \* \*

La presente investigación pretende, mediante el análisis de ADN antiguo de restos de muestras de diferentes sitios y cronologías de la región pampeana, continuar con la generación de datos que comenzara con los análisis de las muestras del Este Uruguayo y de Arroyo Seco 2 (Bertoni et al. 2004; Figueiro 2006; Figueiro y Sans 2007) y que se está desarrollando en Argentina, tanto en lo referente a la región pampeana (Nores y Demarchi 2011) como a otras áreas, como el Noroeste y la Patagonia (Carnese et al. 2010; Dejean 2012). Se pretende en este trabajo ampliar el rango temporal y espacial, así como la resolución de los datos disponibles, procurando con los mismos poner a prueba algunos planteos existentes a propósito de las interacciones interpoblacionales de las distintas áreas de la región pampeana entre sí y con regiones vecinas.

## 2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

### 2.1. OBJETIVOS

#### 2.1.1. OBJETIVO GENERAL

Analizar la variación espacial y temporal de la poblaciones humanas de la región pampeana durante el Holoceno, mediante el uso de ADN mitocondrial.

#### 2.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Extraer ADN de cuatro muestras de humanos prehistóricos espacial y temporalmente acotadas:
  - a) Muestras de la región pampeana argentina datadas en el Holoceno temprano final - Holoceno medio inicial (8000-6300 a.A.P.) y tardío inicial (2300 a.A.P.);
  - b) Muestras de los litorales Este y Oeste del territorio uruguayo, con dataciones que las ubican en el Holoceno tardío (2000-400 a.A.P.);
  - c) Muestras del Estado de Rio Grande do Sul, adscriptas al Holoceno tardío.
- 2) Determinar haplogrupo, subhaplogrupo y linajes maternos de las muestras mediante el análisis de ADN mitocondrial por polimorfismos de restricción y secuencias de la región hipervariable I (HVRI).
- 3) Analizar las afinidades de las muestras en términos de frecuencias de haplogrupos indígenas fundadores, entre sí y con respecto a poblaciones antiguas y modernas del Cono Sur sudamericano.
- 4) Comparar los linajes definidos por secuencias en las muestras antiguas con linajes modernos de las poblaciones actuales de Argentina, Uruguay y el sur de Brasil, en busca de afinidades intra- e interregionales que puedan deberse a identidad o similitud por ascendencia.

- 5) Analizar la distribución geográfica de los linajes compartidos entre las muestras antiguas y modernas, procurando reconstruir en cada caso historias de dispersión de linajes o contacto prehistórico de poblaciones.
- 6) Elaborar una trayectoria diacrónica de la microevolución de las poblaciones pampeanas durante el Holoceno, empleando como ejes fundamentales los conceptos de continuidad/cambio y aislamiento/contacto, sobre los datos comparativos obtenidos a partir de las muestras antiguas y modernas.

## 2.2. HIPÓTESIS

Si bien el presente trabajo es fundamentalmente exploratorio, el registro arqueológico de las distintas áreas de la región pampeana da cuenta de un aumento en la densidad poblacional y en los contactos interpoblacionales en el Holoceno final, inmediatamente antes de la llegada del europeo. Sobre esa base, podemos formular una hipótesis nula y por lo menos dos hipótesis de trabajo alternativas para orientar nuestra investigación:

La *hipótesis nula*  $H_0$  del presente estudio es que, durante la mayor parte del Holoceno, el conjunto de las subpoblaciones de la región pampeana se constituyeron como una unidad aislada respecto a otras poblaciones fuera del área. Estas poblaciones mantuvieron un flujo génico constante entre sí a partir del Holoceno temprano, pero no con regiones vecinas. Esto habría implicado que, más allá de eventuales adaptaciones culturales locales, cada una de las poblaciones sea indistinguible a nivel de haplogrupos y linajes de un *pool* génico general para la región. Esta hipótesis supone la imposibilidad de distinguir a las muestras locales analizadas entre sí, y su clara distinción respecto a las poblaciones de regiones vecinas.

Las *hipótesis alternativas* planteadas son dos, ubicadas en los extremos un continuo de posibilidades respecto al origen y dirección del eventual flujo génico previo al Holoceno tardío final:

$H_1$ : Las poblaciones consideradas para la región pampeana evolucionaron en forma independiente, sin flujo génico entre sí o con regiones vecinas. Esta hipótesis supone la ruptura de la homogeneidad propuesta para el poblamiento inicial del área, y el recorrido de caminos microevolutivos diferentes en cada una de las áreas. El hallazgo de una diferencia significativa en las frecuencias de haplogrupos y las características de los linajes presentes en las muestras analizadas confirmaría esta hipótesis.

$H_2$ : Hubo una diferenciación neta de las áreas locales consideradas para la región, debida a la limitación del flujo génico entre las poblaciones pampeanas y al ingreso de variantes nuevas a cada una de las mismas, provenientes de poblaciones en la vecindad inmediata fuera de la región pampeana. Esta hipótesis se confirmaría en caso de observarse disimilitud de las muestras analizadas entre sí, y la semejanza de cada una con áreas vecinas, siguiendo vectores cardinales. En el caso de completo aislamiento entre las áreas muestreadas, los orígenes del flujo serán el sur y el oeste en el caso del sudeste de la provincia de Buenos Aires, el norte en el caso del litoral Atlántico, y norte y oeste en el caso del litoral del río Uruguay.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. MUESTRA

##### 3.1.1. INDIVIDUOS PREHISTÓRICOS ANALIZADOS

La muestra prehistórica analizada comprende un total 89 muestras correspondientes a 83 restos humanos, provenientes de los sitios listados en la tabla 3.1. La información respecto a la cronología de los restos y el tipo de muestra analizada se detalla en la tabla 3.2.

Tabla 3.1: Listado de los sitios muestreados (ver localización en la figura 3.1).

<b>País</b>	<b>Región</b>	<b>Sitio</b>	<b>N</b>	<b>Total</b>
Uruguay	Oeste	Estancia "El Cerro"	3	17
		Campo Morgan	1	
		Los Cardos	2	
		Colonia Concordia	10	
		Arroyo Yaguareté	1	
	Este	CH2D01	12	19
		CG14E01	6	
Puntas del San Luis		1		
Argentina	Provincia de Buenos Aires	Arroyo Seco 2	24	32
		Laguna Tres Reyes 1	7	
	Córdoba		2	2
Brasil	Rio Grande do Sul	RS-A-34	12	14
		RS-LS-85	2	
<b>TOTAL</b>				<b>83</b>

Tabla 3.2. Detalle de las muestras analizadas, agrupadas por región y período.

Sitio	Individuo	Material	Cronología
<i>Uruguay (Oeste), Holoceno tardío</i>			
Estancia "El Cerro"	1	Metacarpo	1803 ± 32 a.A.P.
	2	Molar	
	2B	Falange	1910 ± 50 a.A.P.
Campo Morgan	15736	Metatarso	1275 ± 50 a.A.P.
Los Cardos	1	Falange	1500 d.C.
	2	Metatarso	
Colonia Concordia	37974	Molar	1803 ± 32 a.A.P.
	41101	Metacarpo	
	47992	Molar	
	47994	Falange	
	47996	Molar	
	47996 A	Molar	
	47996 B	Molar	
	55961	Falange	
	55968	Metacarpo	
	51983	Molar	
Arroyo Yaguareté	1	Molar	1500 d.C.
		Diáfisis	
<i>Uruguay (Este), Holoceno tardío</i>			
CH2D01-A	2	Falange	250 a.A.P.
	3	Falange	240 ± 40 a.A.P.
	4	Molar	
	12	Falange	1700 a.A.P.
		Costilla	
	13	Molar	
		Costilla	
	16	Molar	
	17	Molar	
	18A	Diáfisis	1350 a.A.P.
	18B	Costilla	
	19A	Molar	1700 a.A.P.
		Molar	
20	Molar	1610 ± 46 a.A.P.	
		Metacarpo	
CH2D01-B	B-IV	Molar	1090 a.A.P.
Puntas de San Luis	sub. II	Molar	1360 ± 100 a.A.P.

(\*) Cronología obtenida por fechado radiocarbónico directo. (\*\*) Cronología obtenida por fechado radiocarbónico del contexto. (\*\*\*) Cronología obtenida por extrapolación de datos cronológicos de sitios vinculados. (\*\*\*\*) Cronología obtenida por asociación con elementos de contacto (cuentas de vidrio; (Cabrera Pérez 2004) Las dataciones de los individuos 3 y 4 de CH2D01-A, y de los individuos 3 y 4 de CG14E01, son las medias ponderadas de dos pares de dataciones cuya asignación individual es confusa (Bracco 2006 y R. Bracco, comunicación personal).

Tabla 3.2. (continuación)

Sitio	Individuo	Material	Cronología
<i>Uruguay (Este), Holoceno tardío</i>			
CG14E01	1	Molar	800 a.A.P.
	3	Molar	840 ± 50 a.A.P.
	4	Molar	
	9	Molar	1600 d.C.
		Falange	
	13	Canino	1800 a.A.P.
Costilla			
Urna	Molar	1600 d.C.	
<i>Región pampeana argentina, Holoceno temprano/medio inicial</i>			
Arroyo Seco 2	1	Costilla	6560-6230 a.A.P.
	2	Costilla	
	4	Metacarpo	
	5	Costilla	
	6	Costilla	6560 ± 60 a.A.P.
	7	Costilla	6262 ± 46 a.A.P.
	8	Costilla	4578 a.A.P.
	14	Costilla	6868 ± 73 a.A.P.
	19	Costilla	6860 ± 60 a.A.P.
	20	Costilla	6940 a.A.P.
	24	Costilla	7800 ± 115 a.A.P.
	27	Costilla	6940 a.A.P.
	39	Metacarpo	7625 a.A.P.
	43	Premolar	
44	Costilla		
<i>Región pampeana argentina, Holoceno tardío</i>			
Tres Reyes 1	1	Costilla	2245 ± 55 a.A.P.
	2	Costilla	2245 a.A.P.
	4	Costilla	
	6	Metacarpo	
	8	Costilla	
	9	Costilla	
10	Metacarpo	2470 ± 70 a.A.P.	
Córdoba (Agroalfarero)		Esternón	< 2000 a.A.P.
Córdoba (Holoceno medio/tardío)		Metacarpo	3500-2000 a.A.P.
<i>Rio Grande do Sul, Holoceno tardío</i>			
RS-A-34	4372 – A	Molar	2500-200 a.A.P.
	4372 – B	Premolar	
	4372 – C	Astrágalo	
	4372 – D	Astrágalo	
	4372 – E	Astrágalo	
	4372 – F	Astrágalo	
	4372 – G	Calcáneo	
	4372 – H	Falange	
	4372 – I	Falange	
	4372 – J	Falange	
	4372 – K	Falange	
	s/etiqueta	Incisivo	
RS-LS-85	629	Falange	2500 a.A.P.
	630	Falange	

### 3.1.2. ELECCIÓN DE LAS PIEZAS

En el presente trabajo se prefirió el empleo de hueso (fundamentalmente falanges, metacarpos y fragmentos de costilla) al de dientes como material de base para la extracción de ADN. Sesenta y dos (70%) de las 89 piezas empleadas fueron huesos, en tanto que 27 (30%) fueron dientes (Tabla 3.2). De acuerdo a Pilli et al. (2013) el diente ofrece menores posibilidades de contaminación por manipulación al ser menos permeable y más fácilmente lavable, por lo que se recomienda su empleo al trabajar con especímenes de museo. Las desventajas fundamentales del uso de dientes son su tamaño, siendo limitada la masa de tejido a partir de la cual se trabaja, y su valor percibido frente a otros huesos debido a la amplitud de análisis que pueden hacerse sobre los mismos en términos de dieta (macro- y microdesgaste, cálculos), estatus sanitario (infecciones, hipoplasia del esmalte), relaciones genéticas (rasgos discontinuos) y prácticas culturales (Buikstra y Ubelaker 1994).

### 3.1.3. CARACTERÍSTICAS ARQUEOLÓGICAS DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS

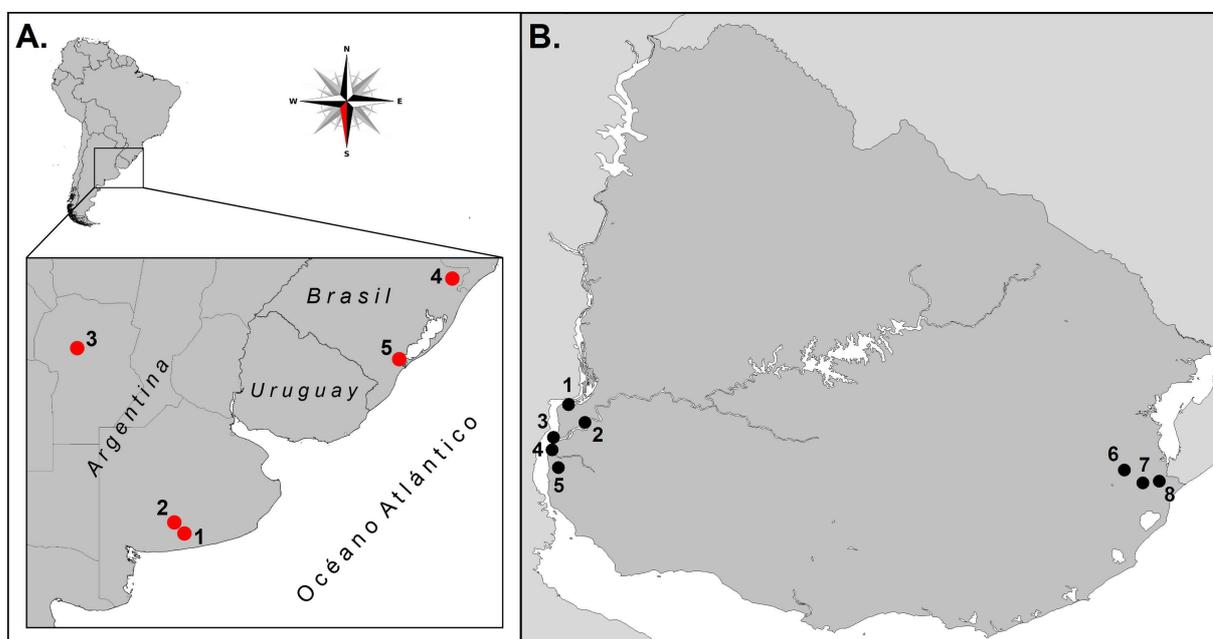


Figura 3.1: Localización de los restos humanos prehistóricos analizados en este trabajo. A) Sitios fuera de Uruguay: 1- Arroyo Seco 2; 2- Laguna Tres Reyes 1; 3- Córdoba; 4- RS-A-34; 5- RS-LS-85. B) Sitios del Uruguay (modificado de Figueiro 2013 en prensa – Anexo II-C): 1: Arroyo Yagureté. 2: El Cerro. 3: Campo Morgan. 4: Los Cardos. 5: Colonia Concordia. 6: Puntas del San Luis. 7: CG14E01 “Isla Larga”. 8: CH2D01.

### 3.1.3.1. URUGUAY

Prácticamente todos los hallazgos de esqueletos del Uruguay se concentran en dos regiones definidas: Oeste, la mayoría en torno a la desembocadura del Río Negro, y Este, en la cuenca de la Laguna Merín. La mayor parte de los esqueletos recuperados en el Oeste y la totalidad de los restos del Este están asociados a estructuras monticulares (que en el Este de Uruguay se conocen con el nombre de “cerritos de indios”).

#### 3.1.3.1.1. SITIOS MUESTREADOS DE LA REGIÓN OESTE

*Estancia “El Cerro”*: Ubicado sobre la margen derecha del Río Negro, a la altura de las islas Dos Hermanas, el sitio es descrito en Boretto et al. (1973). El material recuperado por el Museo Municipal de Historia Natural de Río Negro fue retomado en tiempos recientes, primero por Castillo (2004) y más recientemente por Gascue et al. (2011b). En el transcurso de la revisión de los materiales se obtuvo un fechado radiocarbónico del individuo etiquetado 2B, de  $1910 \pm 50$  a.A.P. (URU 0311) (Castillo 2004), siendo la única referencia cronológica para este sitio. Se analizaron restos de tres individuos adultos de este sitio, etiquetados como 1, 2 y 2B.

*Campo Morgan*: Ubicado en Río Negro frente a la Isla del Vizcaíno, fue excavado en forma asistemática por Carlos Maeso (Maeso 1977). Se carece de información cronológica para este sitio, aunque Maeso reporta el hallazgo de alfarería con apéndices zoomorfos, largamente asociados en la escuela clásica a los “ribereños plásticos” (*sensu* Serrano 1972). Se analizaron los restos del individuo etiquetado 15736, bajo cuidado del Museo Nacional de Antropología en Montevideo.

*Los Cardos*: El sitio, ubicado en la margen sur del Río Negro, fue excavado en 1986 y descrito por Toscano (en Gascue et al. 2011a). En el mismo se hallaron restos óseos muy fragmentados que fueron asignados a tres individuos por Erchini (en Gascue et al. 2011a), dos de los cuales son analizados en este trabajo. En el sitio se halló un botón de hueso de

tradición europea, que llevó a la especulación sobre la posibilidad de un contexto de contacto hispano-indígena.

*Colonia Concordia*: También conocido como Cañada Saldaña, es un túmulo ubicado en Soriano, a orillas del río Uruguay. Excavado por Oliveras en la década de 1950, en la que se recuperaron decenas de esqueletos, incluyendo un individuo infantil (Maruca Sosa 1957). Si bien se mandaron muestras a datar en 1956, las limitaciones del método en la época impidieron darle una cronología. Castillo (2004) obtuvo dos fechados radiocarbónicos de materiales del sitio, de  $1840 \pm 100$  y  $1780 \pm 70$  a.A.P. Se analizan los restos de 10 individuos en este trabajo, bajo el cuidado del Museo Nacional de Antropología.

*Yaguareté*: Situado al 3km al norte de Fray Bentos, es descrito por Boretto et al. (1973), quienes definen una nueva fase a partir de la cerámica del sitio, que consideran comparable con la hallada en la isla Martín García, datada en aproximadamente 1500 d.C. En Castillo (2004) se describen los restos de un individuo adulto, que se analiza en este trabajo.

#### 3.1.3.1.2. SITIOS MUESTREADOS DE LA REGIÓN ESTE

Los restos analizados provienen de excavaciones sistemáticas realizadas en el transcurso de los últimos 15 años del siglo XX. Los tres sitios muestreados, ubicados en el departamento de Rocha, son los siguientes:

*CH2D01*: El sitio se ubica en la porción norte del Bañado de San Miguel, sobre un tributario del arroyo homónimo. La superficie total del sitio se estimó en 2 hectáreas, siendo su principal rasgo dos estructuras monticulares, de 1,4 y 1,2 m de altura, denominados respectivamente montículo A y montículo B (Curbelo et al. 1990). De ambos montículos fueron recuperados entierros primarios, secundarios e indeterminados, totalizando 17 individuos en el montículo A y 6 en el montículo B (Sans 1999).

La cronología de CH2D01 sitúa la capa más antigua del montículo A en una edad de  $2090 \pm 90$  a.A.P. (KR139) y la más reciente en  $340 \pm 115$  a.A.P. (AC1199). No obstante, el uso

del sitio para inhumaciones en épocas más recientes queda evidenciado por los fechados radiocarbónicos de dos entierros en las capas más recientes, datados en  $290 \pm 75$  (URU0019) y  $220 \pm 50$  a.A.P. (URU0014) (Bracco 2006). La datación directa sobre esqueleto más antigua del montículo A corresponde al individuo 20, fechado en  $1610 \pm 46$  a.A.P. (AA 81800). Los fechados radiocarbónicos del montículo B se extienden de  $2530 \pm 60$  a.A.P. en la capa V (URU0022) a  $1090 \pm 70$  a.A.P. en la capa II (URU0024). De esta última capa provienen los restos humanos recuperados, y el único esqueleto fechado es coherente en edad con la capa, con una datación de  $980 \pm 100$  a.A.P. (URU0192).

Varios esqueletos de este sitio, al cuidado del Departamento de Antropología Biológica (FHCE-UdelaR) fueron analizados en el marco del montaje y puesta a punto del laboratorio de ADN antiguo en 2001, con la publicación de los resultados de tres individuos (Bertoni et al. 2004). En el correr de este trabajo se analizaron 12 muestras de este sitio, 11 del montículo A y 1 del montículo B. De los 11 individuos del montículo A, 9 fueron extraídos por Bernardo Bertoni; los resultados de los tres individuos publicados fueron tomados para este trabajo, y los 6 extractos restantes fueron analizados para ser incluidos en la muestra. Algunos de los resultados fueron publicados en el transcurso del desarrollo de este trabajo de Tesis (Sans et al. 2012 – Anexo II-B).

*CG14E01 "Isla Larga"*: Ubicado en el extremo occidental de la Sierra de San Miguel, dentro de un área de monte nativo denso, el sitio fue investigado por primera vez por investigadores del Museo de Historia Natural de Montevideo en 1975 al ser reportado el hallazgo de una urna Tupiguaraní en el mismo. Veinte años después, las investigaciones fueron retomadas, realizándose una excavación en el centro del cuerpo del "cerrito" (Cabrera Pérez et al. 2000), en áreas circundantes (Cabrera Pérez y Marozzi 2001) y ampliando la excavación de 1975 (Cabrera Pérez 2004).

El sitio está dominado por un "cerrito" de una altura de 3,5 metros aproximadamente, cuyo estrato fundacional, directamente sobre la roca de la Sierra, está datado en  $3630 \pm 60$  a.A.P. (URU0142). Las dataciones radiocarbónicas más recientes del montículo son las de dos entierros primarios recuperados en la zona central, con una media ponderada de  $840 \pm 50$  a.A.P. (URU0188 y URU0189) mostrando una discrepancia de 1000

años con los fechados de la capa en la que se hallaron (Bracco 2006). Sin embargo, el momento de uso más reciente de la estructura está marcada por el hallazgo de una segunda urna tupiguaraní, con restos de dos individuos, asociada a cuentas de vidrio del siglo XVII. Fueron analizados los restos, cedidos por Leonel Cabrera Pérez (FHCE-UdelaR), de 6 individuos de este sitio, incluyendo los dos entierros primarios ya mencionados, uno de los individuos depositados en la urna y otro individuo hallado en las cercanías de la urna y probablemente asociado con la misma. Los extractos de estos individuos fueron realizados en 2001 por B. Bertoni, uno de ellos publicado (Bertoni et al. 2004) y los restantes retomados para este trabajo.

*Puntas de San Luis (PSL)*: Ubicado en la margen derecha del río San Luis en el departamento de Rocha, está compuesto por 15 estructuras monticulares de alturas que van desde 1 a 4,2 metros. Las dataciones radiocarbónicas disponibles (Bracco 2006) otorgan para el sitio una cronología que se extiende de  $4280 \pm 200$  a.A.P. (URU0157) a  $1410 \pm 54$  a.A.P. Esta última es la media ponderada de tres dataciones sobre restos óseos humanos (URU0092, URU0132 y URU0133), que presentan una discrepancia de más de 2000 años con la capa en la que se hallan.

Las inhumaciones en el sitio PSL corresponden a 9 individuos, uno enterrado en forma primaria y ocho secundarios. Cuatro de ellos corresponden a piezas aisladas, clasificadas como inhumaciones intencionales y cuatro son estructuras craneales con elementos de postcráneo asociados y marcas de modificación antrópica semejantes a las marcas de desuello y descarnado de la literatura norteamericana, lo que los haría evidencia de conflicto intra- o intergrupales en el área arqueológica considerada (Pintos y Bracco 1999). Se analizaron en esta muestra los restos de uno de los entierros parciales descriptos, en tanto que otro de los restos no se consideró viable para análisis. Ambas muestras fueron cedidas por Roberto Bracco (FHCE-UdelaR).

### 3.1.3.2. ARGENTINA

En la muestra del presente trabajo se cuenta con restos del Holoceno temprano final-Holoceno medio inicial (8000-6000 a.A.P.) y Holoceno tardío inicial (3500-2000 a.A.P.), provenientes de los siguientes sitios arqueológicos en el área interserrana bonaerense :

*Arroyo Seco 2*: El sitio 2 de la Localidad Arqueológica Arroyo Seco se encuentra localizado a los 38° 21' 38" de latitud Sur, y a los 60° 14' 39" de longitud Oeste, en proximidades de la ciudad de Tres Arroyos, en la provincia de Buenos Aires. En el mismo se han exhumado hasta el momento un total de 44 individuos enterrados tanto de manera primaria como secundaria, en entierros simples y múltiples. Todos los entierros han sido asignados al Holoceno temprano y Holoceno medio a partir de un total de 25 fechados radiocarbónicos directos sobre un mínimo de 18 individuos, que se agrupan de la siguiente forma (Politis et al. 2013 en prensa): grupo 1: media ponderada  $7662 \pm 40$  años AP; grupo 2: media ponderada  $6929 \pm 40$  años AP; grupo 3: media ponderada  $6459 \pm 51$  años AP y grupo 4: media ponderada  $4578 \pm 38$  AP. Estas agrupaciones representan períodos, de duración variable, durante los cuales el sitio funcionó como un área para la disposición de cadáveres, lo cual no necesariamente descarta un posible uso continuo del mismo.

En un trabajo anterior (Figueiro 2006) se pudo extraer ADN y establecer el haplogrupo de 8 individuos de un total de 22 analizados (ver *supra*, p. 43), que fueron retomados en procura de datos de mayor resolución. Asimismo, se intentó la reextracción de ADN de 5 individuos (AS01, AS07, AS08, AS14 y AS39) que en el análisis original no habían dado resultados utilizables, y se añadieron dos individuos (AS06 y AS42) que no habían estado disponibles previamente. Esto totaliza 15 individuos procesados a lo largo del período comprendido en esta Tesis, sin embargo en virtud de que los resultados de Figueiro (2006) serán incluidos en los resultados y se emplearán en los análisis comparativos, se considera como 24 (los 22 individuos originales más los dos analizados por primera vez) el número total de individuos para este trabajo.

*Laguna Tres Reyes 1:* La Laguna Tres Reyes es un cuerpo de agua permanente de aproximadamente 450 hectáreas, situado a 38°56' de latitud Sur y 60°34' de longitud Oeste. De los dos sitios arqueológicos definidos en la década de 1980 en la laguna, el sitio denominado Tres Reyes 1, a 56km de Arroyo Seco 2, fue excavado en tres ocasiones, en 1981, en 1986-1987 y en 1994-1995. Fue en esta última excavación que se recuperaron los restos de 10 individuos; se determinó que se trataba de entierros primarios, uno de los cuales (TR1-10) había sido realizado en un momento anterior al de los nueve individuos restantes (TR1-1 a TR1-9) que habrían sido enterrados simultáneamente. Los fechados radiocarbónicos ( $2245 \pm 55$  a.A.P. para TR1-1 y  $2470 \pm 70$  para TR1-10) apoyan esta afirmación. Se analizaron 6 individuos de los 10 comprendidos por la muestra total del sitio, cedidos (al igual que las piezas del sitio Arroyo Seco 2) por Gustavo Politis, de la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires.

*Provincia de Córdoba:* Se analizaron dos individuos prehistóricos de Córdoba, provenientes de colección y cedidos por Alberto Marcellino, de la Universidad Nacional de Córdoba, que fueron adscriptos originalmente a los períodos “Holoceno medio/tardío” y “agroalfarero”. La edad mínima de esta última muestra, basada en los comienzos de la adopción de la agricultura en el área, sería de 2000 años (Laguens y Bonnin en Nores y Demarchi 2011).

### 3.1.3.3. BRASIL

Fueron analizados restos de dos sitios con “cerritos” del estado de Rio Grande do Sul. La primera muestra, de restos de 12 individuos cedida por Pedro Ignacio Schmitz (Universidade do Vale do Rio dos Sinos), proviene del sitio RS-A-34, ubicado en el norte del estado. Se carece de información contextual y cronológica del sitio; el rango cronológico general de los fechados publicados para los sitios con “cerritos” de esta región es de  $2435 \pm 85$  a.A.P. (SI1006) a  $200 \pm 80$  a.A.P. (SI1191) (Schmitz 1973). Eventualmente, y de acuerdo a lo expuesto respecto a los restos esqueléticos de sur de Brasil (*supra*, sección 1.4.4.3)

podemos asignar a los restos la cronología establecida por las dataciones uruguayas, esto es, de 1650 a 270 a.A.P. aproximadamente.

Del segundo sitio, RS-LS-85, ubicado en el municipio de Rio Grande en el sur del estado de Rio Grande do Sul, fueron recuperados dos entierros en 2001; los restos identificados en laboratorio pudieron atribuirse a tres individuos diferentes (Pereira 2012). Una revisión documental permitió identificar el sitio como el que había sido registrado por P. I. Schmitz como RS-RG-21, al que se atribuye la datación de  $2435 \pm 85$  a.A.P. mencionada anteriormente. Se analizaron restos de los individuos rotulados 629 y 630, correspondientes a los entierros primarios identificados en el campo y cedidos por María Elida Farías (Universidade Federal do Rio Grande).

### 3.1.4. MUESTRA COMPARATIVA

#### 3.1.4.1. URUGUAY

##### 3.1.4.1.1. FRECUENCIAS DE HAPLOGRUPOS AMERICANOS DE URUGUAY

Para realizar adecuadamente una comparación entre los datos obtenidos de la muestra prehistórica y las poblaciones actuales, se compiló la casi totalidad de la información disponible, publicada e inédita, de ADNmt de la población uruguaya. Las frecuencias de haplogrupos fueron compiladas de trabajos de carácter local (Bonilla et al. 2004; Gascue et al. 2005; Sans et al. 2006) o de alcance nacional (Pagano et al. 2005), así como de datos inéditos. El número concreto de poblaciones para las que se dispone de frecuencias de haplogrupos es reducida, ya que si bien se realizaron estudios de alcance nacional, los tamaños muestrales por departamento fueron relativamente pequeños, lo cual impidió el cálculo de frecuencias representativas.

Tabla 3.3: Frecuencias de haplogrupos indígenas en poblaciones modernas del Uruguay. Los porcentajes entre paréntesis corresponden al porcentaje del haplogrupo dentro de la porción de la muestra con ascendencia indígena.

Población	N total	% indígena	A	B	C	D	Ref.
Artigas	70	64%	7 (15,6%)	21 (46,7%)	9 (20,0%)	8 (17,8%)	[1]
Cerro Largo	117	32%	8 (21,6%)	14 (37,8%)	12 (32,4%)	3 (8,1%)	[2]
Tacuarembó	100	62%	13 (21,0%)	21 (33,9%)	20 (32,3%)	8 (12,9%)	[3]
Montevideo	108	20%	8 (36,4%)	7 (31,8%)	4 (18,2%)	3 (13,6%)	[4]
Uruguay (general)	120	35,0%	2 (4,8%)	18 (42,8%)	13 (31,0%)	9 (21,4%)	[5]
Uruguay (general)	417	34,3%	39 (27,3%)	42 (29,4%)	42 (29,4%)	20 (13,9%)	d.i.
Total	932	37,7%	77 (22,0%)	123 (35,0%)	100 (28,5%)	51 (14,5%)	

Referencias: [1] Sans et al. (en preparación); [2] Sans et al. (2006); [3] Bonilla et al. (2004); [4] Gascue et al. (2005); [5] Pagano et al. (2005); d.i.: datos inéditos.

### 3.1.4.1.2. SECUENCIAS DE LA REGIÓN HIPERVARIABLE I DE URUGUAY

El conjunto de secuencias de la región hipervariable I de los haplogrupos A, B, C y D (concretamente, los haplogrupos americanos A2, B2, C1 y D1) de la muestra suma 252 individuos (A2 = 53, B2 = 86; C1 = 74; D1 = 39) muestreados en estudios locales o de alcance nacional (Bonilla et al. 2004; Pagano et al. 2005; Figueiro et al. 2011; Sans et al. 2011 y datos sin publicar). Debe destacarse que el número de secuencias indígenas disponibles no se corresponde a la frecuencia absoluta de individuos de ascendencia indígena en la muestra total nacional (Tabla 3.3) por dos motivos. En primer lugar, no todas las muestras haplotipadas cuentan con secuencia: en el caso de Tacuarembó (Bonilla et al. 2004) se secuenció una fracción de la muestra indígena, la muestra de Montevideo (Gascue et al. 2005) fue analizada únicamente por polimorfismos de restricción, y el segmento secuenciado en la muestra de Cerro Largo (Sans et al. 2006) no comprendía la totalidad de la HVRI, por lo que no fue considerada en este trabajo. En segundo lugar, en el control de calidad de las secuencias, unas pocas presentaron ambigüedades o mutaciones que hacía dudosa su filiación nativa, por lo que se las eliminó de la muestra.

### 3.1.4.2. AMÉRICA DEL SUR

#### 3.1.4.2.1. FRECUENCIAS DE HAPLOGRUPOS INDÍGENAS EN POBLACIONES DEL CONO SUR

Para el análisis de frecuencias, los datos a nivel comparativo a nivel de poblaciones antiguas (Tabla 3.4; figura 3.2A) y poblaciones modernas (Tabla 3.5; figura 3.2B) fueron seleccionados con los siguientes criterios:

1) Siendo las frecuencias de haplogrupos datos de baja resolución, la semejanza en frecuencias a largas distancias no es necesariamente debida a ancestría común o flujo génico. Por ende, se optó por emplear datos de poblaciones relativamente próximas en el subcontinente. En forma arbitraria, se optó por incluir solamente poblaciones del Cono Sur descartando poblaciones a latitudes menores a 15°S.

2) Se seleccionaron cuatro muestras de *poblaciones antiguas*, compuestas en todos los casos por muestras más pequeñas de varios sitios y colecciones arqueológicas, que fueron fusionadas a fin de obtener un tamaño de muestra de alrededor de 25 individuos. Es relevante mencionar que la muestra de poblaciones fueguinas (en la actualidad extintas en su mayoría) es reciente, no superando una antigüedad de 200 años. Fue seleccionada porque su tamaño muestral supera (con iguales frecuencias de haplogrupos) a la única muestra moderna existente (Moraga et al. 2000).

Tabla 3.4: Poblaciones antiguas empleadas en el análisis comparativo de la muestra de ADN antiguo.

País / Región	N	A	B	C	D
Córdoba	35	22,9%	25,7%	34,3%	17,1%
Noroeste argentino	47	40,4%	23,4%	10,6%	25,5%
Patagonia	40	17,5%	0,0%	45,0%	37,5%
Tierra del fuego	68	0,0%	0,0%	48,5%	51,5%

Referencias: Córdoba: Nores y Demarchi (2011). Noroeste argentino: Carnese et al. (2010); Mendisco et al. (2011); Postillone et al. (2012). Patagonia: Crespo et al. (2012); Dejean (2012). Tierra del Fuego: Lalueza et al. (1997); García-Bour et al. (2004).

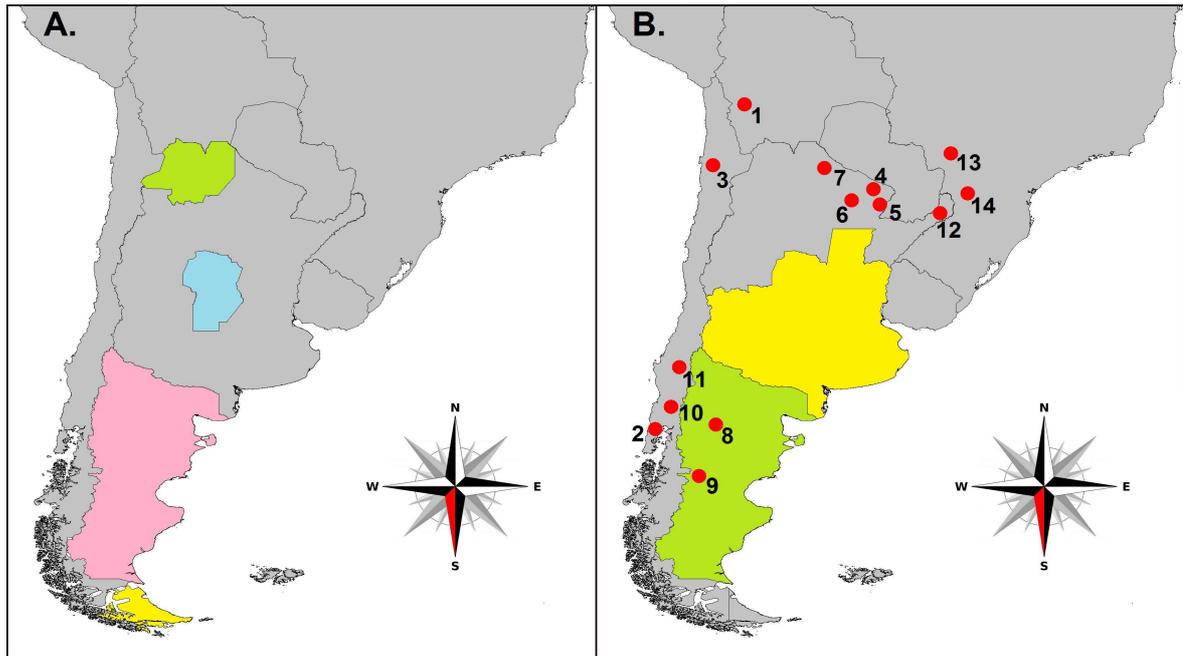


Figura 3.2: Localización geográfica de las poblaciones empleadas en el análisis comparativo. A: Poblaciones antiguas. Celeste – Córdoba; verde – Noroeste argentino; rosado – Patagonia; amarillo – Tierra del Fuego. Todas las muestras se componen de restos de varios sitios arqueológicos ubicados en las áreas señaladas. B: Poblaciones modernas. Los puntos señalan muestras localizadas (ver numeración en tabla 3.5), en tanto que las áreas sombreadas corresponden a muestras compuestas por individuos de varias localidades (Amarillo – Pampa; verde – Patagonia).

3) En la medida de lo posible, los datos incluidos de poblaciones modernas son únicamente de grupos nativos, y no de poblaciones mestizadas – entendiendo por población mestizada aquella definida genéticamente por la amalgama de poblaciones de distinto origen, y culturalmente por la pérdida de identidad indígena. El motivo fundamental de este criterio es el supuesto no verificado de que el proceso de mestizaje incluyó orígenes étnicos diversos que distorsionarían la estructura genética original. En forma análoga a las muestras del Uruguay, a fin de obtener muestras comparativas en áreas con escasa información sobre grupos indígenas se admitieron dos excepciones a este criterio. La primera es la muestra rotulada como “Pampa” que corresponde a la fusión de varias muestras de poblaciones mestizadas de las provincias argentinas de Buenos Aires, La Pampa, San Luis, Mendoza, Córdoba, Santa Fe y Entre Ríos – todas las cuales tienen territorio comprendido dentro de lo que se define a efectos arqueológicos como región pampeana, definición que hemos utilizado en esta Tesis (Politis 2008). Para la Patagonia, aparte de las muestras disponibles de

Mapuche y Tehuelche, se elaboró una muestra compuesta basada en poblaciones mestizadas de las provincias argentinas de Neuquén, Río Negro, Chubut y Santa Cruz.

4) Por último, a fin de obtener un análisis legible, se procuró colapsar las muestras de etnias relacionadas, siempre que una comparación básica lo permitiese. De esa forma, las frecuencias de los Toba de las provincias del Chaco y Formosa ( $X^2 = 3,64$ ;  $gl = 3$ ;  $p = 0,303$ ), los Guaraní Kaiowá y Guaraní Ñandeva de Rio Grande do Sul ( $X^2 = 4,65$ ;  $gl = 2$ ;  $p = 0,098$ ) y los Kaingang de Rio Grande do Sul y Paraná ( $X^2 = 3,18$ ;  $gl = 2$ ;  $p = 0,204$ ) se colapsaron respectivamente como “Toba”, “Guaraní” y “Kaingang”. Por el contrario, los Wichí de las provincias del Chaco y Formosa no pudieron colapsarse como una sola población debido a sus diferencias significativas en frecuencias de los cuatro haplogrupos ( $X^2 = 24,98$ ;  $gl = 3$ ;  $p < 0,0001$ ).

Tabla 3.5: Poblaciones modernas empleadas en el análisis comparativo de la muestra de ADN antiguo.

Nº	País / Región	Etnia	N	A	B	C	D
1	Bolivia / Altiplano	Aymara	172	5,8%	68,0%	12,2%	14,0%
2	Chile / sur	Huilliche	80	3,8%	28,8%	18,8%	48,8%
3	Chile/ norte	Atacameño	50	12,0%	72,0%	10,0%	6,0%
4	Argentina / Chaco	Pilagá	38	10,5%	31,6%	28,9%	28,9%
5	Argentina / Chaco	Toba	67	17,9%	43,3%	4,5%	34,3%
6	Argentina / Chaco	Wichí (Chaco)	32	31,3%	25,0%	0,0%	43,8%
7	Argentina / Chaco	Wichí (Formosa)	67	9,0%	56,7%	19,4%	14,9%
8	Argentina / sur	Mapuche	129	14,0%	38,0%	21,7%	26,4%
9	Argentina / sur	Tehuelche	29	0,0%	20,7%	24,1%	55,2%
10	Chile / sur	Mapuche	111	0,0%	7,2%	44,1%	48,6%
11	Chile /sur	Pehuenche	105	2,9%	11,4%	41,0%	44,8%
12	Argentina / noreste	Guaraní	121	40,5%	17,5%	6,0%	36,0%
13	Brasil / sur	Guaraní	176	88,8%	0,0%	10,1%	1,1%
14	Brasil / sur	Kaingang	78	34,2%	36,8%	25,0%	3,9%
	Argentina / Pampa	Pobs. mestizadas	644	22,2%	15,5%	36,5%	25,8%
	Argentina / Patagonia	Pobs. mestizadas	132	6,1%	25,8%	27,3%	40,9%

Referencias: Aymara, Huilliche, Atacameño: Merriwether et al. (1995). Grupos chaqueños: Cabana et al. (2006). Mapuche (Arg.): Ginther et al. (1993); Goicoechea et al. (2001). Tehuelche: Goicoechea et al. (2001). Mapuche (Ch.) y Pehuenche: Moraga et al. (2000). Guaraní (Arg.): Sala et al. (2010). Guaraní (Br.) y Kaingang: Marrero et al. (2007b). Pampa: Dejean et al. (2003); Martínez Marignac et al. (2004); García y Demarchi (2006); Avena et al. (2007); Salas et al. (2008); García y Demarchi (2009); Bobillo et al. (2010); Catelli et al. (2011). Patagonia: Avena et al. (2009, 2010); Bobillo et al. (2010); Catelli et al. (2011)

#### 3.1.4.2.2. SECUENCIAS DE LA REGIÓN HIPERVARIABLE I DE ARGENTINA Y BRASIL

Para el análisis comparativo de las secuencias obtenidas en la muestra antigua con las de otras poblaciones, pasadas y actuales, del sur de continente, se trabajó en dos etapas. La primera etapa consistió en una compilación de secuencias de la HVRI de Argentina y del sur de Brasil, basada en diversos trabajos de carácter regional, nacional y continental (Alves-Silva et al. 2000; Marrero et al. 2007a, 2007b; Tamm et al. 2007; Bobillo et al. 2010; Catelli et al. 2011). Esta compilación de secuencias de un total de 386 individuos de Argentina y 359 individuos de Brasil fue empleada para la reconstrucción de afinidades filogenéticas mediante *median-joining networks* (ver *infra*, p. 80). En segundo lugar, se efectuó una búsqueda bibliográfica y en bases de datos *on line* en busca de motivos de secuencia similares a los motivos específicos de las muestras antiguas. En esta búsqueda se consideraron secuencias no sólo de Argentina y Brasil, sino de toda América del Sur.

La búsqueda en bases de datos *on line* se basó en dos repositorios: Genbank (Benson et al. 2010) y EMPOP (Parson y Dür 2007). La búsqueda de secuencias afines en Genbank se realizó mediante la herramienta BLAST (Altschul et al. 1990; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), habiendo previamente dado formato a las secuencias de la muestra antigua para abarcar desde la posición 16024 a la posición 16383 del genoma mitocondrial, criterio coincidente con el empleado en la reconstrucción filogenética (ver *infra*, p. 81). La búsqueda en EMPOP (<http://empop.org>) se basó también en la extensión 16024-16383, pero la interfaz requiere ingresar el motivo mutacional a buscar con la posición siguiendo la numeración de Anderson et al. (1981) y su estado (*e.g.* 16051G-16092C-16223T-16298C-16325C-16327T); esta modalidad de búsqueda es más lenta que la implementada en la herramienta BLAST (que admite el ingreso a la vez de varias secuencias) pero se encontraba al alcance de esta investigación en función de la cantidad de muestras a analizar.

A fin de facilitar la búsqueda *on line*, además de la secuencia original se prepararon modificaciones de la misma careciendo de una o varias de las mutaciones que la definían aparte del motivo básico de haplogrupo; de ese modo, la secuencia definida por el motivo 16051G-16092C-16223T-16298C-16325C-16327G era además buscada en dos variantes,

siempre manteniendo el motivo de secuencia del haplogrupo C1 (16223T-16298C-16325C-16327T): 16051G-16223T-16298C-16325C-16327G (ignorando 16092C) y 16092C-16223T-16298C-16325C-16327G (ignorando 16051G). De esa forma, se procuró hallar también secuencias que pudieran eventualmente estar filogenéticamente relacionadas con la obtenida en la muestra moderna.

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1. INFRAESTRUCTURA Y PROCEDIMIENTOS ESTÁNDAR AL TRABAJAR CON ADN ANTIGUO

El manejo de ADN altamente degradado debe realizarse con instrumental dedicado en instalaciones especialmente designadas. La mayor parte de las muestras se extrajeron y analizaron en 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, en Montevideo. Estas instalaciones se encuentran en un área aislada, de aproximadamente 16m<sup>2</sup>, y cuentan con los implementos necesarios para minimizar la posibilidad de contaminación con ADN moderno: inyector de aire con filtro, luz UV-C general y localizada e instrumental utilizado exclusivamente para ADN antiguo. Asimismo, durante el trabajo en el laboratorio se tomaron todas las precauciones prácticas para minimizar la contaminación, incluyendo el uso de mameluco con capucha, cubrezapatos, tapabocas y guantes de látex descartables, encendido de la luz UV como mínimo 30 minutos antes del ingreso y después de la salida del laboratorio, y limpieza sistemática de las superficies antes y después de cada sesión de trabajo (así como durante su transcurso) con hipoclorito de sodio. Cada pieza de instrumental fue irradiada con UV localizado, al igual que todos los reactivos a excepción de los que pudieran sufrir daño con la radiación UV, como la *Taq* polimerasa, los cebadores y los extractos de ADN.

La replicación de parte de los análisis efectuados en Montevideo se realizó en el laboratorio de ADN antiguo de la Universidad de Utah, dirigido por Dennis H. O'Rourke, donde se extrajo y analizó ADN de diversas muestras durante febrero y marzo de 2011. Este laboratorio presenta una infraestructura con varias ventajas con respecto al laboratorio de

Montevideo. Cuenta con tres espacios separados, sucesivamente alejados de la puerta exterior; el primero oficia de vestuario, conteniendo los mamelucos, guantes, cubrezapatos, túnicas y tapabocas. El segundo es el espacio dedicado a la extracción de ADN conteniendo, además del equipamiento de extracción propiamente dicho (centrífugas, pipetas, estufas con rotor, agitadores), dos *UV crosslinkers* y tres estaciones de trabajo de PCR con flujo laminar vertical y luz UV (AIRClean® Systems, Raleigh, NC, EE.UU.), cada una dedicada a una etapa específica de la extracción de ADN. El tercer espacio, conteniendo un *crosslinker* y dos estaciones de trabajo de PCR, está dedicado al montaje de las reacciones de PCR. Las reacciones de PCR y todas las operaciones *post-PCR* se efectúan afuera del laboratorio de ADN antiguo, en un espacio localizado aproximadamente a 20 metros de distancia del mismo; se establece además como norma no reingresar al laboratorio de ADN antiguo después de haber estado en el laboratorio *post-PCR*.

### 3.2.2. EXTRACCIÓN DE ADN

#### 3.2.2.1. PROTOCOLOS UTILIZADOS EN EL PRESENTE TRABAJO

Si bien los trabajos pioneros en ADN antiguo trabajaron sobre tejidos blandos excepcionalmente conservados, como pieles secas o momias, el hueso es el material de preferencia en virtud de su abundancia. De acuerdo a O'Rourke et al. (2000a) hay dos variantes fundamentales de formas de extracción de ADN antiguo de restos óseos: el método de fenol/cloroformo/proteinasa K y el método de suspensión de sílice, ambos empleados en este trabajo. Ambas variantes pueden tomar elementos una de la otra, dando lugar a diversos protocolos híbridos. A continuación se presentan las etapas fundamentales de la extracción de ADN, comparando variantes en cada etapa en caso de que las haya.

1) El  *acondicionamiento del material óseo*  para el inicio del protocolo de extracción consiste en la eliminación del ADN exógeno y, eventualmente, la fragmentación o pulverización del material. Se han propuesto varios procedimientos para eliminar cualquier potencial ADN moderno contaminante. Estos procedimientos incluyen la eliminación de la capa exterior de la muestra, la perforación para extraer sólo material interno, el lavado

previo con ácido clorhídrico, etanol, agua oxigenada o hipoclorito de sodio y la inmersión de la pieza en EDTA, existiendo cierto consenso en cuanto a que el uso de hipoclorito de sodio es el método de descontaminación más eficaz (Kemp y Smith 2005; Yang y Watt 2005). En el presente trabajo, el paso correspondiente al tratamiento de la muestra pasó por una evolución, consistente en variantes en la agresividad de la descontaminación, fundamentalmente en la concentración de hipoclorito de sodio empleada: se comenzó con hipoclorito de sodio al 20% (20g de cloro activo por litro de agua), reduciendo la concentración a 5% – aunque con una aplicación más asidua – en los trabajos a partir de 2011.

2) La *fragmentación del material* es un requerimiento fundamental para la extracción del ADN de restos antiguos, a fin de aumentar la superficie de acción de los reactivos empleados en la liberación y captura de ADN. En ese sentido, para la fragmentación se han empleado desde molinos de café (Stone y Stoneking 1993) hasta la molienda en mortero después de congelar la pieza con nitrógeno líquido (Carnese et al. 2010) – aunque esta práctica implica riesgo de contaminación a través del nitrógeno (Fountain et al. 1997; Clarke 1999) – pasando por tornos de dentista para acceder al interior del hueso o diente (Merriwether et al. 2000). Algunos de los protocolos de empleo de dientes, basados en seccionar el diente y acceder a la dentina con un torno (*e.g.* Drancourt et al. 1998), mantienen en general la integridad de la pieza, pero van contra la economía operativa al aumentar la cantidad de etapas en la manipulación. En cualquier caso, aun siendo deseable la reducción de la pieza, debe realizarse con la menor manipulación posible a fin de minimizar la probabilidad de contaminación (O'Rourke et al. 2000a). En el trabajo para la presente Tesis, la forma de tratamiento mecánico de la pieza varió de acuerdo al protocolo, empleándose desde la pulverización mediante el empleo de un torno de manualidades en los trabajos basados en el protocolo de fenol/cloroformo (Anexo I-A) y la fragmentación (manual o por percusión) del hueso o el diente en los protocolos basados en columnas de sílice (Anexos I-B y I-C).

3) La *liberación del ADN* se basa en la destrucción total o parcial, por medios químicos, del tejido óseo, para lo cual los protocolos estándar coinciden en el empleo de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) que, siendo un quelante, captura el calcio de la

hidroxiapatita, degradando así la matriz mineral del hueso. Concomitante o posteriormente, la matriz orgánica (consistente en su mayor parte por fibras de colágeno) es digerida usando proteinasa K. Este fue el método empleado en esta investigación, si bien la duración de las etapas varió según el protocolo. Con el protocolo de fenol/cloroformo (Anexo I-A) la descalcificación con EDTA se realizaba por 72 a 96 horas a temperatura ambiente, seguida por una digestión con proteinasa K a 55°C durante dos horas. En los protocolos posteriores (Anexos I-B y I-C) la descalcificación y la digestión se realizaron en forma simultánea a 55°C por 24 a 48 horas.

4) La “captura” y precipitación del ADN consiste en la separación del ADN, soluble en agua, de los restos orgánicos resultantes de la destrucción del tejido, para luego precipitarlo utilizando etanol o isopropanol, tras lo cual el ADN (con o sin sílice) es centrifugado a fin de producir un *pellet*, que luego será disuelto en agua o en *buffer* Tris-EDTA (TE). Una vez finalizada esta etapa, se obtiene un extracto de ADN al que se puede aplicar otros procedimientos.

Para esta etapa se distinguen dos grandes grupos de protocolos. El protocolo de fenol/cloroformo (Sambrook et al. 1989) se basa en el uso de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (p/c/i) 25: 24: 1 y cloroformo a fin de separar el ADN (que queda disuelto en la fase acuosa resultante de agregar el p/c/i o el cloroformo al producto de digestión) de los demás compuestos del tejido de base. El segundo procedimiento se basa en el uso de un caotrópico en vez de fenol/cloroformo para degradar más las proteínas y facilitar la unión del ADN a partículas de sílice. Originalmente, el caotrópico propuesto fue ioduro de sodio (Vogelstein y Gillespie 1979); actualmente se emplea tiocianato de guanidinio (GuSCN; (Höss y Pääbo 1993; Rohland y Hofreiter 2007b). Tras un período de incubación a 60°C, se centrifuga la solución de GuSCN para eliminar los restos de tejido, y el sobrenadante es transferido a una suspensión de sílice conteniendo un *buffer* con GuSCN. En condiciones ácidas, el ADN se une al sílice, proveyendo un medio físico que facilite la formación de un *pellet* visible con ADN en el paso posterior.

La captura, precipitación y purificación del ADN es la etapa que más varió en el correr del trabajo de Tesis, empleándose tres protocolos diferentes. El primero (Anexo I-A) es un protocolo “híbrido” de fenol/cloroformo (Sambrook et al. 1989) con la adición de suspensión

de sílice (Boom et al. 1990; Baron et al. 1996) y precipitación con isopropanol (Hänni et al. 1995). Este protocolo era empleado en el laboratorio de D. A. Merriwether (Merriwether et al. 2000) y fue empleado desde el inicio de los trabajos con ADN antiguo en el laboratorio de Montevideo (Bertoni et al. 2004; Figueiro 2006; Figueiro y Sans 2007, 2008) hasta el año 2010.

El segundo protocolo (Anexo I-B) fue empleado únicamente en el correr de los trabajos de replicación en el laboratorio de ADN antiguo de la Universidad de Utah, bajo la supervisión de D.H. O'Rourke, durante febrero y marzo de 2011. El procedimiento estándar en este laboratorio era el empleo de un *kit* comercial (GeneClean® for Ancient DNA, MP Biomedicals, Santa Ana, CA, EE.UU.), con algunas variantes operativas respecto a las instrucciones del fabricante. El *kit* es una variante del uso de tiocianato de guanidinio y suspensión de sílice. El mismo emplea además columnas de sílice para facilitar la captura y posterior resuspensión del ADN, en base a lo propuesto por Yang et al. (1998). Las razones para la adopción de un *kit* comercial son múltiples: se evita una prolongada etapa de puesta a punto de procedimientos y soluciones (donde cada operación implica riesgo de contaminación de las mismas) y el seguimiento estricto del protocolo sugerido permite descartar problemas en el mismo en caso de que haya problemas con la extracción; de esta forma, el trabajo de laboratorio puede concentrarse en el control de las demás etapas (en nuestro caso, el procesamiento previo de las muestras).

El principal inconveniente de los *kits* comerciales en nuestro medio es el costo: la cotización plaza del *kit* GeneClean® for Ancient DNA en marzo de 2012 era de USD 900 más impuestos. Por ende se optó, siguiendo el ejemplo de Nores y Demarchi (2011), por emplear para la purificación del ADN un *kit* de purificación de productos de PCR basado en columnas de sílice (Anexo I-C). Se trata en última instancia de una adaptación del protocolo empleado en Utah, adoptando, en vez del *kit* GeneClean, uno más disponible de purificación de productos de PCR (QIAquick® PCR purification kit, QIAGEN, Hilden, Alemania) y una alícuota de suspensión de sílice del *kit* GeneClean. Dado que los procedimientos de purificación de productos de PCR requieren cantidades reducidas de *buffer* de captura, se empleó al momento de agotarse el *buffer* provisto con el *kit*, un *buffer* de captura a base de GuSCN, siguiendo los lineamientos de Rohland y Hofreiter (2007b). Este procedimiento se empleó

exitosamente en dos de las muestras analizadas en este trabajo (la muestra del Arroyo Yaguararé y el individuo 4372-B de Rio Grande do Sul). Adicionalmente, se empleó en dos muestras prehistóricas humanas, no incluidas en este trabajo, en las que se ensayaron métodos moleculares de determinación de sexo (Mut et al. 2012) y en dos muestras de venado de campo recuperados de contextos de arqueofauna (Moreno et al. 2012).

#### 3.2.2.2. CONTROL DE ÉXITO DE LAS EXTRACCIONES

El control del éxito de las extracciones se realizó mediante la amplificación por PCR del segmento 13235-13334 del genoma mitocondrial, en cuyo tramo se encuentra el sitio de restricción correspondiente al haplogrupo C (Tabla 3.6). Debe observarse que el segmento de 100 pb mencionado para el control del éxito de la extracción fue elegido por ser el más corto en el juego de cebadores utilizado; por consiguiente, la no amplificación de dicho segmento en dos ocasiones sucesivas utilizando ambas diluciones fue considerado fracaso de la extracción, si bien estrictamente implica la inexistencia en el extracto de segmentos de ADN mayores de 100 pb.

Las tandas de extracción, compuestas de dos o tres muestras, incluían en todos los casos un tubo sin material, sujeto a los mismos pasos del protocolo que las muestras de tejido. El contenido de este tubo era empleado como “blanco de extracción”, y también fue sometido a amplificación por PCR del fragmento 13235-13334 a fin de verificar la eventual presencia de contaminación por segmentos de ADN de un tamaño mínimo de 100 pb. Si bien el procedimiento estándar debiera dictar el descarte de los extractos en caso de presencia de contaminación del blanco, este procedimiento se juzgó poco práctico, especialmente considerando lo observado en el correr del trabajo previo con la muestra de Arroyo Seco 2 (Figueiro 2006), donde la contaminación del blanco no impidió la recuperación de productos auténticos.

### 3.2.3. ANÁLISIS DEL ADN

#### 3.2.3.1. PROCEDIMIENTO GENERAL DE PCR

La preparación de las reacciones de PCR se hizo en el laboratorio de ADN antiguo, y no se manipuló ni se guardó ADN moderno en el interior del mismo. La reacción propiamente dicha se efectuaba en el exterior del laboratorio del ADN, en instalaciones de análisis de ADN moderno, no abriendo ningún tubo exceptuando el que debía contener el control positivo, consistente en ADN de una muestra moderna y de eficacia garantizada en la PCR.

Las reacciones de PCR consistieron en el *buffer* de la *Taq* polimerasa provisto por el fabricante, 3 mM de  $Mg^{2+}$  (generalmente en la forma de  $MgCl_2$ ), 160 nM de cada cebador, 50  $\mu M$  de cada dNTP, 1,5 unidades de *Taq* por cada 25  $\mu L$  de reacción y 10% (v/v) de extracto de ADN. En virtud de los potenciales factores inhibidores de la reacción de PCR en el extracto (taninos, ácidos húmicos y fúlvicos), se utilizaron diversas diluciones (1: 10, 1: 20, 1: 40) del extracto original en la reacción de PCR. La finalidad del uso de diluciones era hallar un equilibrio entre la dilución de ADN y la dilución de los inhibidores. Asimismo, se agregó 0,4% (40  $\mu g/\mu L$ ) de albúmina de suero bovino (BSA) a la reacción de PCR. Esta proteína mejora notablemente la eficacia de la reacción en presencia de inhibidores (Forbes y Hicks 1996; Kreader 1996; Abu Al-Soud y Rådström 2001; Rådström et al. 2004), especialmente aquellos conteniendo grupos fenólicos – entre los que se cuentan los ácidos húmicos del sedimento – mediante el secuestro de los mismos (Kreader 1996).

Las reacciones de PCR fueron efectuadas con *Taq* polimerasa diseñada para activarse a temperaturas mayores de 90°C. Si bien su fidelidad es equivalente a la *Taq* polimerasa común, el hecho de que inicie su actividad en forma brusca y con el ADN a replicar desnaturalizado minimiza la formación de productos de partida inespecíficos. Se emplearon tres variedades de polimerasa, provenientes de diferentes proveedores. En el laboratorio de Montevideo, se emplearon en distintos momentos Platinum® *Taq* (Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.) y HotStart® *Taq* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.), observándose una mejor eficacia de la primera. En el laboratorio de Salt Lake City,

la polimerasa estándar era AmpliTaq Gold (Applied Biosystems/Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.), que tiene de acuerdo a Rohland y Hofreiter (2007a) una eficacia levemente superior a la Platinum® *Taq*.

Las reacciones de PCR consistieron en un paso de desnaturalización inicial y activación de la polimerasa a 94°C por 10 minutos, seguido de 45 a 60 ciclos de desnaturalización (94°C), hibridación y extensión (72°C). El tiempo de cada etapa del ciclo se redujo no de acuerdo a criterios de eficacia, sino de economía: considerando que la tasa de extensión de la *Taq* polimerasa a 70°C es de 60 bases por segundo (Innis et al. 1988), en teoría bastarían dos segundos de extensión para extender un amplicón del orden del centenar de pares de bases. Sin embargo, en etapas iniciales del trabajo se empleó la duración estándar de los ciclos en la práctica normal del laboratorio, esto es, 40 segundos. Para reducir la duración del programa de ciclado, y tras no observar una disminución en la eficacia de la reacción, se redujo el tiempo de las etapas de los ciclos a 15 segundos, siguiendo a Kemp et al. (2007). El programa de ciclado se concluía con una etapa de extensión final de 5 minutos a 72°C.

La temperatura de hibridación al molde (*annealing*) empleada en la PCR era, por regla general, 2°C inferior a la menor temperatura de hibridación ( $T_m$ ) de los dos cebadores incluidos en el par. Se empleó una estrategia de ensayo y error para alcanzar la temperatura óptima de hibridación, reduciendo la temperatura hasta 5°C menos que la menor  $T_m$  en caso de observarse poco producto de amplificación, y aumentando la temperatura no más allá de la mayor  $T_m$  del par de cebadores en caso de observarse productos inespecíficos. Asimismo, se ensayó el empleo de “touchdown PCR” consistente en comenzar la reacción con temperaturas de hibridación 3°C mayores a la mayor  $T_m$  del par de cebadores, disminuyendo la temperatura en ciclos subsiguientes, a razón de 0,5°C por ciclo (Don et al. 1991). Esta estrategia eventualmente se dejó de emplear, en virtud de no observarse mayores diferencias entre las amplificaciones realizadas con el procedimiento estándar y el “touchdown”.

El éxito de las reacciones de PCR se verificaba mediante la electroforesis de una alícuota de 7-10  $\mu$ L de producto de PCR en agarosa al 2% con *buffer* Tris-borato-EDTA (TBE) 0,5X a 100V durante 40 minutos y su visualización mediante fluorescencia por luz UV. La

tinción de los geles para la visualización de los productos se realizó en distintos momentos del trabajo con bromuro de etidio o un equivalente de supuesta menor mutagenicidad (SYBR® Safe, Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.). El tamaño de los amplicones era verificado por comparación de un estándar de peso molecular conocido (normalmente compuesto de bandas de ADN de largos en múltiplos de 100 pb).

### 3.2.3.2. PCR-RFLP Y ANÁLISIS DE SECUENCIAS

Para el análisis de PCR-RFLP se amplificó el ADN con los pares de cebadores para los haplogrupos A, B, C y D descritos en la tabla 3.6. La visualización de los fragmentos tras su digestión con las enzimas de restricción correspondientes y el control de presencia de la deleción de 9 pb diagnóstica del haplogrupo B se realizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% (10%T, 3%C) con tinción por nitrato de plata.

Para su secuenciación, la HVRI fue amplificada en una serie de 3 a 6 segmentos solapantes. En el laboratorio de Montevideo se emplearon dos juegos de cebadores: el primero fue el mismo empleado para los análisis de la muestra de Arroyo Seco 2 (Figueiro 2006; Figueiro y Sans 2007) (Tabla 3.7), y posteriormente se agregó un juego de cebadores diseñados por Kemp et al. (2007) (Tabla 3.8). En el laboratorio de Salt Lake City, se empleó el juego de cebadores publicado por Raff et al. (2010) (Tabla 3.9). Tras verificar el éxito de la reacción de PCR, los productos amplificados eran purificados mediante *kits* comerciales basados en columnas de sílice (QIAquick® PCR purification kit, QIAGEN, Hilden, Alemania y PureLink® PCR Purification Kit, Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.) y enviados a servicios externos para su secuenciación. Las muestras amplificadas en el laboratorio de Montevideo se enviaron en distintas etapas de la investigación a Macrogen (Seúl, Corea del Sur) y al Institut Pasteur de Montevideo. Las muestras amplificadas en el laboratorio de Salt Lake City se enviaron al servicio central de secuenciación del Centro de Ciencias de la Salud de la Universidad de Utah.

Tabla 3.6: Cebadores empleados en el análisis de PCR-RFLP de las muestras de ADN. Los sufijos “L” y “H” corresponden a la hebra (*light* o *heavy*, ver *supra*, figura 1.1) extendida a partir del cebador. La secuencia leída y analizada es la correspondiente a la hebra liviana (L).

Cebador	Posición (5'-3')	Secuencia	Largo amplicón (largo fragmentos)	Ref.
<i>Haplogrupo A (663 Haelll(+))</i>				
A <sub>L</sub>	610-635	TGA AAA TGT TTA GAC GGC CTC ACA TC	118 pb (54/64 pb)	[1]
A <sub>H</sub>	727-708	AGG GTG AAC TCA CTG GAA CG		[2]
<i>Haplogrupo B (8271_8279delACCCCCTCT)</i>				
B <sub>L</sub>	8195-8214	CAC AGT TTC ATG CCC ATC GT	122/113 pb	[2]
B <sub>H</sub>	8316-8294	ATG CTA AGT TAG CTT TAC AGT GG		[2]
<i>Haplogrupo C (13259 HincII(-))</i>				
C <sub>L</sub>	13235-13256	AAT CGT AGC CTT CTC CAC TTC A	100 pb (25/75 pb)	[3]
C <sub>H</sub>	13334-13313	GGC GTG GGT ACA GAT GTG CAG G		[3]
<i>Haplogrupo D (5176 AluI(-))</i>				
D <sub>L</sub>	5099-5120	CTA ACT ACT ACC GCA TTC CTA	179 pb (78/101 pb)	[2]
D <sub>H</sub>	5277-5255	AAT TCT TCG ATA ATG GCC CAT TT		[2]

Referencias: [1] (Handt et al. 1996); [2] (Moraga et al. 2001); [3] (Parr et al. 1996).

Tabla 3.7: Cebadores estándar empleados para la amplificación de la HVRI en los extractos realizados en Montevideo (Figueiro 2006). Los cebadores “F” extienden la hebra “L” del genoma mitocondrial, cuya secuencia constituye la referencia de Cambridge original (Anderson et al. 1981) y revisada (Andrews et al. 1999), coincidentes en la región en estudio.

Cebador	Posición (5'-3')	Secuencia	Largo amplicón
M0F	16015-16035	TAT TCT CTG TTC TTT CAT GGG	100 pb
M0R	16114-16096	GTT GTT GGC GAT ACA TAA A	
M1F	16036-16055	GAA GCA GAT TTG GGT ACC AC	123 pb
M1R	16158-16139	TAC TAC AGG TGG TCA AGT AT	
M2F	16112-16131	CAC CAT GAA TAT TGT ACG GT	126 pb
M2R	16237-16218	TGT GTG ATA GTT GAG GGT TG	
M3F	16192-16209	CCA TGC TTA CAA GCA AGT	131pb
M3R	16322-16303	TGG CTT TAT GTA CTA TGT AC	
M4F	16268-16287	CAC TAG GAT ACC AAC AAA CC	108 pb
M4R	16375-16356	GTC ATC CAT GGG GAC GAG AA	
M5F	16327-16347	CGT ACA TAG CAC ATT ACA GT	103 pb
M5R	16429-16410	GCG GGA TAT TGA TTT CAC GG	

Tabla 3.8: Segundo juego de cebadores empleado para la amplificación de la HVRI en los extractos realizados en Montevideo (Kemp et al. 2007).

Cebador	Posición (5'-3')	Secuencia	Largo amplicón
16010F	15986-16010	GCA CCC AAA GCT AAG ATT CTA ATT T	168 pb
16132R	16153-16132	CAG GTG GTC AAG TAT TTA TGG T	
16126F	16106-16126	GCC AGC CAC CAT GAA TAT TGT	146 pb
16230R	16251-16230	GGA GTT GCA GTT GAT GTG TGA T	
16209F	16190-16209	CCC CAT GCT TAC AAG CAA GT	166 pb
16331R	16355-16331	GGG ATT TGA CTG TAA TGT GCT ATG T	
16249F	16232-16249	CAC ACA TCA ACT GCA ACT	183 pb
16383R	16414-16383	GGT GGT CAA GGG ACC CCT ATC T	
16372F	16353-16372	CCC TTC TCG TCC CCA TGG AT	197 pb
16530R	16549-16530	GGG GAA CGT GTG GGC TAT TT	

Tabla 3.9: Cebadores estándar empleados para la amplificación de la HVRI en los extractos realizados en Salt Lake City (Raff et al. 2010)

Cebador	Posición (5'-3')	Secuencia	Largo amplicón
HVR1_P1F	16023-16042	GTT CTT TCA TGG GGA AGC AG	160 pb
HVR1_P1Rb	16182-16159	TTT GAT GTG GAT TGG GTT TTT	
HVR1_P2Fb	16162-16182	AAA ACC CAA TCC ACA TCA AA	135 pb
HVR1_P2R	16296-16276	GGG TGG GTA GGT TTG TTG G	
HVR1_P3F	16266-16288	CCC ACT AGG ATA CCA ACA AAC C	157 pb
HVR1_P3R	16422-16401	ATT GAT TTC ACG GAG GAT GG	

En todos los casos, se emplearon para la secuenciación los mismos cebadores empleados para la amplificación de los fragmentos, y se secuenciaron ambas hebras a fin de detectar artefactos de secuencia, muy frecuentes en los extractos de ADN antiguo debido a las alteraciones *post-mortem*. Las secuencias fueron alineadas utilizando el programa GeneDoc (Nicholas et al. 1997) y comparadas con la secuencia de referencia revisada de Cambridge (rCRS; Andrews et al. 1999). Eventuales ambigüedades fueron resueltas mediante lectura directa del ferograma. Para fines de los análisis posteriores, se definió haplogrupo (y en caso que fuese pertinente, el subhaplogrupo) de las muestras empleando como referencia la versión 11 de PhyloTree (<http://www.phylotree.org>; van Oven y Kayser 2009).

### 3.2.4. ANÁLISIS DE LOS DATOS

#### 3.2.4.1. ANÁLISIS DE LAS FRECUENCIAS DE HAPLOGRUPOS

Los haplogrupos determinados mediante la combinación de ambas aproximaciones (PCR-RFLP y mutaciones diagnósticas en HVRI) fueron analizados con las siguientes estrategias:

1. Análisis de la diversidad de haplogrupos, calculada como

$$h = \frac{(1 - \sum (x_i)^2) n}{n - 1}$$

siendo  $x_i$  la frecuencia relativa del haplogrupo  $i$  (Nei 1987) a partir de las frecuencias de haplogrupos de la muestra, y sus diferencias con la muestra comparativa.

2. Cálculo de distancias genéticas ( $D_R$  de Rogers [1972] y  $D_A$  de Nei et al. [1983]) a partir de las frecuencias de haplogrupos de la muestra, respecto a la muestra comparativa. Estas distancias fueron interpretadas mediante los siguientes procedimientos:

- a. Escalamiento multidimensional no métrico (NMMDS; Kruskal 1964a; Shepard 1980), reduciendo a dos dimensiones las  $n-1$  dimensiones de la matriz de distancias original;
- b. Test de Mantel (Mantel 1967) para analizar la similitud entre las matrices de distancias genéticas y las distancias geográficas entre las muestras, y cálculo de la correlación (empleando el coeficiente  $r_s$  de Spearman) entre las distancias genéticas y geográficas.

Los análisis y pruebas se efectuaron mediante distintos paquetes y procedimientos implementados en el entorno *R* versión 2.14.1 (R Development Core Team 2011): La matriz de distancias geográficas se elaboró mediante el paquete *gmt* 1.1-9. Las distancias genéticas se calcularon empleando el paquete *ADE4* 1.4-17 en el caso de la distancia de Rogers y mediante líneas de comandos en el caso de la distancia de Nei. El NMMDS se efectuó mediante el paquete *MASS* 7.3-16 (Venables y Ripley 2002) en tanto que el cálculo de

correlaciones y el test de Mantel se realizaron, respectivamente, mediante los paquetes *stats* 2.14.1 y *ape* 2.8 (Paradis et al. 2004).

### 3.2.4.1.1. ANÁLISIS DE DISTANCIAS

Fueron utilizados dos índices de distancias entre las muestras prehistóricas y las poblaciones de comparación: la distancia de  $D_R$  de Rogers y la distancia  $D_A$  de Nei. La distancia de Rogers (1972) es una modificación de la distancia geométrica de modo que el rango de valores de la misma se extienda entre 0 y 1 (y no entre 0 y  $\sqrt{2}$ , como es el caso cuando se emplea la distancia geométrica con frecuencias génicas). La distancia de Rogers se calcula:

$$D_R = \frac{1}{r} \sum_{j=1}^r \sqrt{\sum_{i=1}^{m_j} (x_{ij} - y_{ij})^2 / 2}$$

siendo  $r$  el número de *loci* estudiados, y  $x_{ij}$  e  $y_{ij}$  las frecuencias del alelo  $i$  en el locus  $j$ . Esta medida es una distancia *métrica*, es decir que satisface el requisito de desigualdad triangular: dadas las distancias  $d_{ij}$ ,  $d_{jk}$  y  $d_{ik}$  entre tres poblaciones, cualquiera de estas distancias será menor que la suma y mayor que la diferencia entre las otras dos. La distancia de Rogers no es proporcional al tiempo evolutivo, y tiende a subestimar la distancia entre poblaciones cuando éstas no comparten alelos (Nei 1987).

La distancia  $D_A$  de Nei et al. (1983) es una modificación de la distancia de cuerda de Cavalli-Sforza y Edwards (1967) concebida para reducir la influencia de alelos poco frecuentes en la misma. Se calcula

$$D_A = \frac{1}{r} \sum_{j=1}^r (1 - \sum_{i=1}^{m_j} \sqrt{x_{ij} y_{ij}})$$

$D_A$  toma valores entre 0 y 1, siendo  $D_A = 1$  cuando las poblaciones comparadas no comparten alelos. Esta distancia no satisface la desigualdad triangular, lo cual no obsta en este caso su manipulación en los procedimientos ulteriores por las características de los mismos.

#### 3.2.4.1.1.1. ESCALAMIENTO MULTIDIMENSIONAL NO MÉTRICO (NMMDS)

En el presente trabajo, las matrices de distancias  $D_A$  y  $D_R$  fueron sometidos a un escalamiento multidimensional (MDS) a fin de posibilitar una representación visual en el plano de las relaciones calculadas entre las muestras prehistóricas y las poblaciones de referencia. El MDS se define como la búsqueda de una serie de  $n$  puntos cuyas distancias se correspondan con las diferencias (o similitudes) percibidas entre  $n$  objetos (Kruskal 1964a). Lo esencial de esta búsqueda es el hallazgo de una configuración, en  $k$  dimensiones, que permita una relación consistente (sea ascendente o descendente) entre las relaciones originales entre los objetos y las distancias establecidas entre los puntos que los representan. En el MDS métrico, la relación se establece mediante una regresión lineal o polinomial; en el MDS no métrico (NMMDS) la búsqueda se realiza sobre la base de una relación monótonica, basada únicamente en el mantenimiento del ordenamiento de las distancias obtenidas para los puntos con respecto a las diferencias entre los objetos originales. Esto hace del NMMDS un método más flexible, aplicable también a variables ordinales (Manly 1994).

El NMMDS en su forma actual fue desarrollado por Kruskal (1964a, 1964b), sobre la base de avances previos en la materia por Torgerson (1952) y Shepard (1962). Un método genérico consiste en los siguientes pasos, partiendo de una matriz  $n \times n$  conteniendo las distancias  $\delta_{ij}$  entre los  $n$  objetos:

- a) Se establece una configuración de partida de coordenadas para los  $n$  objetos en  $k$  dimensiones previamente establecidas; esta configuración es arbitraria.
- b) Se calculan las distancias euclídeas  $d_{ij}$  entre los objetos individuales para la configuración  $k$ -dimensional establecida. De acuerdo a Kruskal (1964b), estas distancias no tienen por qué ser métricas.
- c) Se establecen las relaciones numéricas entre las distancias  $d_{ij}$  y  $\delta_{ij}$ , calculándose las "disparidades", siendo éstas las residuales entre las nuevas distancias  $d_{ij}$  y sus distancias teóricas  $\hat{d}_{ij}$  en caso de un ajuste perfecto a la curva monótonica de la configuración de partida.

d) Se calcula la bondad del ajuste de las distancias de configuración a las disparidades mediante un índice llamado "estrés", que consiste en la suma normalizada de los cuadrados de las mismas:

$$S = \sqrt{\frac{S^*}{T^*}} = \sqrt{\frac{\sum_{i < j} (d_{ij} - \hat{d}_{ij})^2}{\sum_{i < j} d_{ij}^2}}$$

e) Sobre la base de los valores de estrés, se modifican las coordenadas de los puntos a fin de reducir el mismo. Este procedimiento se repite hasta que se llega a una solución en la que el estrés no se reduce más que mínimamente entre iteración e iteración.

Dos factores son clave en el análisis. El primero es el nivel de estrés aceptable en una configuración representativa de las relaciones entre los objetos originales. En este sentido, Kruskal (1964b: 119) afirma que "A minimum-stress configuration whose stress is above 20% is unlikely to be of interest. Above 15% we must still be cautious; from 10% to 15% we wish it were better; from 5% to 10% is satisfactory; below 5% is impressive". Por lo tanto, se establece en 10% el estrés mínimo ideal en una configuración representativa. El segundo aspecto es el de la cantidad de dimensiones, puesto que, a mayor cantidad, menor será el estrés pero también será menor la utilidad del escalamiento. En este aspecto, Kruskal (1964a) sugiere graficar la relación entre el estrés y el número de dimensiones, y utilizar el número a partir del cual el decremento en el estrés alcanza una meseta. Asimismo, afirma que si  $k+1$  dimensiones reducen el estrés pero no agregan elementos útiles comparados con la estructura de la configuración con  $k$  dimensiones, es preferible priorizar la interpretabilidad al estrés.

En este trabajo, la utilidad del escalamiento consiste en reducir a un número manejable de dimensiones (dos o tres) las  $n-1$  dimensiones que implican las distancias genéticas entre las poblaciones estudiadas y empleadas para comparación. Estas dimensiones se graficaron para luego emplearse en una interpretación visual de las relaciones entre las poblaciones analizadas, o para someterse a ulteriores análisis que revelen agrupaciones subyacentes.

#### 3.2.4.1.1.2. COEFICIENTES DE CORRELACIÓN Y TEST DE MANTEL

Para analizar la correlación entre distancias genéticas y geográficas de la muestra analizada: la primera fue un graficado de las distancias genéticas  $D_A$  y  $D_R$  con respecto a las distancias geográficas entre las poblaciones, a fin de inspeccionar visualmente si hay o no una relación monotónica entre las mismas. Esta inspección visual fue reforzada mediante el cálculo de un coeficiente de correlación: en virtud de la falta de ajuste de los datos en cuestión a la distribución normal<sup>1</sup>, se empleó el índice  $r_s$  de Spearman. Asimismo, se realizó un test de Mantel de correlación entre las matrices de distancias geográficas y genéticas, donde la distribución de hipótesis nula se establece por un procedimiento de permutaciones (Mantel 1967).

#### 3.2.4.2. ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE LA REGIÓN HIPERVARIABLE I

La interpretación de la vinculación de las secuencias de la HVRI obtenidas de las muestras antiguas respecto a las secuencias sudamericanas de la muestra comparativa se realizó mediante dos estrategias, una analizando la relación filogenética entre las mismas, y otra analizando la distribución geográfica de linajes antiguos y modernos emparentados.

##### 3.2.4.2.1. RELACIÓN FILOGENÉTICA Y ASCENDENCIA COMÚN

La relación filogenética entre las secuencias antiguas y modernas se analizó mediante la elaboración de *median-joining networks* (Bandelt et al. 1999) (Figura 3.3). Éstos constituyen una mejora de los *median networks*, un método desarrollado en el intento de establecer, a partir de caracteres binarios, representaciones de filogenias que tuvieran en consideración la existencia de estados repetidos (en nuestro caso, mutaciones paralelas en linajes no directamente emparentados), posibilitando representar en un solo gráfico todas

---

<sup>1</sup> El ajuste a la distribución normal de datos numéricos que lo requirieran para fue verificado mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov con corrección de Lilliefors, empleando el paquete *nortest* 1.0 en el entorno R 2.14.1.

las posibles filogenias de máxima parsimonia (Bandelt et al. 1995). Los *median-joining networks* constituyen una mejora respecto a los *networks* previos en la medida en que permiten caracteres con estados múltiples (ambigüedades o sitios con transiciones y transversiones) a la vez que incorpora métodos de búsqueda de árboles de mínima extensión (*minimum-spanning trees*, Kruskal 1956; Foulds et al. 1979) en la reconstrucción de las estructuras que contienen, a su vez, las trayectorias evolutivas de máxima parsimonia.

Los *median-joining networks* tienen por ventaja la visualización inmediata de los cambios (en la forma de polimorfismos de restricción, inserciones, deleciones, cambios de aminoácidos o cambios nucleotídicos) que distinguen a una variante (en nuestro caso, una secuencia nucleotídica específica) respecto a las demás de la muestra y respecto al o a los linajes ancestrales hallados en la muestra. Por lo tanto, además de servir como una representación completa del panorama evolutivo de la muestra, permite una inspección visual y reconocimiento de linajes eficiente para comparaciones interpoblacionales.

En el presente trabajo, las secuencias antiguas analizadas fueron incorporadas en *median-joining networks* construidos a partir de la muestra comparativa de 252 secuencias modernas del Uruguay y 745 secuencias de Argentina y Brasil (ver *supra*, p. 64), empleando el programa Network 4.611 ([www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm](http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm)) con los siguientes criterios:

- 1) Las secuencias fueron recortadas a una extensión de 360 pb, desde la posición 16024 a la posición 16383, presentes en la totalidad de las publicaciones consideradas en la compilación.

- 2) Dentro de este trecho, los sitios fueron ponderados a fin de reducir las ambigüedades dentro de la estructura. La ponderación se realizó en proporción inversa a las tasas relativas de mutación asignadas por Meyer et al. (1999): los sitios con una tasa de mutación menor a la media recibieron una ponderación de 10, los sitios con tasa promedio recibieron una ponderación de 8, los sitios con tasas el doble del promedio fueron ponderados con un índice de 6, y así sucesivamente.

- 3) De acuerdo a Meyer et al. (1999), cinco sitios (16093, 16129, 16189, 16311 y 16362) tienen tasas de mutación 5 veces superior a la media de la HVRI, lo cual implicaría una ponderación de cero y su exclusión de la filogenia. No obstante, y en virtud de la utilidad

heurística de los *networks* en este trabajo (no se pretende la reconstrucción de una filogenia precisa sino su empleo en la identificación de linajes con fines exploratorios) estos sitios fueron mantenidos y se les asignó un peso de 1.

4) Por último, se realizó un post-procesamiento de las filogenias por el procedimiento MP del programa Network (Polzin y Daneshmand 2003), permitiendo, en caso de que la solución incluyera más de una solución de máxima parsimonia, la visualización de cada una de las alternativas.

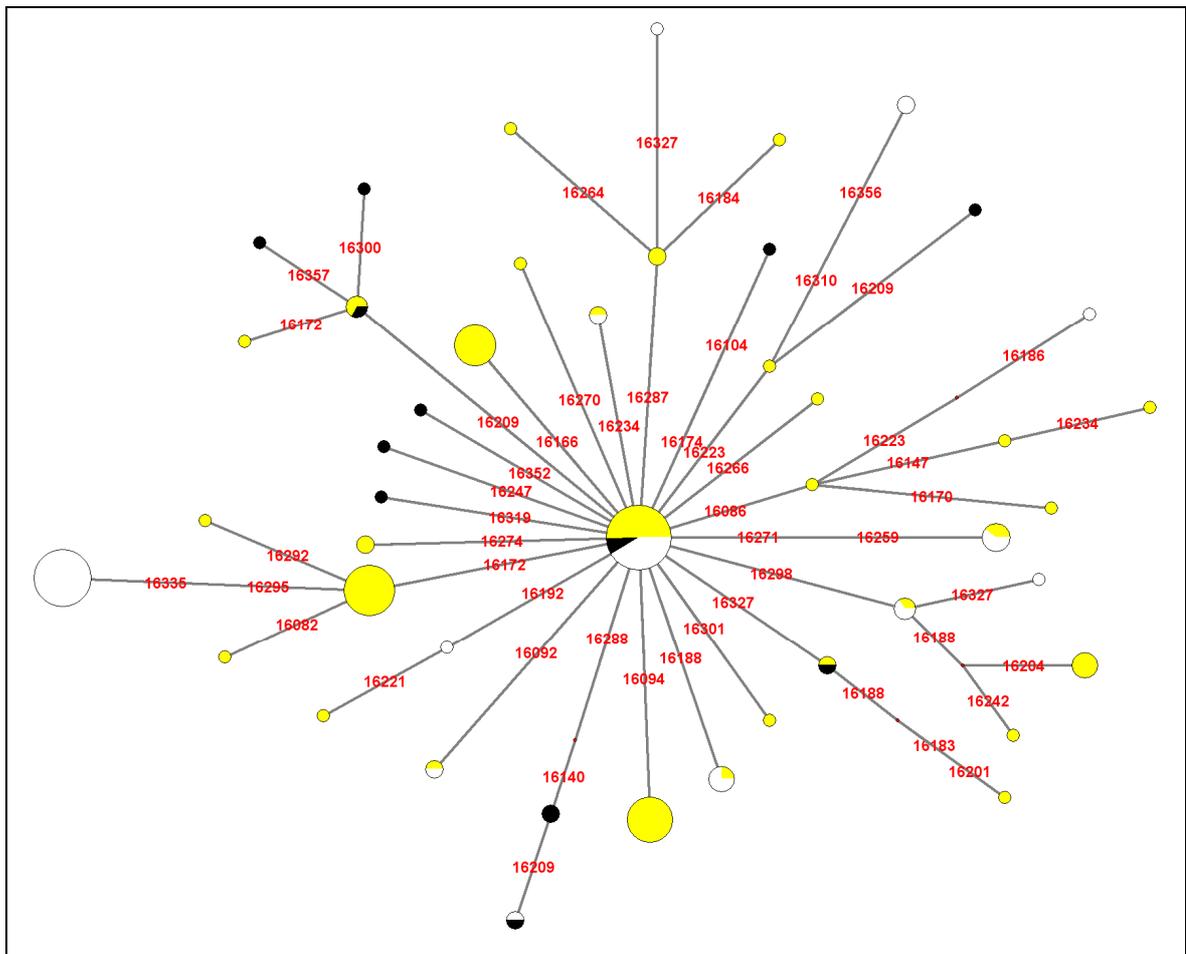


Figura 3.3: ejemplo de median-joining network (tomado de Figueiro et al. 2011 – Anexo II-A)

#### 3.2.4.2.2. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LINAJES EMPARENTADOS

Las poblaciones portadoras de secuencias similares o idénticas a las secuencias antiguas obtenidas fueron localizadas geográficamente en cuanto a latitud y longitud, y las

distancias entre éstas fueron calculadas mediante el paquete *gmt* 1.1-9 en el entorno *R* (R Development Core Team 2011). La comparación de las distribuciones geográficas se efectuó mediante el estadístico *U* de Mann-Whitney: la elección de una prueba no paramétrica se basa en que, en un estudio previo, se observó que las distancias interpoblacionales intra-linaje no presentan una distribución normal (Figueiro et al. 2011).

Un criterio interpretativo básico establecido para la distribución de linajes es que un linaje de distribución reducida tendría menor antigüedad. Debe enfatizarse de que, a pesar de una larga historia dentro de la genética antropológica de intentos de establecer fechas de origen a haplogrupos, linajes y movimientos poblacionales mediante el empleo del principio del “reloj molecular”, se renunció a dicho intento en este trabajo. Los motivos para ello estriban en que no sólo se han discutido ampliamente las tasas de mutación aplicables al genoma mitocondrial (Heyer et al. 2001; Kemp et al. 2007; Soares et al. 2009) sino que también se ha debatido la posibilidad de la variación a lo largo del tiempo de la tasa de mutación observable (Ho et al. 2005; Henn et al. 2009).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. EXTRACCIÓN DEL ADN

La tabla 4.1 resume los resultados de los 89 extractos analizados, de los cuales 74 fueron realizados personalmente: 59 en el laboratorio de ADN antiguo de Montevideo (Tabla 4.1.a) y 15 en la Universidad de Utah (Tabla 4.1.b). Otros 15 extractos habían sido hechos previamente a este trabajo por Bernardo Bertoni en la Universidad de Michigan (Tabla 4.1.c).

Tabla 4.1.a: Resultados de los extractos de ADN realizados en el laboratorio de Montevideo por el investigador. Los haplogrupos fueron obtenidos por PCR-RFLP salvo los casos indicados.

Sitio	Individuo	Material	ADN	Haplogrupo
<b>Uruguay (Oeste)</b>				
Estancia "El Cerro"	1	Hueso	Sí	s/d
	2	Diente	Sí	s/d
	2B	Hueso	Sí	D
Campo Morgan	15736	Hueso	Sí	C
Los Cardos	1	Hueso	Sí	C
	2	Hueso	Sí	s/d (3)
Colonia Concordia	37974	Diente	Sí	B
	41101	Hueso	Sí	K (2)
	47992	Diente	Sí	s/d
	47994	Hueso	Sí	B
	47996	Diente	Sí	s/d (3)
	47996 A	Diente	Sí	s/d
	47996 B	Diente	Sí	A
	55961	Hueso	No	
	55968	Hueso	No	
	51983	Diente	Sí	s/d
61395	Hueso	No		
Arroyo Yaguareté	1	Diente	Sí	D
	1B*	Hueso	Sí	B2 (1)
<b>Uruguay (Este)</b>				
CH2D01-A	2	Hueso	Sí	s/d (3)
	18A	Hueso	Sí	A
	19	Diente	No	
CH2D01-B	B-IV	Diente	Sí	C
Puntas de San Luis	sub. II	Diente	Sí	A

(1) Haplogrupo determinado por secuencia de la HVRI. (2) Contaminación con ADN del investigador. (3) Probable contaminación con ADN exógeno. (4) Determinación del haplogrupo imposibilitada debido a la alta degradación de la muestra.

Tabla 4.1.a. (continuación)

Sitio	Individuo	Material	ADN	Haplogrupo
<i>Región pampeana argentina, Holoceno temprano</i>				
Arroyo Seco 2	1	Hueso	Sí	K (2)
	2	Hueso	Sí	s/d (3)
	4	Hueso	Sí	K (2)
	5	Hueso	Sí	K (2)
	6	Hueso	Sí	C
	7	Hueso	Sí	B
	8	Hueso	Sí	s/d (3)
	14	Hueso	Sí	s/d (3)
	20	Hueso	No	
	24	Hueso	Sí	s/d (3)
	27	Hueso	No	
	39	Hueso	Sí	s/d (3)
	43	Diente	Sí	K (2)
44	Hueso	Sí	s/d (3)	
<i>Región pampeana argentina, Holoceno tardío</i>				
Tres Reyes 1	1	Hueso	Sí	C
	2	Hueso	Sí	A
	4	Hueso	Sí	s/d (4)
	8	Hueso	Sí	s/d (3)
	9	Hueso	Sí	K (2)
	10	Hueso	Sí	s/d (4)
Córdoba (Agroalfarero)		Hueso	Sí	B
Córdoba (Holoceno medio/tardío)		Hueso	Sí	C
<i>Río Grande do Sul, Holoceno Tardío</i>				
RS-A-34	4372 – A	Diente	Sí	s/d (4)
	4372 – C	Hueso	Sí	s/d (3)
	4372 – H	Hueso	Sí	B
	4372 – K	Hueso	Sí	s/d (3)
	4372 – D	Hueso	Sí	s/d (3)
	4372 – E	Hueso	Sí	s/d (4)
	4372 – F	Hueso	Sí	s/d (4)
	4372 – B	Diente	Sí	C1 (1)
	4372 – G	Hueso	Sí	s/d (3)
	4372 – I	Hueso	Sí	s/d (3)
	4372 – J	Hueso	Sí	s/d (4)
s/etiqueta	Hueso	Sí	C	
RS-LS-85	629	Hueso	Sí	s/d (4)
	630	Hueso	No	

Tabla 4.1.b: Resultados de los extractos de ADN realizados en Salt Lake City por el investigador. Los haplogrupos fueron obtenidos por secuencia de la HVRI (ver *infra*, Tabla 4.5.)

Sitio	Individuo	Material	ADN	Haplogrupo
<i>Uruguay (Este)</i>				
CH2D01-A	12	Hueso	Sí	C1d
	13	Hueso	Sí	C1d
	20	Hueso	Sí	C1d
	19A	Diente	No	
CG14E01	9	Hueso	Sí	s/d
	13	Hueso	Sí	D1 (2)
<i>Región pampeana argentina, Holoceno temprano</i>				
Arroyo Seco 2	5	Hueso	Sí	s/d (1)
	19	Hueso	No	
	24	Hueso	No	
<i>Región pampeana argentina, Holoceno tardío</i>				
Tres Reyes 1	1	Hueso	Sí	C1
	2	Hueso	Sí	A2
	4	Hueso	Sí	C1
	6	Hueso	Sí	D1
	8	Hueso	Sí	D1
	9	Hueso	Sí	C1 (2)

(1) Probable contaminación con ADN exógeno. (2) Haplogrupo inferido por coincidencia parcial de secuencia de HVRI (ver *infra*, sección 4.2.2).

Tabla 4.1.c. Resultados del análisis de los extractos de ADN de muestras del Este del Uruguay realizados por Bernardo Bertoni. Los resultados publicados por Bertoni et al. (2004) se marcan con un asterisco (\*).

Sitio	Individuo	Material	ADN	Haplogrupo
CH2D01-A	4	Diente	Sí	B
	3	Hueso	Sí	B
	12	Hueso	Sí	B2 (1)*
	13	Diente	Sí	C1d (1)*
	16	Diente	Sí	s/d
	17	Diente	Sí	B
	19A	Diente	Sí	C1 (1)*
	20	Diente	Sí	C1d (1)*
	18B	Hueso	Sí	C1 (1)
CG14E01	1	Diente	Sí	K (2)
	3	Diente	Sí	B
	4	Diente	Sí	B
	9	Diente	Sí	s/d
	13	Diente	Sí	A
	Urna	Diente	Sí	B

Los haplogrupos fueron obtenidos por PCR-RFLP salvo los casos indicados. (1) Haplogrupo determinado por secuencia de la HVRI. (2) Contaminación con ADN del investigador. (3) Probable contaminación con ADN exógeno.

Setenta y nueve extractos rindieron ADN de acuerdo a la amplificación control inicial realizada con los cebadores del haplogrupo C, indicando así una la presencia en los extractos

de fragmentos de, como mínimo, 100 pb (extractos marcados como “S” en el campo “ADN” de la tabla 4.1). Sin embargo, varios factores descritos al detalle abajo redujeron notablemente la tasa de éxito, por lo que de los 79 extractos inicialmente positivos, se pudo determinar la probable autenticidad de un total de 45, alcanzando una tasa de éxito global de 50,6%. Los extractos descartados se dividen en casos de contaminación y casos en los que el haplogrupo no pudo determinarse (sea por PCR-RFLP o por secuencia). Discutiremos a continuación los extractos descartados, para luego concentrarnos en los análisis que culminaron en la determinación exitosa de haplogrupo y/o linaje.

#### 4.1.1. CONTAMINACIÓN DE LOS EXTRACTOS

##### 4.1.1.1. CONTAMINACIÓN DE LOS BLANCOS DE EXTRACCIÓN

De un total de 29 tandas de extracción realizados en el laboratorio de Montevideo, 20 (69%) mostraron contaminación del control de extracción. Esta cifra es comparable con la obtenida de contaminación de los blancos de extracción en el laboratorio de Salt Lake City, donde 4 de 8 extracciones (50%) resultaron contaminadas. Si bien la diferencia en proporciones es alta, no es estadísticamente significativa (test exacto de Fisher: *odds-ratio* = 2,17;  $p = 0,413$ ).

Dado lo relativamente frecuente de la contaminación del blanco de extracción, y no se rastreó el origen de la misma, concentrándose el trabajo en el haplotipado de las muestras. Sin embargo, en el transcurso del trabajo en la Universidad de Utah, se secuenció el segmento HVR1\_P3F (ver *supra*, tabla 3.9) de tres de los cuatro blancos de extracción contaminados, con resultados diversos (Tabla 4.2): La secuencia del blanco del 12 de febrero carece de mutaciones que la distingan de la rCRS, apuntando a la contaminación por una fuente que no es ni el investigador ni una de las muestras analizadas. La secuencia del blanco del 23 de febrero coincide parcialmente con la secuencia de la muestra TR2 (el blanco carece de la mutación 16362C, presente en la muestra). El blanco de la penúltima tanda de extracciones realizada en Salt Lake City (8 de marzo) presenta identidad completa con el

individuo TR8, de la misma fecha. Por lo tanto, la contaminación cruzada o *carryover* daría cuenta de dos de tres eventos de contaminación de los blancos.

Tabla 4.2: mutaciones halladas en el segmento 16289-16400 en tres blancos de extracción de la Universidad de Utah. Las posiciones señaladas siguen la numeración de la secuencia de referencia (Anderson et al. 1981).

Fecha extr.	Motivo (np 16000+)	Muestra coincidente	Fecha de la muestra coincidente
12/02/2011	-	Ninguna	12/02/2011
23/02/2011	319A	TR2*	23/02/2011
08/03/2011	291T – 294T – 362C	TR8**	08/03/2011

(\*) Coincidencia parcial (explicación en el texto). (\*\*) Coincidencia completa.

#### 4.1.1.2. CONTAMINACIÓN DE LAS MUESTRAS

De las muestras analizadas, 18 fueron presuntamente contaminadas por ADN exógeno (de investigadores previos al análisis de ADN o del investigador a cargo de dicho análisis), en tanto que se determinó con seguridad la contaminación por parte del investigador en 7 muestras. La contaminación de las 18 muestras se presume a partir del hecho de que los PCR-RFLP realizados a las mismas dieron resultado negativo para los 4 haplogrupos fundadores americanos; partiendo de la presunción de que se trata de muestras precolombinas, debería considerarse improbable que se trate de extractos auténticos. La contaminación con ADN del investigador se comprobó al constatar la presencia de dos o más mutaciones del motivo 16111T-16189C-16224C-16311C, correspondiente a su linaje de ADNmt,<sup>2</sup> en ausencia de mutaciones diagnósticas de haplogrupos indígenas en los mismos segmentos de la HVRI.

En ocasiones se observó directamente la contaminación con ADN exógeno en forma de señales dobles en las secuencias, o en forma de mutaciones de haplogrupos diferentes (indígenas o no) en las secuencias de sucesivos productos de PCR. Todos estos fenómenos se han observado en las muestras analizadas en este trabajo (ver *infra*, sección 4.1.5.2).

<sup>2</sup> De acuerdo a la base de datos *on line* PhyloTree, versión 15 (<http://www.phylotree.org>; (van Oven y Kayser 2009), este motivo se corresponde estrechamente con el linaje K1a2a1, perteneciente al haplogrupo europeo K.

En resumen, se pueden distinguir tres fuentes de contaminación, todas ellas observadas en el presente trabajo: a) ADN exógeno proveniente de individuos que han manipulado la muestra en forma previa a su análisis; b) ADN exógeno proveniente del investigador (al momento de la extracción o en manipulaciones posteriores del extracto); c) ADN exógeno a la muestra pero endógeno a otra muestra manipulada en forma simultánea, ya sea en extracción o en PCR.

#### 4.1.2. INFLUENCIA DEL TEJIDO DE PARTIDA EN EL ÉXITO DE LA EXTRACCIÓN

Como ya fue mencionado, el presente trabajo de Tesis se orientó preferentemente hacia el uso de hueso (fundamentalmente falanges, metacarpos y fragmentos de costilla) frente al uso de dientes para la extracción de ADN. No se halló una diferencia estadísticamente significativa a favor del uso de dientes, si bien su eficiencia fue mayor, superando en tasa de éxito al hueso (diente:  $15/27 = 55,6\%$ ; hueso:  $26/62 = 41,9\%$ ; test exacto de Fisher: *odds-ratio* = 1,72;  $p = 0,257$ ).

#### 4.1.3. INFLUENCIA DEL PROTOCOLO EN EL ÉXITO DE LA EXTRACCIÓN

De los tres protocolos de extracción empleados, el protocolo de fenol-cloroformo fue el empleado en la mayoría de las extracciones, con una tasa de éxito de  $33/72$  (45,8%), en tanto que la tasa de éxito con el *kit* comercial empleado en la Universidad de Utah fue de  $10/15$  (66,7%). Esta diferencia, resultante en un *odds-ratio* de 2,34 a favor del *kit*, es sugestiva sin alcanzar a ser significativa ( $p = 0,166$ ). Por último, si bien rindió dos resultados positivos en un total de 9 individuos analizados (22,2%), el tercer protocolo de extracción, basado en el uso de *buffers* descriptos en la literatura (Rohland y Hofreiter 2007b) en combinación con columnas de sílice destinadas a la purificación de productos de PCR (Yang et al. 1998) se encuentra a la fecha en puesta a punto, motivo por el cual no se incluye en la comparación de tasas de éxito. Debe mencionarse que no fue el éxito comparativo del *kit* GeneClean® el que condujo a ensayar esta adaptación, sino su menor manejo de materiales

volátiles y su economía en términos operativos, reduciendo la complejidad de los pasos involucrados.

#### 4.1.4. ÉXITO DE LAS EXTRACCIONES EN COMPARACIÓN CON OTROS TRABAJOS

La tasa de éxito general en las extracciones de ADN del presente trabajo fue de 53%. Esta cifra supera levemente a la de 50,6% presentada previamente en virtud de que no se toma en cuenta en este caso el número de extractos (ya que hubo réplicas de individuos ya analizados) sino el número de individuos. Esta cifra se encuentra en el percentil 24 de las tasas de éxito de diversos trabajos realizados sobre muestras americanas en el correr de los últimos 17 años (Tabla 4.3), lo cual la hace una tasa de éxito relativamente pobre. No se observa correlación entre la antigüedad de la muestra (medida como el punto medio del rango de antigüedades de la misma) y el éxito de la extracción ( $r_s = 0,042$ ;  $p = 0,851$ ). Al subdividir la tasa de éxito por método (PCR-RFLP y secuencias de la HVRI), la tasa de éxito general se reduce a 36% empleando RFLP y 17% empleando secuencias, tasas de éxito ubicadas aproximadamente en el sexto inferior a nivel de los análisis realizados en América. No hay correlación significativa entre tasa de éxito y antigüedad de las muestras al subdividir por método, si bien hay una tendencia al incremento del éxito a antigüedades menores en el caso de las secuencias (PCR-RFLP:  $r_s = -0,189$ ;  $p = 0,498$ ; secuencias:  $r_s = -0,336$ ;  $p = 0,221$ ).

En el caso de este trabajo, la falta de asociación *grosso modo* entre antigüedad y éxito es evidente en el hecho de que una muestra tardía como la de Brasil tenga la tasa de éxito más reducida. Sería deseable un análisis del éxito de la extracción contra la antigüedad de cada una de las piezas, pero la resolución cronológica de la muestra total es deficiente: sólo se cuenta con una alta densidad de fechados radiocarbónicos directos en la muestra argentina. En segundo lugar, la heterogeneidad de condiciones de las muestras en términos de antigüedad, profundidad, tipo de suelo (donde los factores fundamentales serían pH, humedad y temperatura media – MacHugh et al. 2000), manipulación (durante y después de la recuperación) y preservación posterior son lo suficientemente variadas como para que no sea posible discernir con claridad los efectos de cada uno de estos efectos en la calidad de los extractos.

Tabla 4.3: Tasa de éxito del presente trabajo en comparación con diversos trabajos en muestras de América.

Muestra	Ref.	N inicial	Cronología aprox. (a.A.P.)	% éxito (RFLP)	% éxito (sec)	% éxito (gral)
Noroeste argentino	[1]	21	1600-1350	-	90%	90%
Sur Perú	[2]	218	2800-1200	-	60%	60%
Sur Perú, intermedio	[3]	41	1350-1000	-	73%	73%
Sur Perú, tardío	[3]	49	1000-600	-	86%	86%
Tierra del Fuego, reciente	[4]	60	200-100	-	40%	40%
Posclásico Maya, México	[5]	28	1350-400	89%	-	89%
Conchopata, Perú	[6]	49	1400-1000	-	39%	39%
Wari, Perú	[6]	19	900-600	-	95%	95%
Tierra del Fuego, arqueológico	[7]	2	5000-4030	100%	-	100%
Tierra del Fuego, reciente	[7]	73	200-100	79%	-	79%
Chen Chen, Perú	[8]	94	1215-1000	41%	-	41%
Norte de Chile	[9]	42	2900-600	76%	-	76%
Norte de Chile	[10]	83	3900-500	73%	33%	73%
Córdoba	[11]	44	3360-345	80%	-	80%
Sudoeste EE.UU	[12]	47	1550-600	60%	-	60%
Valle del Urubamba	[13]	57	500	61%	61%	61%
Noreste EE.UU.	[14]	152	650	67%	34%	67%
<b>Pampa (Holoceno tardío)</b>	<b>(*)</b>	<b>9</b>	<b>2500-2000</b>	<b>22%</b>	<b>89%</b>	<b>89%</b>
<b>Uruguay (Holoceno tardío)</b>	<b>(*)</b>	<b>38</b>	<b>2000-300</b>	<b>45%</b>	<b>18%</b>	<b>63%</b>
<b>Pampa (Holoceno temprano)</b>	<b>(*)</b>	<b>24</b>	<b>7800-6300</b>	<b>42%</b>	<b>0%</b>	<b>42%</b>
<b>Brasil (Holoceno tardío)</b>	<b>(*)</b>	<b>14</b>	<b>2500-200</b>	<b>14%</b>	<b>7%</b>	<b>21%</b>
<b>Pampa (total)</b>	<b>(*)</b>	<b>85</b>	<b>7800-300</b>	<b>36%</b>	<b>17%</b>	<b>53%</b>

Referencias: [1] Carnese et al. (2010); [2] Fehren-Schmitz et al. (2010); [3] Fehren-Schmitz et al. (2011); [4] García-Bour et al. (2004); [5] González-Oliver et al. (2001); [6] Kemp et al. (2009); [7] Lalueza et al. (1997); [8] Lewis et al. (2007a); [9] Moraga et al. (2001); [10] Moraga et al. (2005); [11] Nores y Demarchi (2011); [12] Parr et al. (1996); [13] Shinoda et al. (2006); [14] Stone y Stoneking (1998); (\*) Presente trabajo.

#### 4.1.5. MUESTRAS EXCLUIDAS DEL PRESENTE ANÁLISIS

Además de las muestras descartadas por contaminación, otras 13 muestras fueron excluidas de los análisis de este trabajo, por motivos que se explican a continuación.

##### 4.1.5.1. MUESTRAS ALTAMENTE DEGRADADAS

Un total de 7 muestras fueron descartadas por lo que se supone es una alta degradación de las mismas. Estas muestras tienen la característica de haber sido

amplificadas con los cebadores de la región diagnóstica del haplogrupo C (100 pb) y eventualmente con el par correspondiente a la región diagnóstica del haplogrupo B (122/113 pb), resultando negativas para estos haplogrupos, y fracasando repetidamente la amplificación a fin de diagnosticar los haplogrupos A (144 pb) y D (179 pb). Si bien es posible explicar este fracaso por otros factores, como por ejemplo la presencia de un polimorfismo en la región de hibridación de uno o varios cebadores, el grado de fragmentación del ADN molde ofrece una explicación plausible.

#### 4.1.5.2. MUESTRAS DESCARTADAS POR OTROS MOTIVOS<sup>3</sup>

Seis muestras (señaladas como “s/d” y carentes de otras observaciones en la tabla 4.1) fueron excluidas del análisis por motivos diversos, diferentes a los anteriormente expuestos. En virtud de su pequeño número y su diversidad de características, se expone brevemente cada caso.

*Estancia “El Cerro”, esqueleto 1:* Se obtuvo diagnóstico negativo para los haplogrupos A, B y C, fallando repetidamente el diagnóstico para el haplogrupo D. Ciganda (2009) amplificó y secuenció el segmento 16132-16302 de la HVRI, reconociendo solamente la mutación 16223T, asociada a los haplogrupos indígenas A, C y D. Se descarta su pertenencia al haplogrupo A por la ausencia de la mutación 16290T, y su pertenencia al haplogrupo C por la ausencia de la mutación 16298C. No logró amplificarse el segmento solapante siguiente, quedando pendiente su diagnóstico respecto al haplogrupo D.

*Estancia “El Cerro”, esqueleto 2:* Se obtuvo un diagnóstico negativo para los cuatro haplogrupos. En sucesivas amplificaciones de los segmentos 16210-16355 y 16132-16302, Ciganda (2009) reconoció la presencia de las mutaciones 16217 (diagnóstica del haplogrupo B) y 16274 en el primero, y la mutación 16223T, presente en los haplogrupos indígenas A, C y

---

<sup>3</sup> Una parte sustancial de los resultados de esta sección, y citada en cada caso, es producto del trabajo de Ana Lía Ciganda, realizado en el marco de su pasantía de la Licenciatura en Biología Humana, bajo mi supervisión y con la tutoría de Mónica Sans, durante el año 2008.

D, en el segundo. Se presume que el extracto contiene, por contaminación *carryover*, ADN de dos individuos, uno del haplogrupo B y otro posiblemente del haplogrupo D.

*Colonia Concordia, esqueletos 47992 y 47996A*: Se obtuvo diagnóstico negativo para los haplogrupos A, B y C, fallando repetidamente el diagnóstico para el haplogrupo D. Se excluye momentáneamente de los análisis al no poder determinarse el haplogrupo, y no es posible por el momento descartar ni confirmar contaminación.

*Colonia Concordia, esqueleto 51983*: Se obtuvo diagnóstico negativo para los haplogrupos A, C y D, fallando repetidamente la amplificación del segmento portador del haplogrupo B. Ciganda (2009) amplificó y secuenció el segmento 16210-16355 de la HVRI, reconociendo las mutaciones 16223T, 16278T y 16290T, asociadas al haplogrupo indígena A. La ausencia de la mutación 16319A y el diagnóstico negativo por PCR-RFLP llevó a su descarte provisional del análisis.

*CH2D01-A, esqueleto 16*: Se obtuvo diagnóstico negativo para los cuatro haplogrupos. En sucesivas amplificaciones de los segmentos 16210-16355 y 16132-16302, Ciganda (2009) reconoció la ausencia de mutaciones diagnósticas en el primero, y las mutaciones 16223T y 16290T, asociados al haplogrupo A, en el segundo. Se presume que el extracto contiene, por contaminación *carryover*, ADN de dos individuos, uno del haplogrupo A y otro exógeno, eventualmente de la propia investigadora.

*CG14E01, esqueleto 9*: La secuencia de este individuo de sexo femenino publicada por Bertoni et al. (2004) abarca las posiciones 16202 a 16290, presentando la mutación 16212G y ninguna mutación asociada a haplogrupos americanos. La reextracción de ADN de este esqueleto practicada en la Universidad de Utah y la secuenciación del segmento 16183-16402 arroja la presencia de la mutación 16223T, pero ninguna otra mutación asociada a haplogrupos indígenas ni la reportada por Bertoni et al. (2004), quedando incierta la determinación de haplogrupo. La asociación de este esqueleto con elementos de contacto sugiere la posibilidad de que no se trate de restos indígenas (Cabrera Pérez et al. 2013 en prensa).

## 4.2. ANÁLISIS DEL ADN

La estrategia inicial propuesta para este trabajo era obtener secuencias de la HVRI para la totalidad de los restos de la muestra. Sin embargo, dados los costos (en términos de fuerza de trabajo y dinero) de la obtención de estas secuencias, y en virtud de los problemas de contaminación arriba mencionados, se optó por comenzar analizando las muestras por PCR-RFLP. El análisis de secuencias se realizó sobre un juego limitado de muestras de especial interés, como se expone más abajo.

### 4.2.1. ANÁLISIS POR PCR-RFLP

Como se puede apreciar en las tablas 4.1.a y 4.1.c, 24 de las 27 muestras cuyo haplogrupo fue determinado en el laboratorio de Montevideo fueron analizadas por PCR-RFLP. Estas muestras incluyen casos en los que no se pudo realizar la amplificación de todos los segmentos portadores de sitios de restricción diagnósticos, o donde, al haber determinación positiva para otro haplogrupo, se omitió la amplificación del marcador (Tabla 4.4).

Si se tienen en cuenta los tamaños de los fragmentos portadores de los sitios de restricción diagnósticos (A: 144 pb; B: 113/122 pb; C: 100 pb; D: 179 pb; ver *supra*, tabla 3.6), se observa un aumento en la tasa de fracaso en las amplificaciones con el tamaño del amplicón. Al considerar únicamente el éxito o el fracaso sin considerar el número de intentos necesarios para realizar la amplificación, se observa una aparente – pero no significativa – asociación entre tamaño y tasa de éxito ( $\chi^2 = 5,36$ ;  $gl = 2$ ;  $p = 0,069$ ). No hay, por otra parte, asociación entre el número de intentos y el tamaño del amplicón ( $r_s = 0,033$ ,  $p = 0,823$ ).

Tabla 4.4: resultados de los PCR-RFLP de los extractos de ADN analizados en Uruguay.

Sitio	Individuo	A	B	C	D	Haplogrupo
<i>Uruguay (Oeste)</i>						
Estancia "El Cerro"	2B	-	-	-	+	D
Campo Morgan	15736	-	-	+	-	C

Los Cardos	1	-	-	+	-	C
Colonia Concordia	37974	-	+	-	0	B
	47994	-	+	-	0	B
	47996B	+	-	-	-	A
Arroyo Yaguareté	1	0	-	-	+	D
<i>Uruguay (Este)</i>						
CH2D01-A	3	-	+	-	-	B
	4	-	+	-	-	B
	17	-	+	-	-	B
	18A	+	-	-	-	A
CH2D01-B	B-IV	-	-	+		C
CG14E01	3	0	+	-		B
	4	-	+	-	-	B
	13	+	-	-	0	A
	Urna	-	+	-	0	B
Puntas del San Luis	sub. II	+		-	0	A
<i>Región pampeana argentina, Holoceno temprano</i>						
Arroyo Seco 2	6	-	0	+	-	C
	7	-	+	-	0	B
<i>Región pampeana argentina, Holoceno tardío</i>						
Tres Reyes 1	1	-	-	+		C
	2	+	-	-		A
Córdoba	Agroalfarero	0	+	-		B
	Holoceno medio/tardío	0	-	+		C
<i>Rio Grande do Sul, Holoceno Tardío</i>						
RS-A-34	4372 – H	0	+	-	0	B
	s/etiqueta	0	0	+	0	C

(+): determinación positiva del haplogrupo. (-): determinación negativa del haplogrupo. (0): sin amplificación exitosa para el haplogrupo. Celda en blanco: se omitió la amplificación del marcador del haplogrupo.

#### 4.2.2. SECUENCIAS DE LA HVRI

Los esfuerzos iniciales dirigidos a la secuenciación de la HVRI de los extractos rindió resultados muy poco satisfactorios, en general conteniendo múltiples señales y curvas poco definidas, requiriendo un gran esfuerzo de edición a mano que en muchas ocasiones no resultaba en una secuencia alineable (Figura 4.1), además de los casos en que se comprobó contaminación por parte del investigador. Por lo tanto, se obtuvieron muy pocas secuencias utilizables, que se suman a aquellas obtenidas por Bertoni et al. (2004) y se detallan en la tabla 4.5.

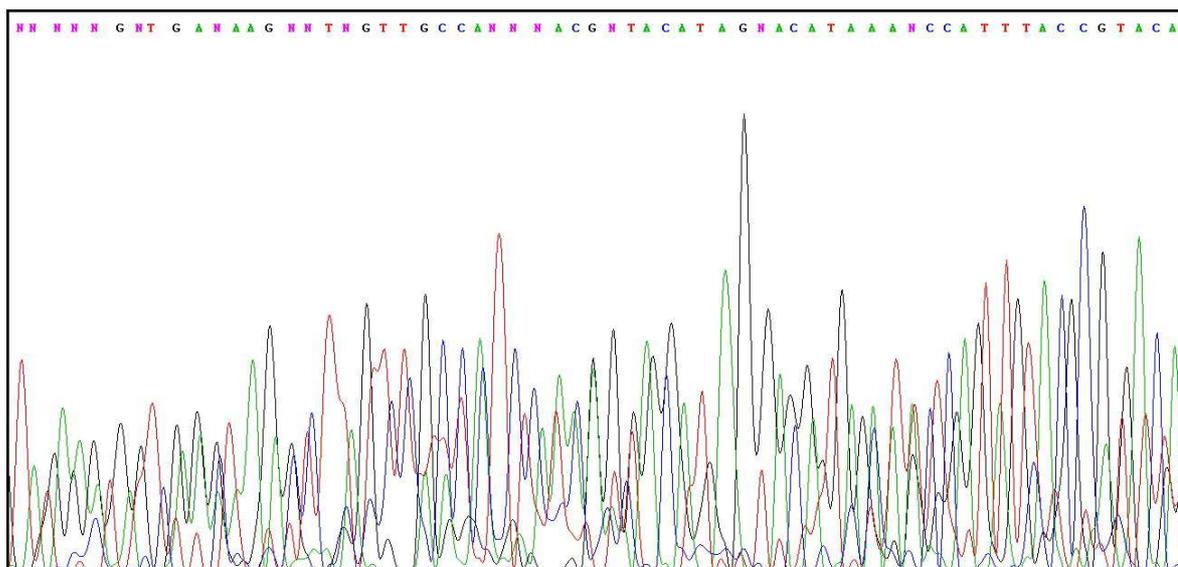


Figura 4.1: Ejemplo de secuencia obtenida de los extractos de Montevideo. Obsérvese la alta cantidad de ambigüedades en la lectura “cruda”.

Tabla 4.5: Segmentos y motivos de secuencia válidos obtenidos en Montevideo [1] y secuencias indígenas obtenidas por (Bertoni et al. 2004) [2].

Muestra	Extensión secuenciada	Mutaciones	Hg	Fuente
CH2D01-12	16202-16290	16217C	B2	[2]
CH2D01-13	16192-16355	16223T-16288C-16298C-16325C-16327T	C1	[2]
CH2D01-13 (2ª extracción)	16036-16218 16262-16371	16051G-16140C-16288C-16298C-16325C-16327T	C1	[1]
CH2D01-19 A	16195-16341	16223T-16250T-16298C-16325C-16327T	C1	[2]
CH2D01-20	16195-16355	16223T-16288C-16298C-16325C-16327T	C1	[2]
CH2D01-20 (2ª extracción)	16036-16204	16051G		[1]
CH2D01-18B	16192-16355	16223T-16298C-16311C-16325C-16327T	C1	[1]
Yaguareté	16127-16331	16189C-16217C	B2	[1]
4372-B	16127-16331	16223T-16298C-16325C-16327T	C1	[1]

En el laboratorio de la Universidad de Utah, la secuenciación es el procedimiento estándar, no efectuándose en la actualidad el análisis de fragmentos de restricción. En contraste con la situación experimentada en Montevideo, el trabajo en este laboratorio rindió un número importante de secuencias utilizables, alcanzando éstas el 90% del total de las secuencias realizadas. La tabla 4.6 detalla los segmentos y los motivos de las secuencias válidas obtenidas en Salt Lake City.

Tabla 4.6: Segmentos y motivos de secuencia válidos obtenidos en el laboratorio de Salt Lake City.

Muestra	Extensión secuenciada	Mutaciones	Hg
CH2D01-12 (2ª extracción)	16043-16402	16051G-16140C-16184T-16223T- 16288C-16298C-16325C-16327T-16362C	C1
CH2D01-13 (3ª extracción)	16043-16402	16051G-16140C-16224C-16288C- 16298C-16325C-16327T-16353T	C1
CH2D01-20 (3ª extracción)	16043-16402	16223T-16288C-16298C-16325C-16327T- 16366T	C1
CG14E01-13 (2ª extracción)	16183-16402	16209C-16223T-16304C-16362C	D1*
Tres Reyes 1	16043-16402	16092C-16223T-16298C-16325C-16327T	C1
Tres Reyes 2	16043-16402	16111T-16153A-16223T-16290T-16295T- 16319A-16362C	A2
Tres Reyes 4	16043-16402	16223T-16298C-16325C-16327T	C1
Tres Reyes 6	16183-16402	16223T-16325C-16362C	D1
Tres Reyes 8	16183-16402	16223T-16291T-16294T-16362C-16373A	D1*
Tres Reyes 9	16043-16279	16051G-16223T-16259T	C1*

(\*) Asignación de haplogrupo estimativa, basada en la existencia de equivalentes en poblaciones modernas.

En cuanto a las secuencias obtenidas, es necesario hacer las siguientes observaciones a fin de establecer una clasificación definitiva de algunas muestras a los fines de este análisis:

Las secuencias de los sucesivos extractos de los individuos *CH2D01-13* y *CH2D01-20* resultan en dos secuencias consenso levemente diferentes entre sí. Ambos presentarían el motivo 16051G-16223T-16288C-16298C-16325C-16327T, con la presencia de 16140C en el individuo 13. Si bien la mutación 16051G aparece en una sola de las réplicas del individuo 20, su autenticidad es reafirmada por la presencia de esta mutación en el individuo 13 y en todas las secuencias modernas con el motivo 16223T-16288C-16298C-16325C-16327T. La mutación 16051G ubica a estas secuencias dentro del subhaplogrupo C1d, presente en poblaciones indígenas de toda América (Figueiro et al. 2011), y la mutación 16288C corresponde a un linaje local, restringido a Uruguay, de este subhaplogrupo (Sans et al. 2012).

Las sucesivas reextracciones del individuo rotulado *CH2D01-12* no coinciden, siendo la mutación identificada en la secuencia publicada por Bertoni et al. (2004) correspondiente al haplogrupo B2 y la secuencia de la extracción de Utah muy semejante a la del individuo

13. Los individuos 12 y 13 del sitio CH2D01 forman parte de un entierro de por lo menos dos individuos adultos mezclados. Las diferencias de las secuencias de Utah del individuo 12 y el 13 pueden, al tratarse de transiciones C→T, ser errores de amplificación debidos al daño *post-mortem* del ADN (Hofreiter et al. 2001). Por consiguiente, se asume que las secuencias de Utah son del mismo individuo, identificado como individuo 13, y se conserva el diagnóstico de haplogrupo B2 para el individuo 12. Para los fines del análisis de secuencias, se presume que la muestra tiene el motivo ancestral de secuencia HVRI; además de 16217C, se atribuye a la muestra la mutación 16189C.

La reextracción a partir de fragmentos de hueso largo del esqueleto del *Arroyo Yaguareté* arrojó una secuencia correspondiente al haplogrupo B2, diferente de la determinación original de haplogrupo D, realizada por PCR-RFLP. Dado lo fragmentario de los restos de este individuo, no puede descartarse que el cráneo y el poscráneo sean de individuos diferentes, por lo que se incorporó este resultado como perteneciente a otro individuo.

El *individuo 8 de Tres Reyes* y la reextracción en Utah del *esqueleto 13 de CG14E01* pueden ser clasificados, a pesar de la ausencia de la mutación diagnóstica 16325C, como pertenecientes al haplogrupo D1. Esto se debe a su semejanza con linajes regionales del subhaplogrupo D1 carentes de dicha mutación (ver *infra*, p. 114), y debido a la ausencia de las mutaciones 16301T y 16342C asociada al subhaplogrupo D4h3, y de la mutación 16319A asociada al subhaplogrupo D4b1. El primer extracto de CG14E01-13 fue diagnosticado como haplogrupo A por PCR-RFLP: en virtud de que los extractos fueron realizados a partir de materiales diferentes (diente y costilla, respectivamente), no puede descartarse que estemos frente a extractos de ADN de dos individuos. Por ello, se incorpora este nuevo resultado a la muestra del Este de Uruguay.

Por último, el extracto del *individuo 9 de Tres Reyes* realizado en Montevideo resultó contaminado con ADN del investigador. La secuencia de la reextracción en la Universidad de Utah arrojó las mutaciones 16051G, 16223T y 16259T; estas tres mutaciones en conjunto se asocian únicamente a un linaje del subhaplogrupo C1d (Figueiro et al. 2011). Aún al no haberse podido secuenciar una mayor extensión, se asigna la muestra al haplogrupo C.

En síntesis, se logró por la vía de PCR-RFLP y análisis de secuencias de la HVRI determinar el haplogrupo de 45 individuos. El resumen de los conteos de haplogrupos por cada método se presenta en la tabla 4.7.

Tabla 4.7: Resumen de las determinaciones de haplogrupo por PCR-RFLP y secuencia de la HVRI.

<b>Método</b>	<b>Hg A</b>	<b>Hg B</b>	<b>Hg C</b>	<b>Hg D</b>	<b>Total</b>
PCR-RFLP	4	14	10	3	31
Secuencia HVRI	1	2	8	3	14
<b>TOTAL</b>	<b>5</b>	<b>16</b>	<b>18</b>	<b>6</b>	<b>45</b>

## 4.3. ANÁLISIS DE LOS DATOS

### 4.3.1. ANÁLISIS DE LAS FRECUENCIAS DE HAPLOGRUPOS

#### 4.3.1.1. PERFILES DE HAPLOGRUPOS POR REGIÓN

En vista de lo discutido en las secciones anteriores, los resultados globales del análisis de ADN arrojan las frecuencias de haplogrupos por período y región que se muestran en la tabla 4.8.

Tabla 4.8: Conteos de haplogrupos por período y región, a emplear para los análisis comparativos.

Sitio	N inicial	A	B	C	D	N final
<i>Uruguay (Oeste)</i>						
Estancia "El Cerro"	3				1	1
Campo Morgan	1			1		1
Los Cardos	2			1		1
Colonia Concordia	10	1	2			3
Arroyo Yaguareté	2*		1		1	2*
Total región	18	<b>1 (12,5%)</b>	<b>3 (37,5%)</b>	<b>2 (25%)</b>	<b>2 (25%)</b>	<b>8</b>
<i>Uruguay (Este)</i>						
CH2D01	12	1	3	6		10
CG14E01	7*	1	3		1	5*
Puntas del San Luis	1	1				1
Total región	20	<b>3 (18,7%)</b>	<b>6 (37,5%)</b>	<b>6 (37,5%)</b>	<b>1 (6,3%)</b>	<b>16</b>
<i>Región pampeana argentina, Holoceno temprano</i>						
Arroyo Seco 2	24		5	4	1	10
Total región	24	<b>0</b>	<b>5 (50%)</b>	<b>4 (40%)</b>	<b>1 (10%)</b>	<b>10</b>
<i>Región pampeana argentina, Holoceno tardío</i>						
Laguna Tres Reyes 1	7	1		3	2	6
Córdoba	2		1	1		2
Total región	9	<b>1 (12,5%)</b>	<b>1 (12,5%)</b>	<b>4 (50%)</b>	<b>2 (25%)</b>	<b>8</b>
<i>Rio Grande do Sul, Holoceno tardío</i>						
RS-A-34	12		1	2		3
RS-LS-85	2					0
Total región	14	<b>0</b>	<b>1 (33,3%)</b>	<b>2 (66,7%)</b>	<b>0</b>	<b>3</b>
<b>Total global</b>	<b>85</b>	<b>5 (11,1%)</b>	<b>16 (35,6%)</b>	<b>18 (40%)</b>	<b>6 (13,3%)</b>	<b>45</b>

(\*) Se suma un individuo al tamaño muestral original del sitio (ver *supra*, p. 98).

En virtud de estos resultados, se resolvió a fines comparativos trabajar con las frecuencias de haplogrupos de tres conjuntos de muestras: la muestra pampeana del Holoceno temprano, representada por Arroyo Seco 2, la muestra pampeana argentina del Holoceno tardío, que incluye los individuos de Tres Reyes 2 y Córdoba, y la muestra del Uruguay, que cuenta con dos componentes: Este y Oeste. Debido a que los restos de Rio Grande do Sul fueron recuperados de “cerritos de indios”, manifestación arqueológica que se extiende hasta el Uruguay y a la que también corresponden los restos del Este de Uruguay, se incluirán los tres resultados de Brasil a la muestra del Este de Uruguay. Por último, si bien se analizarán las afinidades de ambos componentes regionales de Uruguay, también se colapsarán las muestras regionales para analizar la muestra de Uruguay como una sola, puesto que las diferencias entre Este y Oeste no son estadísticamente significativas (incluyendo Brasil en la muestra del Este:  $X^2 = 2,46$ ;  $gl = 3$ ;  $p = 0,483$ ; excluyendo Brasil:  $X^2 = 1,875$ ;  $gl = 3$ ;  $p = 0,599$ ). La composición de haplogrupos de estas agrupaciones poblacionales puede observarse en la figura 4.2; la figura 4.3 muestra las frecuencias de haplogrupos de las muestras analizadas en el contexto geográfico de las muestras antiguas y modernas empleadas para comparación.

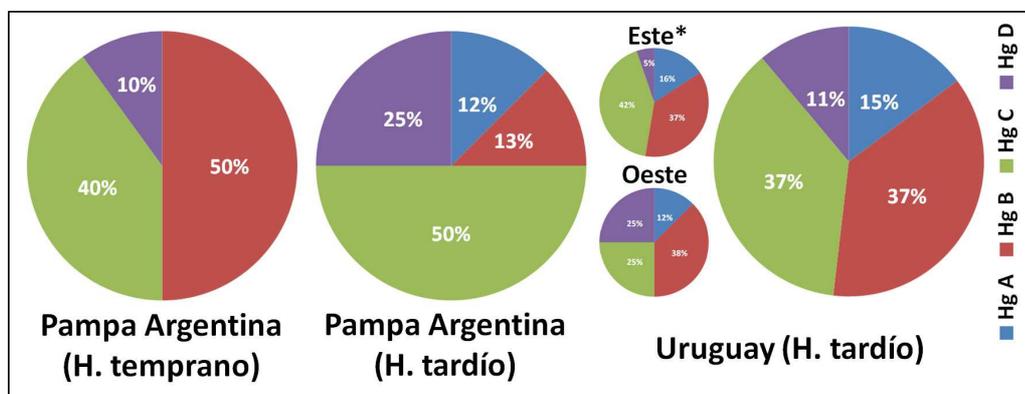


Figura 4.2: Frecuencias de los haplogrupos A, B, C y D en la totalidad de la muestra analizada. (\*) La muestra del Este del Uruguay incorpora los resultados de Brasil.

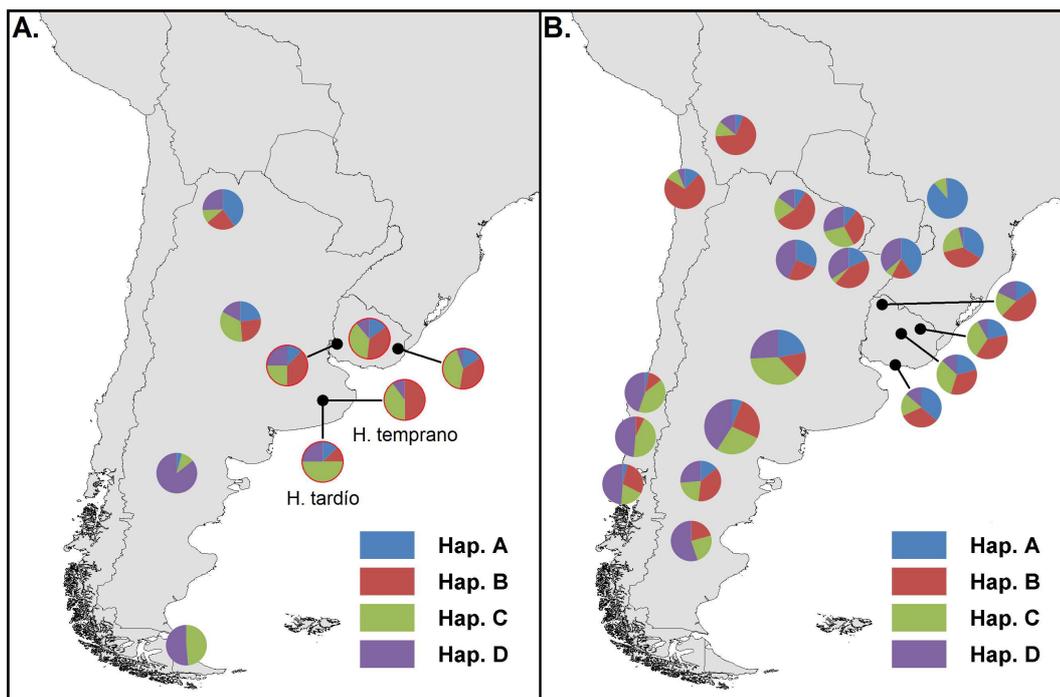


Figura 4.3: Frecuencias de haplogrupos de todas las muestras incluidas en este trabajo. A: Muestras antiguas. Las gráficas con borde rojo representan resultados de los análisis de este trabajo. B: Muestras modernas. Las gráficas de mayor tamaño representan frecuencias regionales. Para detalles y referencias, ver *supra*, figura 3.2.

Una vez colapsadas las regiones Este y Oeste del Uruguay, se realizó la comparación entre las frecuencias de haplogrupos de la muestra prehistórica del Uruguay y las de la población uruguaya actual. Las frecuencias resultaron ser estadísticamente indistinguibles (incluyendo Brasil en la muestra del Este:  $\chi^2 = 1,456$ ;  $gl = 3$ ;  $p = 0,692$ ; excluyendo Brasil:  $\chi^2 = 0,575$ ;  $gl = 3$ ;  $p = 0,902$ ) (Figura 4.4).

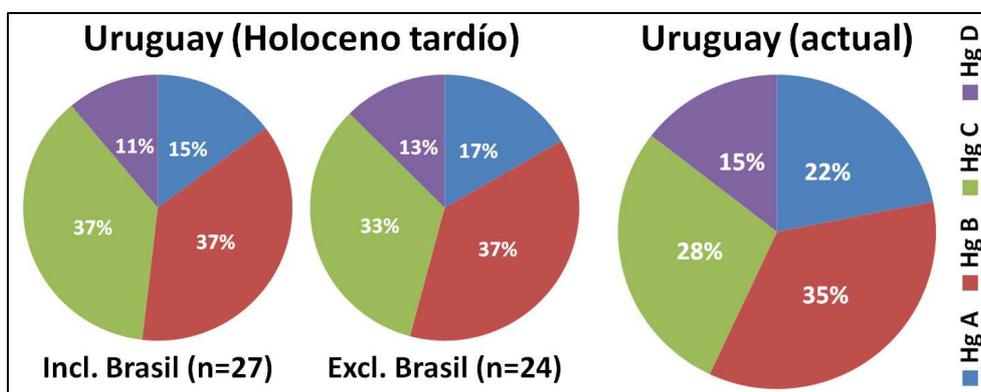


Figura 4.4: Frecuencias de los haplogrupos A, B, C y D en las muestras antigua y moderna del Uruguay.

## 4.3.1.2. DIVERSIDAD DE HAPLOGRUPOS DE LAS MUESTRAS Y SU CONTEXTO DEL CONO SUR

La diversidad de haplogrupos  $h$  de las muestras analizada, y las de las poblaciones usadas en el análisis comparativo, se detallan en la tabla 4.9.

Tabla 4.9: Diversidad de haplogrupos  $h$  de las poblaciones analizadas y la muestra comparativa, ordenadas de menor a mayor. Las poblaciones objeto de este trabajo se señalan en negrita.

<b>Población</b>	<b>N</b>	<b>%A</b>	<b>%B</b>	<b>%C</b>	<b>%D</b>	<b><math>h</math></b>
Guaraní (Br.)	176	88,8	0,0	10,1	1,1	0,202
Atacameño	50	12,0	72,0	10,0	6,0	0,463
Aymara	172	5,8	68,0	12,2	14,0	0,503
Tierra del fuego	68	0,0	0,0	48,5	51,5	0,507
Mapuche (Ch.)	111	0,0	7,2	44,1	48,6	0,569
Tehuelche	29	0,0	20,7	24,1	55,2	0,616
Wichí (Formosa)	67	9,0	56,7	19,4	14,9	0,620
Pehuenche	105	2,9	11,4	41,0	44,8	0,623
Patagonia (prehist.)	40	17,5	0,0	45,0	37,5	0,642
<b>Pampa (H. temprano)</b>	<b>10</b>	<b>0,0</b>	<b>50,0</b>	<b>40,0</b>	<b>10,0</b>	<b>0,644</b>
Huilliche	80	3,8	28,8	18,8	48,8	0,650
Wichí (Chaco)	32	31,3	25,0	0,0	43,8	0,669
Toba	67	17,9	43,3	4,5	34,3	0,671
Guaraní (Arg.)	121	40,5	17,5	6,0	36,0	0,678
Kaingang	78	34,2	36,8	25,0	3,9	0,692
Patagonia (actual)	132	6,1	25,8	27,3	40,9	0,693
<b>Uruguay Este (prehist.)</b>	<b>19</b>	<b>16,0</b>	<b>37,0</b>	<b>42,0</b>	<b>5,0</b>	<b>0,695</b>
Artigas	45	15,6	46,7	20,0	17,8	0,702
Cerro Largo	37	21,6	37,8	32,4	8,1	0,718
<b>Uruguay (prehist.)</b>	<b>27</b>	<b>15,0</b>	<b>37,0</b>	<b>37,0</b>	<b>11,0</b>	<b>0,718</b>
Noroeste argentino	47	40,4	23,4	10,6	25,5	0,721
Mapuche (Arg.)	129	14,0	38,0	21,7	26,4	0,725
Pampa (actual)	644	22,2	15,5	36,5	25,8	0,728
Uruguay (actual)	351	21,9	35,0	28,5	14,5	0,729
Tacuarembó	62	21,0	33,9	32,3	12,9	0,732
Pilagá	38	10,5	31,6	28,9	28,9	0,742
Montevideo	22	36,4	31,8	18,2	13,6	0,749
<b>Pampa (H. tardío)</b>	<b>8</b>	<b>12,5</b>	<b>12,5</b>	<b>50,0</b>	<b>25,0</b>	<b>0,750</b>
Córdoba (prehist.)	35	22,9	25,7	34,3	17,1	0,756
<b>Uruguay Oeste (prehist.)</b>	<b>8</b>	<b>12,0</b>	<b>38,0</b>	<b>25,0</b>	<b>25,0</b>	<b>0,819</b>

Deben señalarse algunas relaciones de la diversidad de haplogrupos de las muestras analizadas con respecto a la diversidad de las poblaciones de la muestra comparativa (Tabla 4.9): en primer lugar, la muestra de la región pampeana argentina del Holoceno temprano se encuentra en el tercio de menor diversidad de la distribución, junto con la muestra prehistórica de Patagonia y las poblaciones Pehuenche y Huilliche del sur chileno. La muestra de la región pampeana argentina del Holoceno tardío y el Oeste de Uruguay se encuentran, por el contrario, en el extremo de mayor diversidad, junto con las muestras prehistóricas de Córdoba (Nores y Demarchi 2011). La muestra prehistórica del Uruguay, tomada como un todo, presenta valores semejantes a la muestra del Este de Uruguay, superando apenas la mediana de la distribución y en la vecindad de la muestra actual de Patagonia, así como las poblaciones actuales de Artigas y Cerro Largo. La población actual del Uruguay como un todo se encuentra junto con la población actual de la región pampeana en el cuarto superior de la distribución. Debe observarse además que no se halló correlación entre la diversidad haplotípica y la latitud ( $r_s = -0,047$ ;  $p = 0,806$ ).

#### 4.3.1.3. ANÁLISIS DE DISTANCIAS

##### 4.3.1.3.1. COMPARACIÓN DE LAS DISTANCIAS EMPLEADAS

Las distancias  $D_R$  de Rogers y  $D_A$  de Nei están altamente correlacionadas entre sí, a juzgar por los resultados del test de Mantel entre las matrices de distancias ( $r = 0,956$ ;  $p < 0,001$ ) y el coeficiente de correlación  $r_s$  de Spearman entre pares de distancias ( $r_s = 0,976$ ), por lo que puede esperarse que ambas reflejen patrones de agrupación semejantes. Sin embargo, y de acuerdo a lo que se puede observar en la figura 4.5, la relación no es lineal, tendiendo la distancia  $D_A$  a dar mayor peso que la distancia  $D_R$  a las diferencias en frecuencias, resultando en un incremento relativo más “rápido” en las distancias interpopulacionales. Esta diferencia en la ponderación de las diferencias influye en la dispersión de los puntos en el plano generado por el escalamiento multidimensional (Figuras 4.6 y 4.7), donde las distancias  $D_A$  generan una distribución más espaciada en el plano, en

tanto que las distancias  $D_R$  se agrupan en forma más próxima entre sí, con algunos casos de alejamiento extremo.

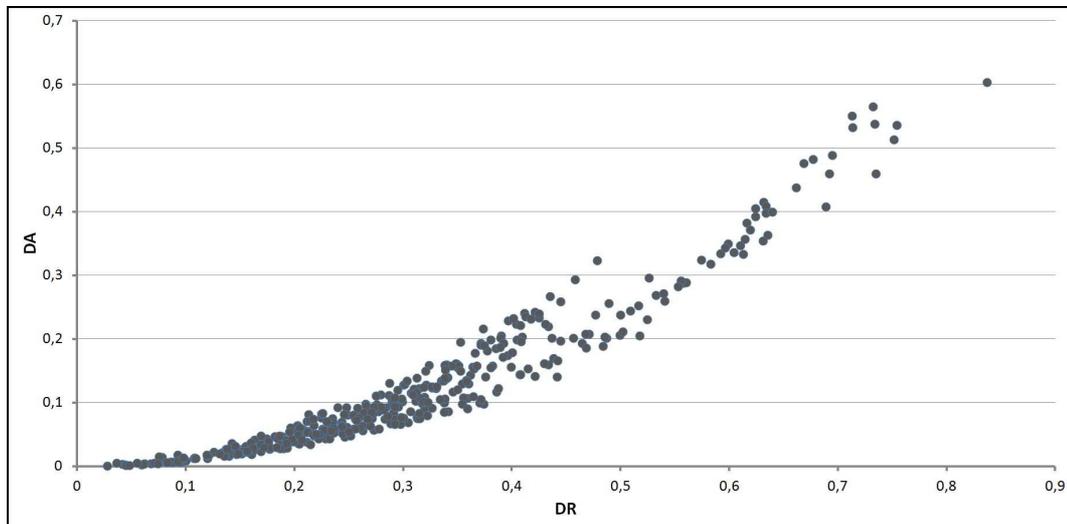


Figura 4.5: Relación entre las distancias  $D_R$  y  $D_A$ .

#### 4.3.1.3.2. ESCALAMIENTO MULTIDIMENSIONAL DE LAS DISTANCIAS

El escalamiento multidimensional de las matrices de distancias mostró valores de estrés mayores que lo aconsejable al emplear dos dimensiones ( $D_A$ :  $S = 12,22\%$ ;  $D_R$ :  $S = 11,67\%$ ) produciéndose un decremento brusco al emplear tres dimensiones ( $D_A$ :  $S = 0,19\%$ ;  $D_R$ :  $S = 7,21 \times 10^{-13}\%$ ). Por lo tanto, el análisis de agrupamientos se basará en el MDS tridimensional a fin de rescatar la mayor información posible en materia poblacional.

##### 4.3.1.3.2.1. DISTANCIAS $D_R$

Si bien hay múltiples correlaciones significativas entre las dimensiones del MDS de las distancias de Rogers y las frecuencias de haplogrupos (Tabla 4.10), las correlaciones más fuertes son la relación directa entre el eje Y y el haplogrupo A, las relaciones directa e inversa de los ejes X e Y con el haplogrupo B, y las relaciones inversas de los ejes X y Z con los haplogrupos D y C, respectivamente. La figura 4.6 muestra el gráfico de las coordenadas de las poblaciones analizadas de acuerdo al MDS.

Tabla 4.10: correlaciones  $r_s$  entre las frecuencias de haplogrupos y los ejes del MDS sobre distancias  $D_R$ .

Haplogrupo	Eje		
	X	Y	Z
A	0,504*	0,601**	0,085
B	0,671**	-0,703**	0,249
C	-0,266	-0,081	-0,938**
D	-0,918**	0,067	0,264

(\*) Correlación significativa al nivel 0,01. (\*\*) Correlación significativa al nivel 0,001.

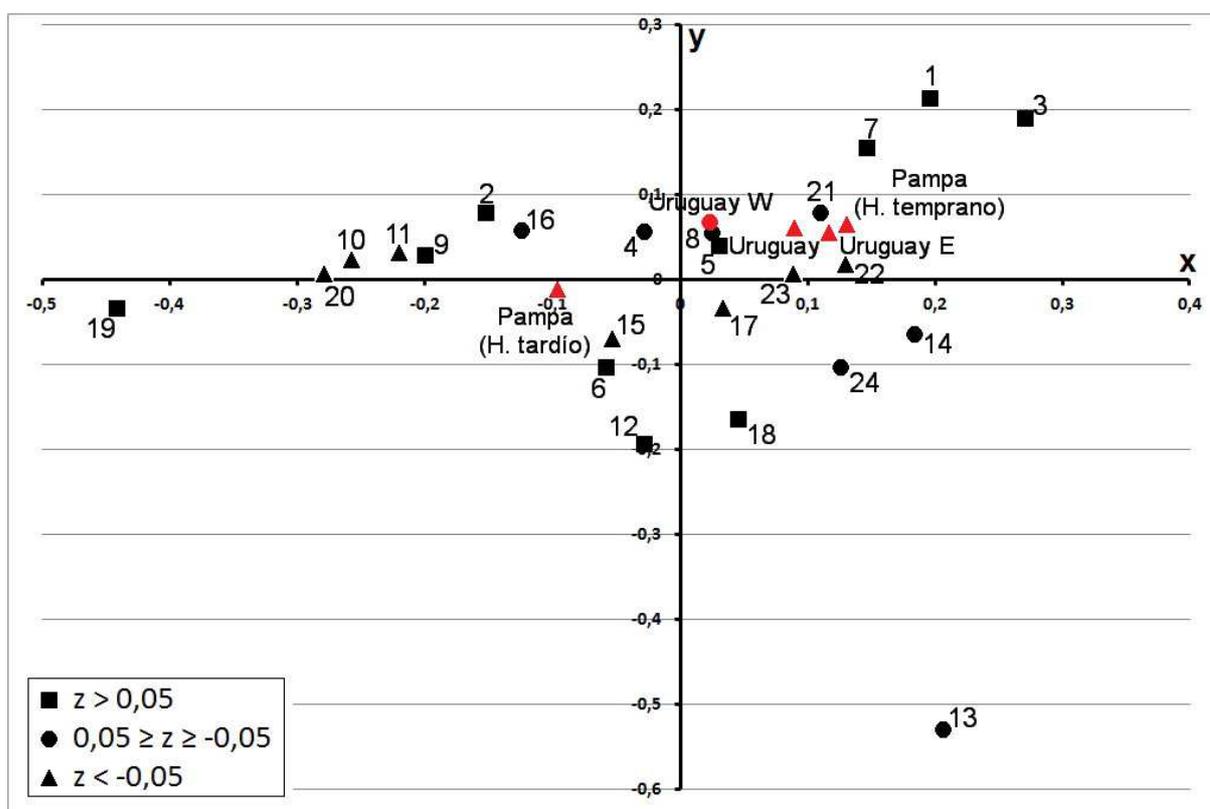


Figura 4.6: Gráfico de dispersión de los primeros dos ejes del MDS de la matriz de distancias  $D_R$ , con rangos de valores del tercer eje diferenciados por la forma de los símbolos. Los símbolos de color rojo representan las muestras analizadas en este trabajo, y cuyas frecuencias se muestran en la figura 4.2. Los símbolos negros representan las poblaciones empleadas en la comparación, cuyas frecuencias se muestran en la figura 4.3. 1- Aymara; 2- Huilliche; 3- Atacameño; 4- Pilagá; 5- Toba; 6- Wichí (Chaco); 7- Wichí (Formosa); 8- Mapuche (Argentina); 9- Tehuelche; 10- Mapuche (Chile); 11- Pehuenche; 12- Guaraní (Argentina); 13- Guaraní (Brasil); 14- Kaingang; 15- Pampa; 16- Patagonia; 17- Córdoba (antiguo); 18- Noroeste argentino (antiguo) 19- Patagonia (antiguo); 20- Tierra del Fuego (antiguo); 21- Artigas; 22- Cerro Largo; 23- Tacuarembó; 24- Montevideo.

4.3.1.3.2.2. DISTANCIAS  $D_A$ 

El comportamiento del MDS de las distancias de Nei respecto a las frecuencias de haplogrupos (Tabla 4.11) es similar al del MDS basado en las distancias de Rogers, mostrando correlaciones directa e inversa entre los ejes X e Y y el haplogrupo B, y relaciones inversas de los ejes X y Z con los haplogrupos D y C. En este caso, sin embargo, el eje X se correlaciona en forma directa con el haplogrupo A. Las relaciones entre las muestras y las poblaciones analizadas de acuerdo al MDS se pueden observar en la figura 4.7.

## 4.3.1.3.2.3. VINCULACIONES INTERPOBLACIONALES OBSERVADAS

Los gráficos representando los MDS de ambos índices de distancia presentan relaciones interpoblacionales altamente coherentes entre sí, permitiendo por lo tanto una interpretación conjunta de la posición que ocupan las muestras estudiadas en este trabajo. Éstas constituyen tres grandes agrupaciones:

Las muestras del *Este de Uruguay* y de la *región pampeana argentina del Holoceno temprano* ocupan una agrupación cercana al origen de los eje X e Y, con valores fuertemente negativos para el eje Z. En la vecindad de esta agrupación se hallan también las poblaciones modernas de Cerro Largo (22) y Tacuarembó (23), así como la muestra prehistórica de Córdoba (17). La muestra prehistórica agrupada de ambas regiones del Uruguay también se ubica en este conjunto, reflejando fundamentalmente el peso de la muestra del Este debido a su mayor tamaño.

Tabla 4.11: correlaciones  $r_s$  entre las frecuencias de haplogrupos y los ejes del MDS sobre distancias  $D_A$ .

Haplogrupo	Eje		
	X	Y	Z
A	0,779**	0,136	0,307
B	0,395*	-0,930**	0,311
C	-0,170	-0,071	-0,974**
D	-0,907**	0,550	0,076

(\*) Correlación significativa al nivel 0,01. (\*\*) Correlación significativa al nivel 0,001.

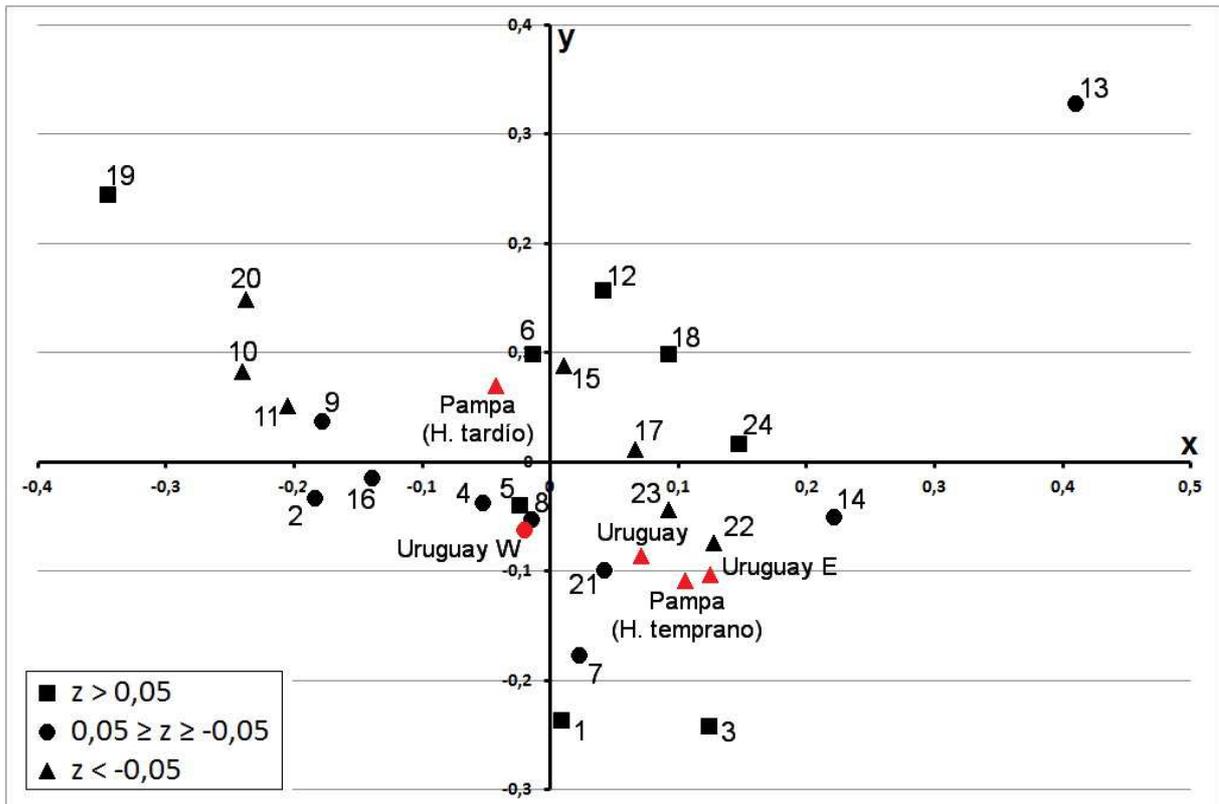


Figura 4.7: Gráfico de dispersión de los primeros dos ejes del MDS de la matriz de distancias  $D_A$ , con rangos de valores del tercer eje diferenciados por la forma de los símbolos. Ver simbología y nomenclatura en la figura 4.6.

En la vecindad inmediata de la agrupación anterior, aunque con valores cercanos a cero para el eje Z, se encuentra la muestra del *Oeste del Uruguay*, compartiendo el espacio con las muestras de Pilagá del Chaco (4), los Mapuche de Argentina (8) y la muestra moderna de Artigas (21). En este espacio, pero con valores positivos para el eje Z (reflejando menores frecuencias del haplogrupo C) se encuentran también los Toba del Chaco (5).

Por último, la muestra del *Holoceno tardío de la región pampeana argentina*, representada principalmente por la muestra de Tres Reyes 1, se ubica cercana en los tres ejes a la muestra moderna de Pampa (15), y en la proximidad (aunque con valores radicalmente diferentes para el eje Z) de la muestra de Wichí del Chaco (6).

#### 4.3.1.3.3. RELACIÓN ENTRE DISTANCIAS GENÉTICAS Y DISTANCIAS GEOGRÁFICAS

En forma general, se observa que las relaciones genéticas entre las poblaciones guardan relación con su proximidad geográfica; no obstante, se observan casos en que esta relación no se cumple. Ejemplo de ello son el apartamiento hacia valores extremos de la muestra antigua de Patagonia (19) con respecto a otras poblaciones de altas latitudes, el apartamiento de los Wichí de Formosa (7) respecto a otras poblaciones chaqueñas, la distancia de los Mapuche de Argentina (8) respecto a su contraparte chilena, y el carácter distante de la muestra antigua del Noroeste argentino (18) con respecto a poblaciones geográficamente vecinas. Asimismo, los Guaraníes de Argentina (12) y de Brasil (13) se hallan radicalmente apartados. Todos estos casos de apartamiento de una pauta de agrupación geográfica se reflejan en las relaciones entre las distancias geográficas y genéticas (Figura 4.8), que si bien presentan una correlación positiva significativa, presentan un alto grado de dispersión que se refleja en lo reducido de sus índices ( $D_R$ : test de Mantel:  $r = 0,436$ ;  $p = 2,00 \times 10^{-4}$ ; índice de Spearman:  $r_s = 0,458$ .  $D_A$ : test de Mantel  $r = 0,423$ ;  $p = 2,00 \times 10^{-4}$ ; índice de Spearman:  $r_s = 0,453$ ), y en los bajos índices de determinación ( $D_R$ :  $r^2 = 0,190$ ;  $D_A$ :  $r^2 = 0,179$ ). Nótese que no se especifican los valores de  $p$  de los coeficientes  $r_s$  debido a que el número de observaciones supera ampliamente los grados de libertad en las tablas estándar de significación (O'Rourke et al. 1992).

#### 4.3.1.3.4. VARIACIÓN LATITUDINAL EN LAS FRECUENCIAS DE HAPLOGRUPOS

Un aspecto mencionado en la literatura respecto a las tendencias latitudinales en las frecuencias de haplogrupos encuentra sustento estadístico de acuerdo a nuestros datos al hallarse correlaciones significativas entre latitud y frecuencia en cada uno de los haplogrupos fundadores (A:  $r = -0,436$ ;  $p = 0,026$ ; B:  $r = -0,504$ ;  $p = 0,009$ ; C:  $r = 0,598$ ;  $p = 0,001$ ; D:  $r = 0,544$ ;  $p = 0,004$ ) (Figura 4.9). Debe mencionarse también que la eliminación de las muestras antiguas, reteniendo únicamente las muestras modernas, resulta en una reducción de la fuerza de la correlación en todos los casos a excepción del haplogrupo D (A:  $r = -0,417$ ;  $p = 0,06$ ; B:  $r = -0,551$ ;  $p = 0,01$ ; C:  $r = 0,593$ ;  $p = 0,005$ ; D:  $r = 0,629$ ;  $p = 0,002$ ).

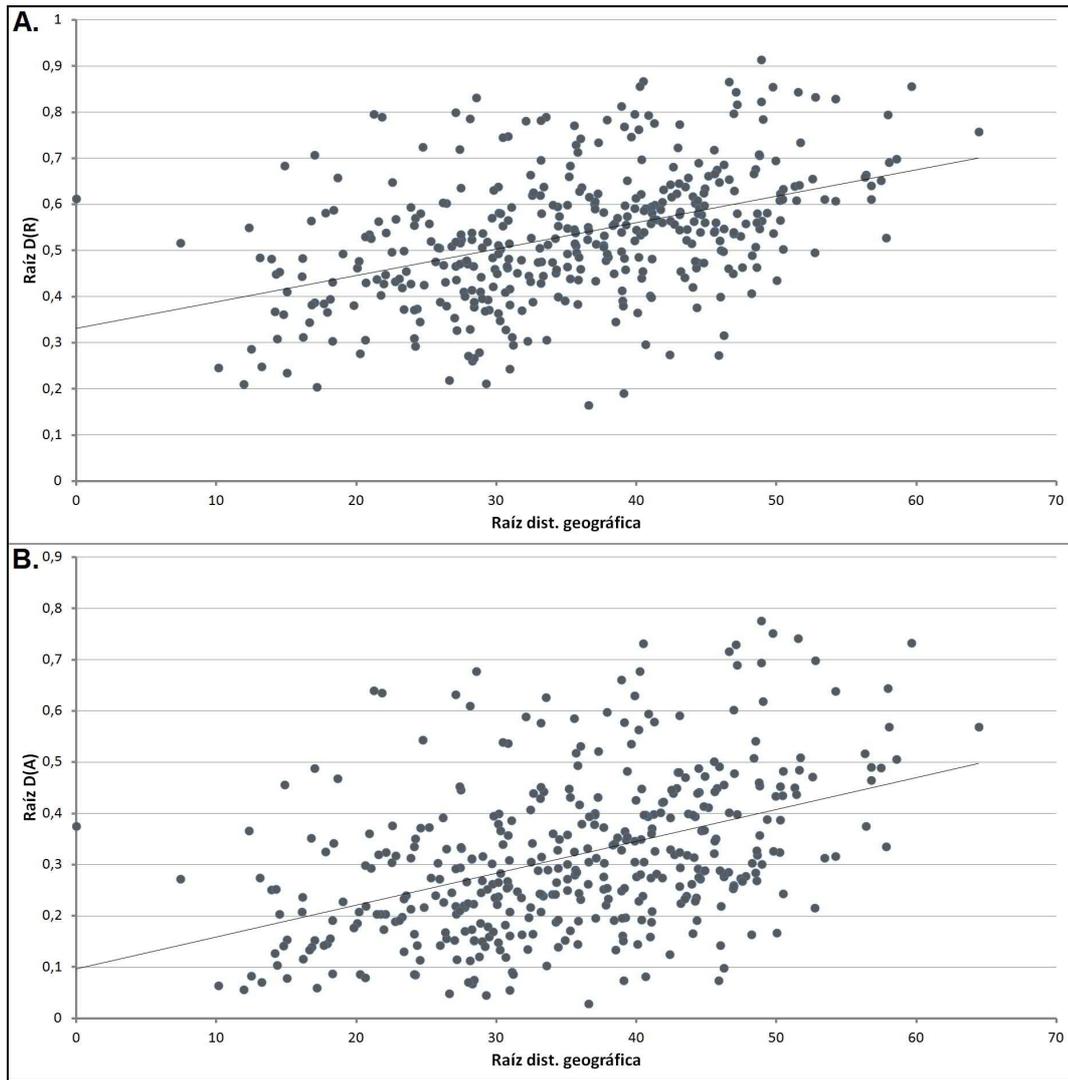


Figura 4.8: Relación entre distancias geográficas y genéticas (A: Distancias  $D_R$ , B: Distancias  $D_A$ ), graficada con la raíz cuadrada de las distancias a fin de mejorar la visibilidad a valores reducidos. La recta representa la función de regresión lineal de las distancias genéticas sobre las distancias geográficas.

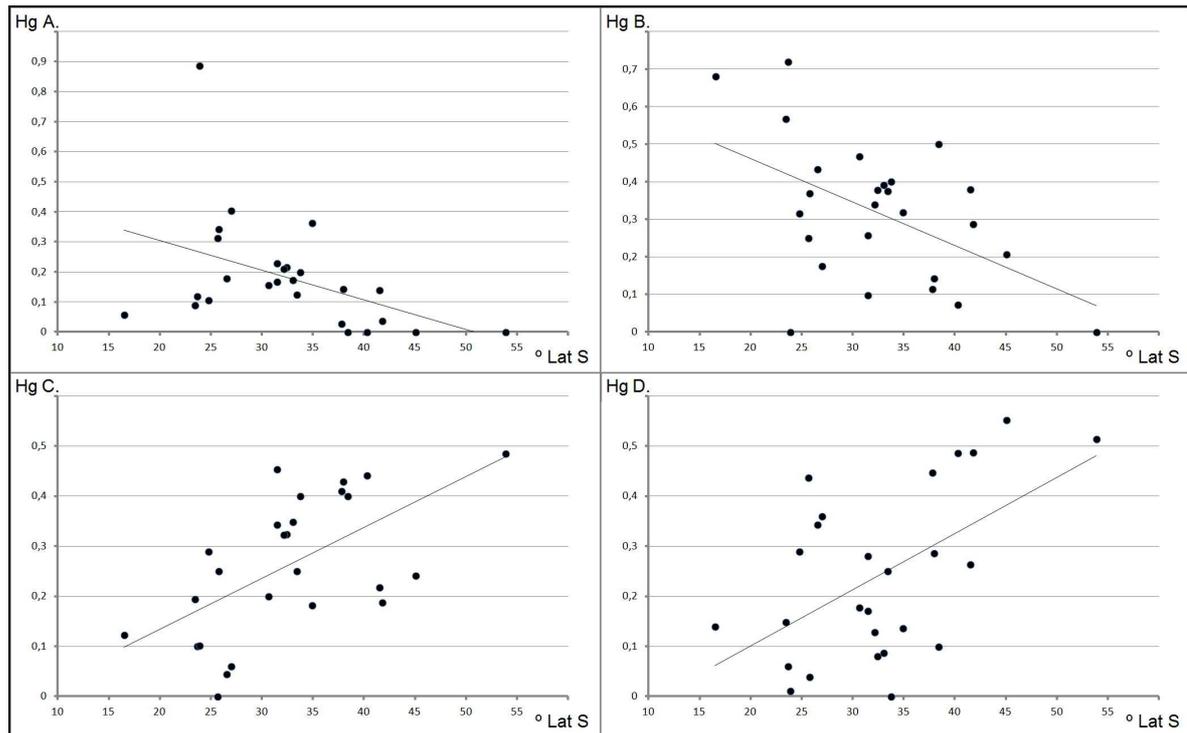


Figura 4.9: Correlación entre latitud y frecuencia de los cuatro haplogrupos fundadores.

#### 4.3.2. ANÁLISIS DE SECUENCIAS

##### 4.3.2.1. CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA DE SECUENCIAS ANTIGUAS

Se pudo determinar la secuencia de la HVRI de 14 individuos, todos ellos del Holoceno tardío: la mayoría corresponde al Este del Uruguay (n=6) y la región pampeana argentina (n=6), pudiéndose determinar una sola secuencia del Oeste de Uruguay y una de Rio Grande do Sul. De las 14 secuencias antiguas de la HVRI, una (TR2) pertenece al haplogrupo A2, dos (CH2D01-12 y Yaguareté) pertenecen al haplogrupo B2, 8 se clasifican como haplogrupo C1 (los individuos 13, 18B, 19A y 20 de CH2D01-A, los individuos TR1, TR4 y TR9 de Tres Reyes y el individuo 4372B de Rio Grande do Sul) y tres (CG14E01-13, TR6 y TR8) se clasifican como haplogrupo D1. La diversidad nucleotídica de la muestra total de secuencias es 0,0153, lo cual equivale a un 17% de la diversidad hallada en la muestra total de secuencias modernas empleadas para el análisis comparativo (0,0878).

Dentro de la muestra antigua, al contar solamente con múltiples secuencias del Este de Uruguay y de Tres Reyes, sólo se pudo calcular la diversidad nucleotídica de estas dos muestras poblacionales. La diversidad nucleotídica hallada en los seis individuos del sitio Tres Reyes, con un valor de 0,0161, supera en un 10% a la de los 8 individuos de la muestra del Uruguay, que asciende a 0,0146. A su vez, la diversidad nucleotídica de Tres Reyes es el 18% de la hallada actualmente en la región de Argentina previamente definida en forma amplia como Pampa (0,0889)<sup>4</sup>, en tanto que la diversidad de la muestra del Uruguay se encuentra a un 21% de la diversidad nucleotídica del Uruguay actual, que se sitúa en 0,0695.

#### 4.3.2.2. *MEDIAN-JOINING NETWORKS* Y CONTEXTO REGIONAL DE LAS SECUENCIAS PREHISTÓRICAS

Como se explicó previamente, las secuencias obtenidas de los restos antiguos fueron analizadas en relación con un total de 997 secuencias de HVRI de los haplogrupos A2, B2, C1 y D1 disponibles de Uruguay, el sur de Brasil, y la totalidad del territorio argentino. Una vez establecida la relación evolutiva de las secuencias antiguas con las secuencias compiladas, la búsqueda específica de motivos de secuencia sudamericanas afines con las antiguas en bases de datos *on line* y en la bibliografía permitió establecer las relaciones evolutivas de las secuencias antiguas con los linajes modernos de cada haplogrupo y sus afinidades geográficas, que se describen a continuación.

##### 4.3.2.2.1. HAPLOGRUPO A2

Como puede observarse en el *median-joining network* del haplogrupo A2 (Figura 4.10), La muestra antigua TR2, la única secuencia de este haplogrupo en la muestra analizada, caracterizada por el motivo 16111T-16153A-16223T-16290T-16295T-16319A-

---

<sup>4</sup> Debe observarse que una masiva inmigración, a partir de la segunda mitad del siglo XX, de poblaciones de alto componente indígena a la región metropolitana de Buenos Aires, ha impactado en la estructura genética de esta población (Avena et al. 2001). En vistas de ello, para calcular la diversidad nucleotídica de las provincias consideradas integrantes de la región pampeana se excluyeron las secuencias de Buenos Aires. Si se opta por considerar estas últimas secuencias, la diversidad nucleotídica asciende a 0,0905.

16362C, se vincula con un linaje hallado en la provincia de Córdoba (Bobillo et al. 2010), con la que comparte la mutación 16145, pero del que la separan 3 mutaciones. Por lo demás, no presenta afinidad directa alguna en todo el subcontinente. En individuos de ascendencia latina residentes en EE.UU pueden hallarse secuencias similares, presentando la mutación 16153A pero careciendo de la mutación 16295T (Saunier et al. 2008; Kumar et al. 2011).

#### 4.3.2.2.2. HAPLOGRUPO B2

El *median-joining network* de secuencias del haplogrupo B2 (Figura 4.11) ubica a las dos secuencias antiguas de este haplogrupo en el centro de la filogenia, con el motivo 16189C-16217C, indicando su identidad con la forma ancestral. Este haplotipo era portado por los ancestros de las poblaciones americanas durante su ingreso al continente, estando por lo tanto presente en prácticamente todas las poblaciones indígenas. Estos individuos no son, en principio, informativos en términos de dinámicas poblacionales locales.

#### 4.3.2.2.3. HAPLOGRUPO C1

El panorama presentado por el *median-joining network* de las secuencias del haplogrupo C1 (Figura 4.12) es, por el número de secuencias antiguas involucradas, el más complejo. Dos muestras antiguas (los individuos 4372B y TR4) corresponden al haplotipo nodal, resultando sus secuencias poco informativas. De las muestras correspondientes a linajes derivados, sólo una (el individuo 19A de CH2D01-A) pertenece a un linaje único, caracterizado por el motivo 16223T-16250T -16298C-16325C-16327T y sin equivalente aparente en la región o el continente.

Por otra parte, el individuo CH2D01-18B, con el motivo 16223T-16298C-16311C-16325C-16327T, pertenece a un linaje compartido con Argentina, presente en Buenos Aires (Bobillo et al. 2010; Catelli et al. 2011) y en Salta (Tamm et al. 2007). Otros individuos con el mismo motivo mutacional se han hallado en muestras antiguas y modernas de las tierras altas del Perú (Lewis et al. 2007b; Fehren-Schmitz et al. 2011), en el Estado brasileño de Alagoas (Barbosa et al. 2008), en las tierras bajas de Bolivia (Bert et al. 2004), en los Huilliche

del sur de Chile (de Saint Pierre et al. 2012) y en los Wichí de Formosa (Cabana et al. 2006). El individuo 1 de Tres Reyes presenta el motivo mutacional 16092C-16223T-16298C-16325C-16327T, compartido con muestras modernas de Argentina y Uruguay. En Argentina, el linaje fue hallado entre los Wichí de Formosa (Cabana et al. 2006), en Jujuy (Cardoso, datos sin publicar, recuperado de EMPOP), en Córdoba (Catelli et al. 2011) y en Buenos Aires (Bobillo et al. 2010; Catelli et al. 2011).

Las últimas tres muestras (los individuos 13 y 20 de CH2D01-A y el individuo 9 de Tres Reyes) presentan linajes derivados existentes del subhaplogrupo C1d, que se distingue del resto de los linajes del haplogrupo por la mutación 16051G. El linaje C1d+16259T, representado por TR9, se encuentra en la población actual de Uruguay, hallándose también una forma derivada de este motivo, con las mutaciones adicionales 16271C y 16311C, entre los Wichí de Formosa (Cabana et al. 2006) y en la ciudad de Buenos Aires (Perego et al. 2010). Por último, y también dentro del subhaplogrupo C1d, merece mención el linaje representado por el motivo básico 16051G-16223T-16288C-16298C-16325C-16327T, que aparece en las muestras CH2D01-20 y CH2D01-13 (en este último con el agregado de la mutación 16140C). Este linaje, compartido con la población moderna de Uruguay, no ha sido hallado fuera del territorio uruguayo, siendo un marcador poblacional único (Sans et al. 2012).

#### 4.3.2.2.4. HAPLOGRUPO D1

Aparte de la muestra TR6, perteneciente al haplotipo ancestral y por lo tanto poco informativo en términos de fenómenos locales, las muestras CG14E01-13 y TR8 comprenden haplotipos de un mismo linaje particular de la filogenia del haplogrupo D1, tal como se puede observar en la figura 4.13. Este linaje se caracteriza por el motivo 16223T-16362C, presentando una reversión al estado ancestral T del nucleótido 16325 (@16325, siguiendo la nomenclatura empleada por Achilli et al. 2008 y otros). Dentro del linaje, CG14E01-13 constituye un haplotipo previamente desconocido, en tanto que TR8 comparte con una muestra moderna del Uruguay la mutación 16291T, presentando además dos mutaciones adicionales. Si bien no se hallaron secuencias idénticas a las representadas por estos

individuos, el linaje caracterizado por esta reversión está fuertemente restringido geográficamente y presenta dos variantes. Por un lado, se encuentra en los grupos Wichí, Pilagá y Toba de Formosa (Cabana et al. 2006), acompañado de la mutación 16291T. La otra variante se localiza en la Patagonia, caracterizada por la mutación 16187T, en la provincia de Río Negro (Bobillo et al. 2010) y en poblaciones Mapuche (Ginther et al. 1993).

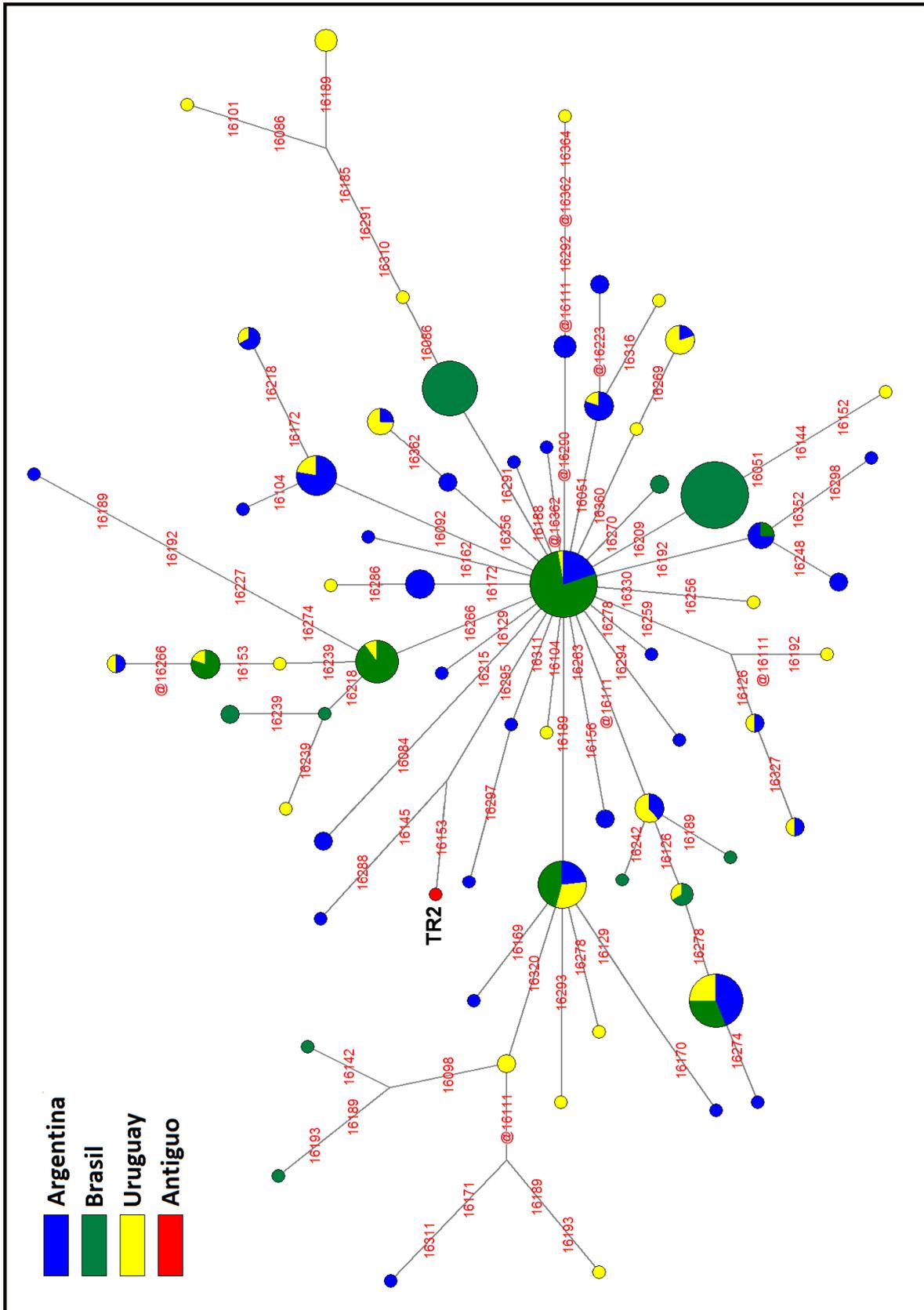


Figura 4.10: Median-joining network de las secuencias compiladas del haplogrupo A2. El motivo mutacional que caracteriza al nodo ancestral es 16111T-16223T-16290T-16319A-16362C.

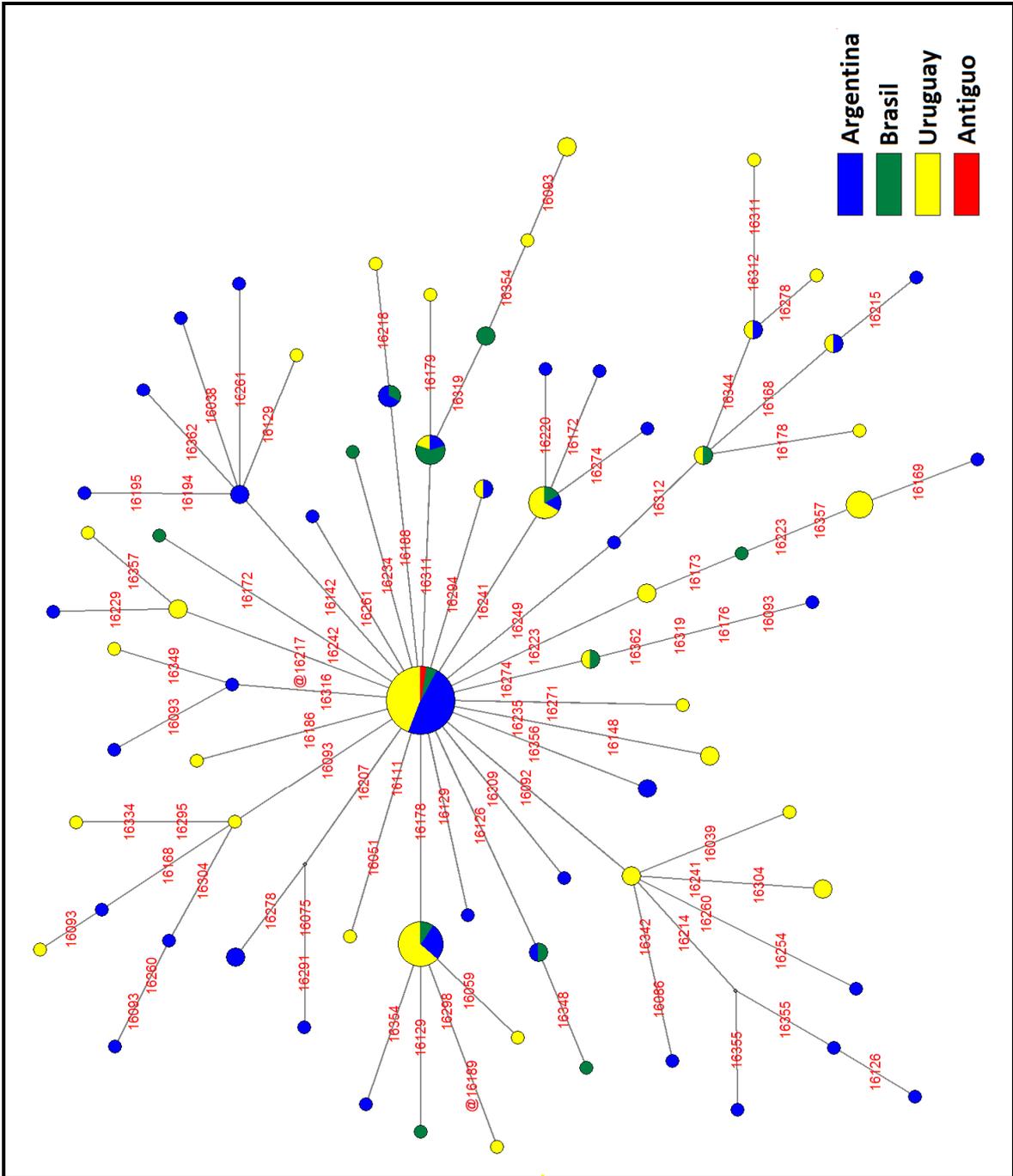


Figura 4.11: Median-joining network de las secuencias compiladas del haplogrupo B2. Las muestras antiguas CH2D01-12 y Yagareté, pertenecientes a este haplogrupo, se indican como la porción roja dentro del nodo ancestral, caracterizado por las mutaciones 16189C y 16217C.

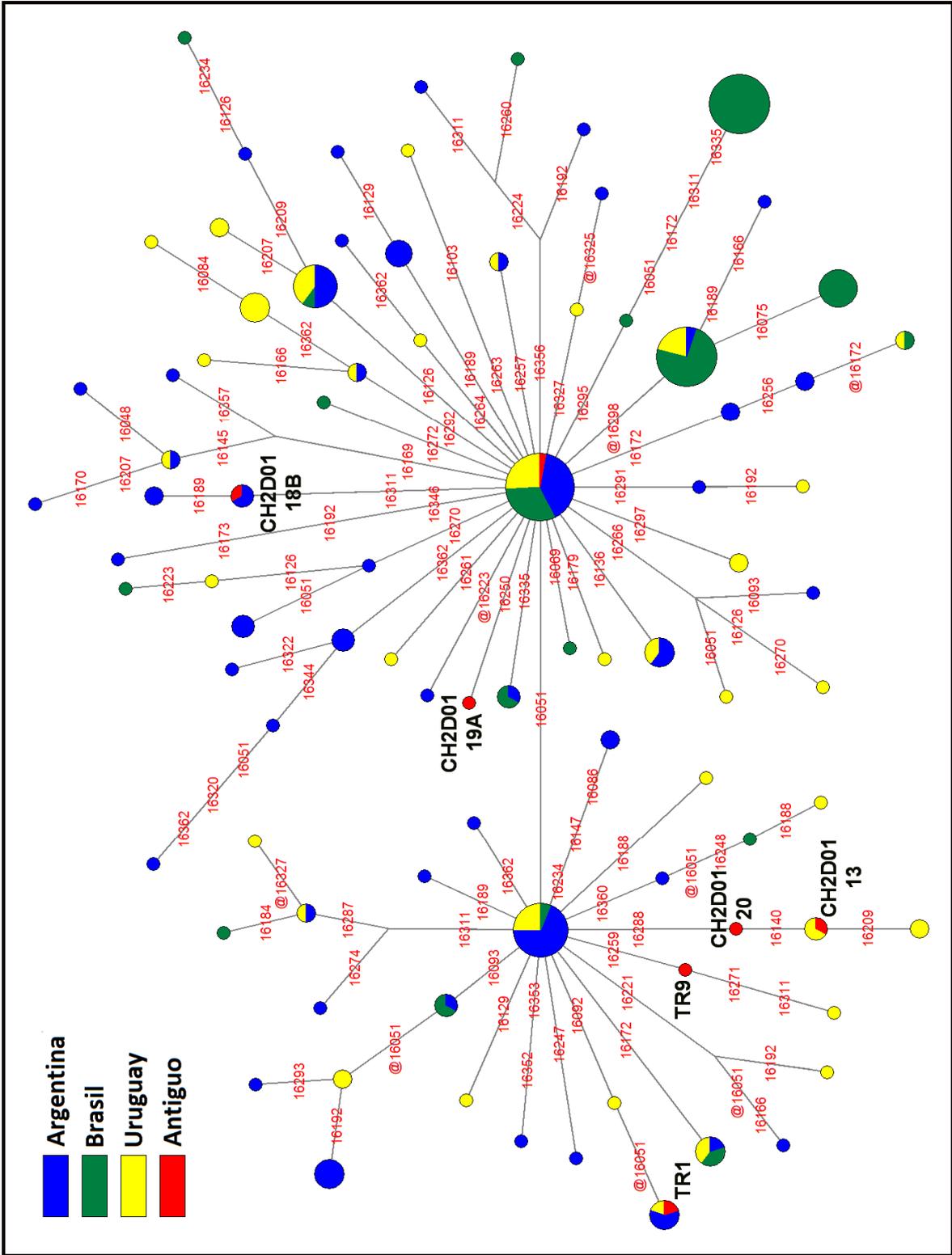


Figura 4.12: Median-joining network de las secuencias compiladas del haplogrupo C1. Las muestras antiguas ubicadas dentro del nodo ancestral (caracterizado por el motivo 16223T-16398C-16325C-16327T) son los individuos TR4 y 4372B.



4.3.2.3. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LOS LINAJES EMPARENTADOS CON LAS SECUENCIAS ANTIGUAS RECUPERADAS

La figura 4.14 muestra la distribución geográfica de los linajes vinculados con las secuencias antiguas analizadas. Como puede verse, el linaje C1d+16288C tiene una distribución fuertemente localizada en el territorio uruguayo, y no se ha encontrado a la fecha fuera de sus límites. En el otro extremo, el linaje C1+16311C se distribuye en forma amplia tanto dentro del subcontinente.

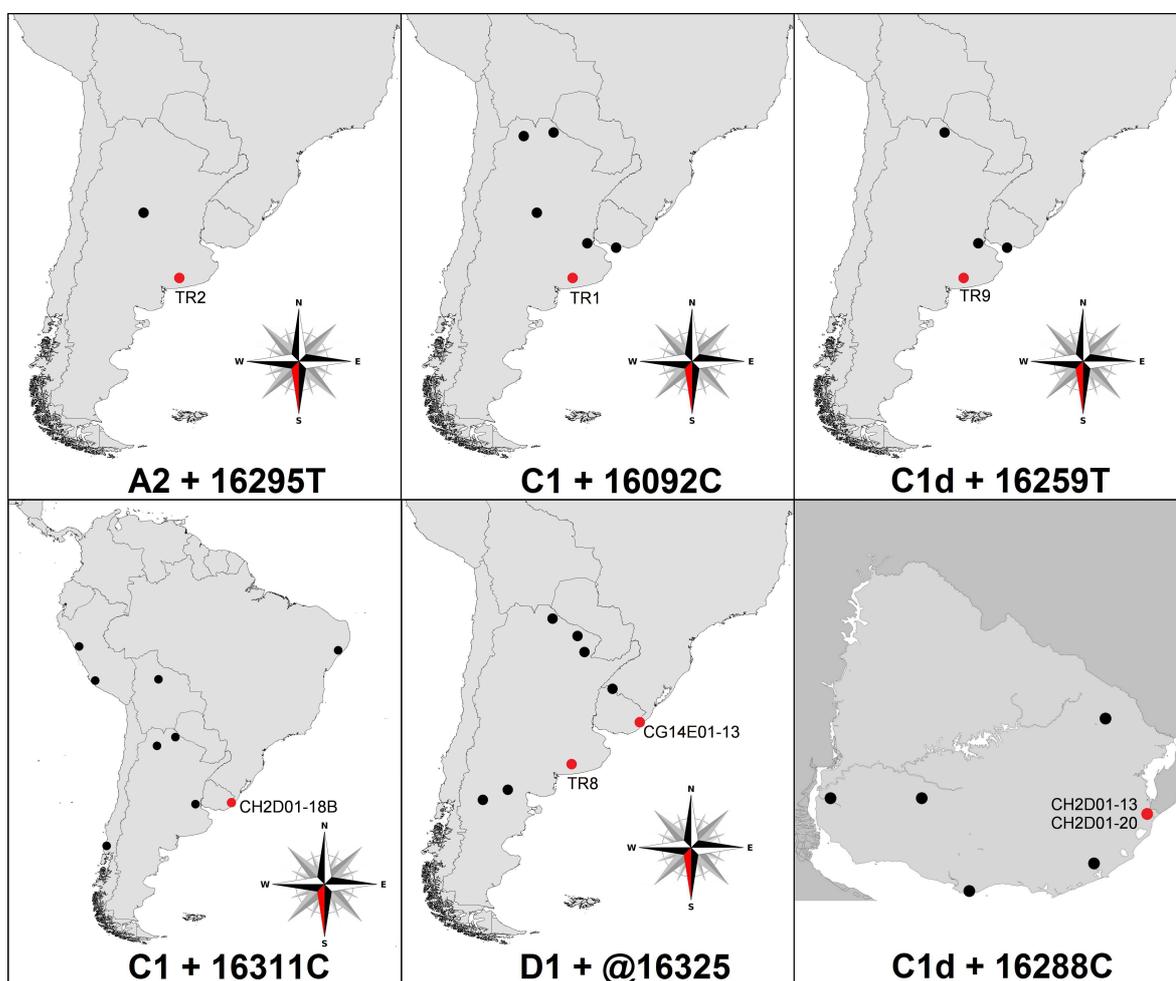


Figura 4.14: Distribución geográfica de los linajes descritos en la sección 4.3.2.1. Los puntos rojos representan las muestras analizadas en este trabajo. El mapa correspondiente al linaje C1d+16288 es modificado de Sans et al. (2012).

Las diferencias en cuanto a la amplitud de las distribuciones son más fácilmente discernibles al graficar las distancias entre las poblaciones donde se encuentran los linajes (Figura 4.15). Allí se observa un linaje de alta dispersión (C1+16311C) y otro de baja dispersión (C1d+16288C), en tanto que en un rango intermedio se encuentran los linajes C1+16092C, C1d+16259T y D1 con reversión en 16325 (D1+@16325). Las diferencias en amplitud de distribución entre estos tres linajes no son significativas (prueba de Kruskal-Wallis:  $X^2 = 2,358$ ;  $gl = 2$ ;  $p = 0,308$ ). La realización de pruebas de Mann-Whitney por pares entre estos tres linajes (Tabla 4.12) muestra que los linajes C1+16092C y C1d+16259T son los más se asemejan, en tanto que el linaje D1+@16325 tiene respecto a los otros dos linajes una distribución un poco más amplia.

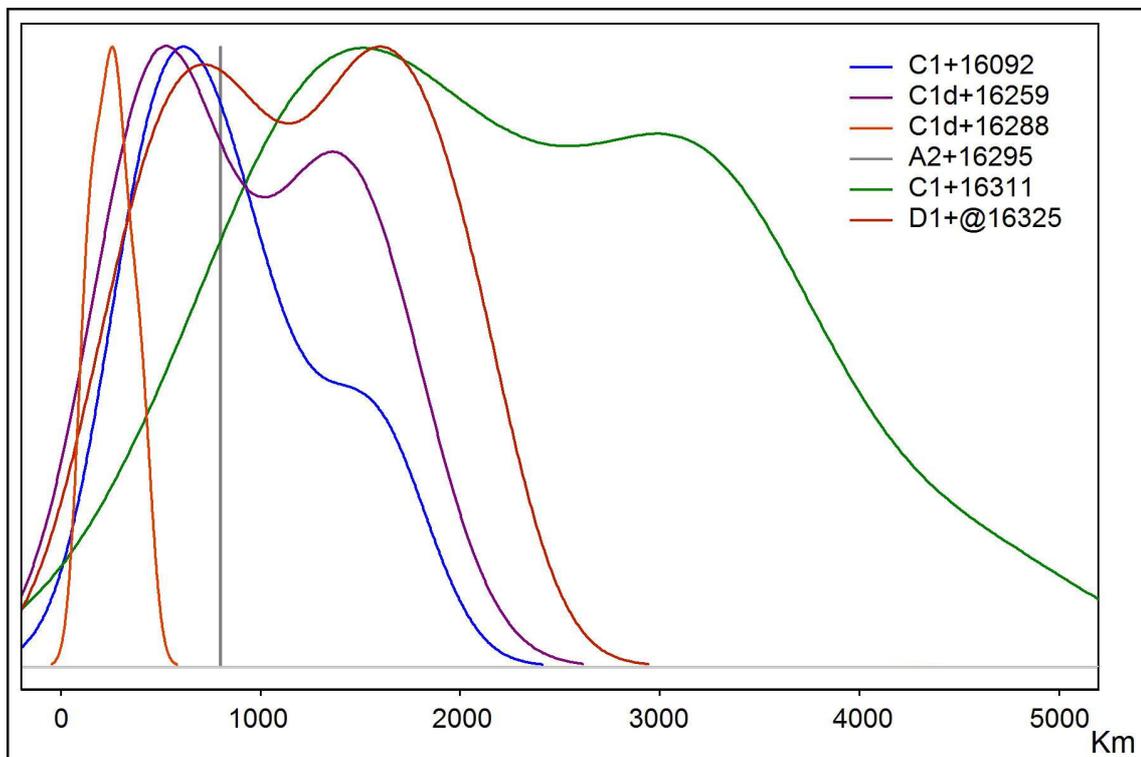


Figura 4.15: Gráfico de densidad de las distancias interpoblacionales en cada linaje. *Nota:* Las frecuencias relativas (eje Y) no están a escala.

Tabla 4.12: Estadísticos  $U$  de Mann-Whitney entre los linajes C1+16092, C1d+16295 y D1+@16325 tomados de a pares y sus probabilidades asociadas.

<i>Linajes</i>	<b>C1+16092</b>	<b>C1d+16259</b>	<b>D1+@16325</b>
<b>C1+16092</b>		$p = 0,913$	$p = 0,172$
<b>C1d+16259</b>	$U = 28,5$		$p = 0,366$
<b>D1+@16325</b>	$U = 98$	$U = 63,5$	

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DEL ADN

#### 5.1.1. ÉXITO GENERAL DE LA EXTRACCIÓN

En este trabajo se extrajo y analizó exitosamente ADN de restos de una antigüedad que alcanza los 6600 años radiocarbónicos; los individuos de mayor antigüedad (el individuo 6 de Arroyo Seco 2, con una datación  $6560 \pm 60$  a.A.P., y el individuo 7 del mismo sitio, datado en  $6262 \pm 46$  a.A.P.) pudieron, sin embargo, ser analizados sólo por PCR-RFLP. Si consideramos las muestras que pudieron ser analizadas a través de secuencias de la HVRI, la edad máxima se reduce a 2300 a.A.P. (correspondiente al individuo 1 del sitio Tres Reyes). La antigüedad de la muestra de Tres Reyes la ubica como la quinta más antigua de América del Sur, detrás de Tierra del Fuego (Lalueza et al. 1997), el norte de Chile (Moraga et al. 2005), Córdoba (Nores y Demarchi 2011) y el sur de Perú (Fehren-Schmitz et al. 2010)(*supra*, tabla 4.3).

La falta de correlación entre tasa de éxito general en las extracciones de ADN y la antigüedad de la muestra del presente trabajo (ver *supra*, sección 4.1.4) difiere del obtenido al realizar una comparación con los antecedentes disponibles en 2006 (Figueiro 2006), donde se constató una correlación negativa significativa entre éxito y antigüedad de la muestra. Una posible explicación de esta diferencia es que, en los siete años transcurridos, los diversos aspectos técnicos a nivel de extracción hayan avanzado lo suficiente como para sortear la limitante de la degradación dependiente del tiempo, quedando el éxito o el fracaso de la extracción en manos de contingencias diagenéticas de otra índole, como ser la intensidad del ataque microbiano en los meses posteriores a la muerte, la destrucción – en parte resultante del ataque microbiano – de la matriz de colágeno, la disolución y recristalización de la matriz de hidroxiapatita (la conservación de la fracción mineral del hueso sería, según Götherström et al. [2002] el factor más influyente en las probabilidades

de recuperación de ADN amplificable) y la incorporación por el hueso de solutos del medio circundante (Hedges 2002).

Un factor que parece incidir en la tasa de éxito de la extracción y análisis de ADN antiguo este trabajo es la infraestructura, evidenciado por los resultados de la muestra de la región pampeana argentina del Holoceno tardío. En la mayor parte de los individuos comprendidos en esta muestra, el ADN fue extraído y analizado en el laboratorio de ADN antiguo de la Universidad de Utah, resultando en una alta tasa de éxito mayor no sólo en términos de individuos haplotipados (89%), sino también en términos de la resolución de los datos obtenidos (6 individuos de los 8 comprendidos en la muestra cuentan con secuencias, totales o parciales, de la HVRI). Se espera que las mejoras en curso en la infraestructura de nuestro laboratorio mejoren sustancialmente la tasa de éxito de los análisis.

En cuanto al material de partida, debe observarse que no hay ningún trabajo sistemático comparando la conservación del ADN en huesos y dientes. Un trabajo reciente (Adler et al. 2011) analiza qué porción *del diente* rinde más ADN, suponiendo sin mayores cuestionamientos que estos son el material ideal de partida basados en su empleo frecuente en protocolos de genética forense. Por lo tanto, y a falta de mayores detalles al respecto, la elección de la pieza de la cual extraer ADN debe hacerse a fines prácticos: si bien los dientes, al ser menos porosos, serían menos sensibles a la contaminación con ADN exógeno (Rudbeck et al. 2005; véase también Malmström et al. 2005), los huesos, y en especial las costillas, no constituyen “material valioso” en las colecciones arqueológicas, lo que facilita su obtención en museos y colecciones (O'Rourke et al. 2000a). Los resultados obtenidos en este trabajo avalan este cambio en la preferencia hacia tejidos menos “costosos” en materia arqueológica, en virtud de que la tasa de éxito en hueso es estadísticamente equivalente a la tasa de éxito en diente, resultado concordante con el obtenido en análisis previos (Figueiro 2006).

### 5.1.2. CONTAMINACIÓN DE LOS EXTRACTOS

Las recomendaciones en la literatura hacen especial énfasis en la colecta directa de la muestra en el campo (Yang y Watt 2005; Pilli et al. 2013), afirmando que la contaminación de la muestra por manipulación es virtualmente inevitable, sin importar los procesos de descontaminación que se apliquen antes de la extracción (Malmström et al. 2005). Ninguna de las muestras empleadas en este trabajo fue colectada directamente en excavación; es decir, en ningún caso el investigador acudió a la excavación a recoger una pieza *in situ* para llevarla, sellada e intacta, al laboratorio. Todas las muestras fueron manipuladas al momento de la excavación por uno o varios excavadores, quienes al momento del registro y la colecta rara vez usaron guantes. Luego de su arribo al laboratorio, la mayoría de los huesos fueron lavados y, en algunos casos, remontados con cola vinílica. Cada una de las acciones mencionadas va contra las recomendaciones hechas por Yang y Watt (2005) en cuanto a la prevención de la contaminación de las piezas. Por añadidura, algunas muestras fueron excavadas hace 60 o más años (*e.g.* Colonia Concordia – Maruca Sosa 1957), y fueron sometidas luego a manipulación extensiva durante sucesivos análisis morfológicos, métricos y paleopatológicos, así como en la preparación para su exhibición o embalaje, por múltiples investigadores. Asimismo, varias colecciones han sido trasladadas en diferentes ocasiones, lo que agrega una mayor manipulación. Por todos estos motivos, la contaminación de varias muestras con ADN exógeno, no relacionado con el autor de esta Tesis, puede considerarse un hecho. Esto no exime al investigador (G.F.) de responsabilidad en por lo menos 7 casos, constatados por el hallazgo en las mismas de dos o más mutaciones del motivo correspondiente al linaje materno de origen europeo (haplogrupo K) del mismo. Un caso, especialmente complejo, es el de CG14E01-1 (ver *supra*, tabla 4.1.c) donde el responsable, no habiendo realizado la extracción (ya que la extracción había sido realizada en una instancia previa por Bernardo Bertoni) contaminó igualmente la muestra en el correr de manipulaciones posteriores.

Aparte de la contaminación de estas 7 muestras, la contaminación de las 18 muestras adicionales se presume a partir del hecho de que los PCR-RFLP realizados a las mismas dieron resultado negativo para los 4 haplogrupos americanos. A este respecto, debe

señalarse que se han reportado casos de mutaciones que han revertido el sitio de restricción diagnóstico, dando lugar a falsos negativos (Torres et al. 2006; Motti et al. 2009). Sin embargo, las frecuencias de estos revertantes en las poblaciones de la región, limitados en principio a los haplogrupos A y C, son lo suficientemente reducidas como para no poder dar cuenta de todos los casos (Motti et al. 2009). Por otra parte, al haber realizado análisis de PCR-RFLP únicamente de los sitios diagnósticos de los haplogrupos A, B, C y D, no puede descartarse que alguna de las muestras pertenezca al haplogrupo fundador X (Brown et al. 1998), presente en América del Norte tanto en poblaciones presentes como pasadas (Malhi y Smith 2002) y hasta el momento, no determinado en poblaciones sudamericanas (Dornelles et al. 2005). Es posible también la pertenencia de alguna muestra al macrohaplogrupo asiático M, del cual derivan los haplogrupos americanos fundadores C y D. Este macrohaplogrupo, de gran profundidad temporal y amplia dispersión en Asia (Macaulay et al. 2005) no ha sido identificado en poblaciones indígenas americanas actuales, pero sí en muestras antiguas de América del Norte (Malhi et al. 2007). El hallazgo aislado del haplogrupo M y la distribución actual del haplogrupo X, limitada principalmente al norte del actual territorio norteamericano, hacen de ambos eventos algo en extremo improbable, sin dejar de constituir posibilidades.

En el caso del ADN proveniente de individuos ajenos a la extracción y análisis de ADN, se suma la probabilidad de que alguno de estos individuos porten ADN mitocondrial de filiación indígena, conduciendo eventualmente a “falsos positivos” no correspondientes a la muestra. En Uruguay, puede considerarse que la probabilidad de este evento es, como mínimo, de 20%, que corresponde al componente indígena detectado en la población actual de Montevideo (Gascue et al. 2005), ciudad donde se encuentra depositada la mayoría de las muestras uruguayas analizadas en este trabajo. En cuanto a las muestras argentinas, a falta de un estimado local respecto a la ciudad de Olavarría (donde actualmente se encuentra la mayoría de las muestras de Argentina analizadas en este estudio), podemos emplear como aproximación la frecuencia promedio de haplogrupos indígenas hallada en la provincia de Buenos Aires, que asciende a 42% (Martínez Marignac et al. 2004; Avena et al. 2007; Bobillo et al. 2010; Catelli et al. 2011). Esto refuerza la necesidad de replicación de los resultados ante la posibilidad de que algunos de los mismos sean espurios.

## 5.2. ANÁLISIS DE LOS DATOS

### 5.2.1. ANÁLISIS DE LAS FRECUENCIAS DE HAPLOGRUPOS

Los trabajos teóricos clásicos en genética de poblaciones establecen que el aislamiento por distancia y el modelo *stepping-stone* traen como consecuencia observable la disminución de la relación genética de las poblaciones con la distancia geográfica entre las mismas, atribuyéndola a una disminución en la identidad por ascendencia (Wright 1943; Kimura y Weiss 1964; Malécot 1969). Trabajos recientes atribuyen el peso de la correlación de la distancia genética con la distancia geográfica en *Homo sapiens*, a escala continental e intercontinental, al efecto de la deriva génica en la expansión de la especie por dichas áreas. Se plantea que el mecanismo de poblamiento por parte de los grupos humanos habría resultado en un “efecto fundador en serie” – término propuesto por Ramachandran et al. (2005) – con su correspondiente impacto en una disminución de la heterocigosidad y un incremento en el desequilibrio de ligamiento observado en las poblaciones según se alejan de su centro de origen (Ramachandran et al. 2005; DeGiorgio et al. 2009). El análisis de secuencias de ADNmt y microsatélites (Yang et al. 2010) así como el análisis de SNPs genómicos (Wang et al. 2007) apoyan este tipo de efecto también en América, en la forma de una reducción en la diversidad genética en dirección norte-sur. Esta reducción no se constata a nivel de la diversidad haplotípica  $h$ , ya que ésta no muestra una correlación significativa con la latitud. Sin embargo, en nuestros datos se constata una tendencia al decremento de los haplogrupos A y B y de incremento de los haplogrupos C y D hacia el sur, fenómeno mencionado entre otros por Moraga et al. (2000); Schurr y Sherry (2004) y García et al. (2006).

Las dos distancias genéticas utilizadas ( $D_R$  de Rogers [1972] y  $D_A$  de Nei et al. [1983]) mostraron estar significativamente correlacionadas con las distancias geográficas, aunque con un residuales amplios respecto a la recta de regresión, lo cual resulta en que la distancia geográfica explica entre el 18% y 19% de la variación observada en las distancias genéticas. Si a esto se agregan las discrepancias observadas entre distancia geográfica y distancia genética en algunos casos (ver *supra*, p. 109) se concluye que el ADN mitocondrial de la

región Sur de Sudamérica refleja el impacto de eventos disruptivos, siempre suponiendo que estas poblaciones se hayan encontrado en una situación de equilibrio en algún momento de su historia. Esta correlación, aunque débil, es sin embargo mayor que la obtenida para América del Sur por O'Rourke et al. (1992), quienes calculan para frecuencias de antígenos eritrocitarios una correlación de 0,128 empleando test de Mantel, correlación casi cuatro veces menor que la obtenida con los datos de ADNmt, aunque aún así significativa. Estos autores proponen que la causa de esta baja correlación se debería al efecto de la deriva génica en el poblamiento inicial de Sudamérica, influido por un cuello de botella en la previamente poblada América Central, por donde habría pasado la población que llegó al sur. La correlación empleando frecuencias ADNmt (0,436 empleando el índice  $D_R$  y 0,423 empleando el índice  $D_A$ ) es alta incluso en relación con la correlación de 0,337 obtenida por O'Rourke et al. (1992) en poblaciones de Norteamérica, pero reducida si se compara con la correlación de 0,716 obtenida entre distancias geográficas y genéticas empleando ADNmt en poblaciones europeas (Helgason et al. 2001). La diferencia entre la correlación entre distancias en el Cono Sur y Europa probablemente se deba a una diferencia en la profundidad temporal de ambas poblaciones. Sin embargo, el único análisis de de datos de ADNmt de alcance continental en América no calcula la correlación entre distancias genéticas y geográficas sino únicamente la correlación entre diversidad genética y distancia del Estrecho de Bering (Yang et al. 2010).

En lo referente a la diversidad de los cuatro haplogrupos fundadores A, B, C y D en las poblaciones analizadas, se observa una tendencia al aumento de la diversidad en las poblaciones modernas con respecto a sus contrapartes antiguas en algunas regiones: la diversidad presente en Patagonia en la actualidad es mayor que la observada en la muestra antigua, y lo mismo se observa en Uruguay. Este resultado es discordante con la disminución en diversidad observada por Raff et al. (2011) en poblaciones norteamericanas y andinas a lo largo del Holoceno.

A partir de los resultados obtenidos a nivel de diversidad de haplogrupos y distancias interpoblacionales, es posible establecer algunas propuestas de orden temporal para la microevolución de las poblaciones analizadas:

1) La estructura genética de la región pampeana argentina habría seguido, al momento de su poblamiento inicial, una tendencia a la reducción progresiva de la diversidad genética. Esta reducción podría ser debida al “efecto fundador en serie” que se postula para la colonización del planeta por parte de la especie humana (Ramachandran et al. 2005) y cuyos efectos se observan también en el continente americano (Yang et al. 2010). La Patagonia prehistórica, con una diversidad levemente menor, sigue en forma esperable la tendencia que habría continuado hacia el sur del continente, presentándose únicamente dos haplogrupos (C y D) en Tierra del Fuego. La ausencia de los haplogrupos A y B en Tierra del Fuego es un aspecto discutido; Lalueza et al. (1997) afirmaron que los fueguinos descienden de una primera oleada de poblamiento, y que la clina latitudinal observada en los haplogrupos A y B se debía al aporte por flujo génico de estos haplogrupos por oleadas posteriores desde el norte. El trabajo de García-Bour et al. (2004) empleando microsátélites del cromosoma Y tiende a reafirmar esta opinión, en tanto que Moraga et al. (2000) no encuentran mutaciones exclusivas en muestras fueguinas, por lo que consideran que la fijación de los haplogrupos C y D en Tierra del Fuego se debería a un efecto fundador durante el poblamiento del sur del continente, y no a oleadas diferentes.

Las frecuencias de haplogrupos de Arroyo Seco 2, con presencia no sólo de haplogrupos C y D sino también de haplogrupo B en individuos con dataciones de entre 7800 y 6300 a.A.P. apoyan la noción de una progresiva pérdida de haplogrupos por efecto fundador a medida que los pobladores iniciales se desplazaban hacia el sur. Otra evidencia en apoyo de esta propuesta o hipótesis es la obtenida por Moraga et al. (2009), que determinan la presencia de haplogrupo B en muestras de 8800 años de antigüedad en el sitio Baño Nuevo, a 45º de latitud Sur. dando lugar a la posibilidad de que este haplogrupo se haya perdido *a posteriori* por deriva génica. Nótese sin embargo que trabajos recientes han determinado la presencia de haplogrupo A en muestras prehistóricas de Patagonia (Crespo et al. 2012; Dejean 2012); en la medida en que las muestras no están datadas, no es

posible establecer cuáles son las implicancias de estos hallazgos para el modelo sostenido por los datos de ADNmt para el poblamiento de la Patagonia.

Debe señalarse además que en las poblaciones indígenas modernas analizadas (tabla 3.5 y figura 5.2), los Mapuche de Argentina destacan por presentar una frecuencia de 14% de haplogrupo A, cuando otras poblaciones cercanas – sin ir más lejos, los Mapuche de Chile – presentan frecuencias menores a 5% o nulas de dicho haplogrupo (nótese además que los Mapuche de Argentina presentan una diversidad haplotípica mayor que todos sus vecinos). Vale observar por último que las frecuencias de haplogrupo A asemejan a los Mapuche de Argentina a grupos chaqueños, semejanza que será explorada con más detalle más adelante.

Más allá de los efectos a nivel genético poblacional del poblamiento de América, una interrogante importante por responder es si el poblamiento fue realizado por los integrantes de un único *stock* poblacional. En ese sentido, una serie de trabajos basados en morfología craneal sostienen la existencia de una primera oleada, de morfología “generalizada” (es decir, previa a la diferenciación mongoloide en Asia), que habría ingresado a América con anterioridad al contingente amerindio postulado como primera oleada por Greenberg et al. (1986). Este contingente previo no mongoloide, conocido como “paleoamericano”, se habría extinguido o habría sido asimilado por el posterior poblamiento amerindio, si bien podría haber influido en la estructura genética resultante del mismo (cf. Powell y Neves 1999; Gonzalez-Jose et al. 2003; Pucciarelli 2004; González-José et al. 2005; Hubbe et al. 2011, entre otros). Es difícil que el dato genético, y en particular un marcador uniparental como es el ADNmt, pueda contribuir con datos cruciales para confirmar o descartar esta oleada, debido a la eventual dilución de su acervo genético: al igual que lo que habría pasado con *Homo neanderthalensis* en Europa (Green et al. 2010), es posible que permanezcan rastros de la integración de los acervos genéticos paleoamericano y amerindio, pero sería necesario un análisis de alta resolución del genoma nuclear para detectarlos. No llegando a ese nivel de resolución, los dos análisis que han recurrido al ADN mitocondrial antiguo para detectar una señal específica de la oleada paleoamericana han detectado únicamente los haplogrupos fundadores conocidos, sugiriendo por lo tanto que tal oleada, si existió, tendría un *pool* génico indistinguible del de las poblaciones americanas actuales (Smith et al. 2005; Pérez et al. 2009). Cabe señalar que algunos modelos no consideran que esto sea

incompatible con un modelo de dos componentes de poblamiento cronológicamente separados (González-José et al. 2008).

Un indicador arqueológico a favor del argumento de un *stock* poblacional común poblando el continente es la presencia extendida de las puntas líticas del tipo “Fell” o “cola de pescado” en Patagonia, la región pampeana y otros sitios tempranos de América del Sur. Varios autores han planteado la existencia de un entramado social de la que este tipo de puntas sería elemento de reconocimiento y comunicación visual (ver discusión en Laguens 2009); la presencia de materias primas compartidas a larga distancia entre Argentina y Uruguay en el Holoceno temprano suma evidencias a favor de la existencia de redes de intercambio en este período (Flegenheimer et al. 2003). Estas redes serían el resultado del mantenimiento de la comunicación entre grupos a medida que la presencia humana en el área se extendía. Sin embargo, la existencia de contactos que conlleven intercambio de bienes y conocimiento no necesariamente implica flujo génico.

2) En el correr del Holoceno se produciría un aumento en la diversidad de las poblaciones de la región pampeana argentina, a juzgar por los valores elevados de  $h$  registrados en la muestra correspondiente al Holoceno tardío de esa región (0,75, en tercer lugar entre los valores más elevados) frente al Holoceno temprano (0,644, en el tercio inferior de la distribución). En el Uruguay, la diversidad haplotípica del Holoceno tardío presenta dos situaciones contrastantes: en el litoral del río Uruguay, la diversidad registrada (0,819) es la más alta de todas las poblaciones analizadas, en tanto que en el litoral Atlántico la diversidad (0,695) está en la mitad del rango entre las diversidades del Holoceno temprano y el tardío ya mencionadas.

Corresponde explicar tanto el aumento en la diversidad de haplogrupos entre el Holoceno temprano y el Holoceno tardío como el contraste registrado entre las muestras tardías del Este y el Oeste del Uruguay. En cuanto al primer aspecto, considerando que estamos utilizando diversidad de haplogrupos y no diversidad nucleotídica, no podemos recurrir a explicaciones endógenas, esto es, al aumento visible en diversidad de secuencias producto de un aumento poblacional (Rogers y Harpending 1992; Harpending 1994). Esto conduce a plantear que la nueva diversidad debió originarse por flujo génico. Si aceptamos

que la menor diversidad de haplogrupos y nucleotídica observada en grupos étnicos actuales del sur argentino con respecto al norte (Catelli et al. 2011) es reflejo de una situación generada por la dinámica del poblamiento, el mecanismo responsable de este aumento de la diversidad en la región pampeana podría haber sido el flujo génico producido desde áreas de mayor diversidad, necesariamente ubicadas hacia el norte. Por lo tanto, podemos plantear que en algún punto entre el Holoceno medio y el Holoceno tardío, se produjo un ingreso de nueva variabilidad a la región pampeana. Los correlatos arqueológicos de estos contactos (en la forma de bienes exóticos) son sin embargo escasos: si bien Politis y Madrid (2001) mencionan el hallazgo en la Pampa húmeda de una pieza de cobre del Noroeste argentino, la mayor parte de los contactos constatados serían con el centro-sur chileno y la Patagonia (Mazzanti 2006; Berón 2007) y, como área más septentrional, las Sierras Centrales de Córdoba y San Luis (Politis y Madrid 2001). En el Oeste de Uruguay las evidencias también son escasas, aún si lo suponemos en contacto fluido con el bajo delta del Paraná, y si realizamos el ejercicio de extrapolar, aproximadamente 1000 años hacia atrás, el panorama etnográfico que halló el europeo. Este panorama estaba constituido por diversas denominaciones étnicas agrupadas bajo el nombre “Chaná”, canoeros que habrían estado en una situación de intercambio con influencia de horticultores Guaraníes, originados en la floresta tropical de latitudes menores (Cabrera Pérez 1993).

Si interpretamos la baja diversidad de haplogrupos del Este de Uruguay como una evidencia de estasis a nivel genético poblacional, debemos plantear la posibilidad de que, comparadas con las poblaciones de la Pampa argentina y el Oeste de Uruguay, las poblaciones de esta área hayan permanecido relativamente aisladas durante el Holoceno; sería deseable explorar correlatos arqueológicos de contacto en el área para poner a prueba esta posibilidad. Una línea de evidencia arqueológica de contacto para la o las poblaciones relacionadas con el Este uruguayo es la presencia de materias primas líticas extrarregionales en el registro. En ese sentido, López Mazz et al. (2009) observan para distintas fases del registro arqueológico del sitio Rincón de Los Indios (8500-500 a.A.P.) un progresivo aumento en el empleo de materias primas locales en desmedro de materias primas extrarregionales (provenientes de fuentes situadas a más de 100km del sitio). Se infiere de esto que el acceso a estas materias primas se restringe por una reducción en la movilidad y un aumento en la

circunscripción territorial de estos grupos (López Mazz 1999; Iriarte et al. 2004). Sin embargo, las materias primas extrarregionales no desaparecen del registro, lo cual estaría indicando ya sea movilidad o intercambio. Pero las distancias involucradas, sea por movilidad o intercambio entre grupos, serían mucho menores a las distancias registradas en Argentina: la distancia entre Rincón de Los Indios y canteras de caliza en el río Santa Lucía es de 180km, frente a los 800km que separan el sitio Tres Reyes y las Sierras Centrales. Es posible por lo tanto que, en términos relativos, las poblaciones del Este del Uruguay hayan pasado por un proceso de aislamiento reproductivo.

#### 5.2.1.2. ANÁLISIS DE DISTANCIAS

La visualización de las relaciones entre las poblaciones antiguas analizadas y las poblaciones modernas de referencia, a través de los escalamientos multidimensionales de ambos índices de distancia (*supra*, sección 4.3.1.3.2), y las agrupaciones distinguibles en dicha visualización, sugiere tres fenómenos:

En primer lugar, la muestra del Holoceno temprano de la región pampeana argentina se agrupa consistentemente con el Este del Uruguay, muestra ubicada cronológicamente en el Holoceno tardío. Esta relación puede explicarse invocando un relativo aislamiento, ya discutido en relación a la diversidad haplotípica. El grado de aislamiento es discutible, y podría implicar que toda el área ocupada por “cerritos” (*i.e.* desde la región del río Camaquá en el estado de Rio Grande do Sul, Brasil, hasta la cuenca de la Laguna de Castillos en Uruguay – Bracco 2006) fuera una sola población. Al momento, no hay datos suficientes como para establecer si hubo o no una subdivisión poblacional al interior de este territorio. A nivel de correlatos arqueológicos, varios trabajos a propósito de la monumentalidad de estas estructuras y su uso como marcador territorial (López Mazz 2001; Gianotti 2005; Suárez 2009) indican un aumento poblacional con la consecuente territorialización hacia 3000 a.A.P, siendo posible entonces que se produjera durante el Holoceno tardío no un aislamiento, pero sí un carácter pautado de los cruzamientos, en función de la aparición de sistemas políticos basados en parentesco: el hallazgo en el sitio CH2D01-A de dos individuos

portadores del mismo linaje materno es sugerente al respecto. Un correlato etnográfico entre “cerritos” y esta forma de organización política se observa en los Mapuche, constructores de estructuras monticulares ceremoniales relacionados con instancias de reafirmación de grupos territoriales basados en linajes (Dillehay 1990).

En segundo lugar, las muestras tardías del Oeste de Uruguay y de la región pampeana argentina muestran afinidades en ambos casos con grupos de la región del Chaco: el Oeste de Uruguay agrupa en primera instancia con los Pilagá y en segunda importancia con los Toba. La muestra de la Pampa se encuentra próxima a los Wichí del Chaco (nótese que los valores para el eje Z difieren: la muestra pampeana tiene valores negativos, y la chaqueña valores positivos). Más allá de estas semejanzas con grupos chaqueños, otras dos agrupaciones de importancia deben observarse: una agrupa a la muestra pampeana tardía con la actual, lo cual indicaría un cierto grado de continuidad a nivel de frecuencias de haplogrupos. La otra es la práctica identidad a nivel de frecuencias entre la muestra del Oeste de Uruguay y los Mapuche de Argentina. Los grupos chaqueños no muestran por su parte una coherencia interna, tanto por la separación de Pilagás y Tobas por un lado, y Wichí por el otro, como por el hecho que entre éstos últimos, los de Formosa se agrupan con los grupos actuales del área andina, y los de Chaco con se agrupan en primera instancia con la Pampa (del Holoceno tardío y actual) y, en segunda instancia, con los Guaraní de Argentina. La agrupación de Pilagás y Tobas es coherente con las afinidades lingüísticas de estos grupos, ya que pertenecen a la familia lingüística Mbayá-Guaycurú, integrada por grupos cazadores-recolectores con horticultura incipiente que adoptaron rápidamente el caballo (Hernández 1992). Los Wichí (también conocidos como Mataco) integran la familia lingüística Mataco-Mataguayo, hablada antiguamente por diez grupos de los cuales perviven únicamente los Wichí, también cazadores-recolectores, que no adoptaron el caballo. Sin embargo, tanto Goicoechea et al. (2001) empleando polimorfismos sanguíneos como Dejean et al. (2004) empleando microsatélites constatan una baja diferenciación interpoblacional debida probablemente a una historia de alto flujo génico entre los distintos grupos chaqueños. Goicoechea et al. (2001) constatan además que, en efecto, al analizar el ADN mitocondrial, las afinidades evidentes observadas entre los grupos chaqueños mediante marcadores

clásicos se desdibujan, y lo explican por las características de sensibilidad a factores estocásticos del ADNmt, lo cual explicaría además la disparidad en la composición de los dos grupos Wichí.

Se hace necesario explicar la inesperada agrupación de los Mapuche de Argentina en el *cluster* Uruguay Oeste-Pilagá-Toba, y su diferencia respecto a grupos del sur de Argentina y Chile, que agrupan en forma laxa pero consistente con valores negativos en el eje X de ambos análisis en virtud de su práctica carencia de haplogrupo A. Parte de la explicación de esta agrupación podría hallarse en la penetración del pueblo Mapuche en el actual territorio argentino, proceso denominado “araucanización”, que habría comenzado antes del siglo XVI: los datos arqueológicos la sitúan como mínimo en el siglo XIII, y estiman que la profundidad temporal de las redes de interacciones que la posibilitaron puede haber sido aún mayor (Berón 2005). De acuerdo a evidencias arqueológicas e históricas, parte de una población del sur chileno habría cruzado la cordillera hacia la Patagonia septentrional, y se habría expandido por la Patagonia y la Pampa, proceso que involucró alianzas matrimoniales y que habría culminado hacia el siglo XVIII (Hernández 1992; Mandrini y Ortelli 2002). Los actuales Mapuche de la Argentina descienden de una serie de parcialidades fuertemente araucanizadas, descritas en la etnografía pampeana del siglo XVIII, y que fueron derrotadas militarmente recién en 1885 en las campañas dirigidas por el general Julio Argentino Roca (Hernández 2003). La razón de la diferencia en composición de haplogrupos y la mayor diversidad hallada en los Mapuche de Argentina estriba en el proceso de araucanización, donde el componente femenino de las parcialidades araucanizadas era local, y que a medida que se avanza hacia el norte, cuenta con mayores frecuencias del haplogrupo A (recordemos la correlación negativa entre haplogrupo A y latitud). Tras su derrota militar, las parcialidades indígenas derrotadas fueron desplazadas a zonas marginales de Patagonia, que dan cuenta de su localización actual.

Por último, la muestra del Uruguay prehistórico (cuando se agrupan ambas regiones) que, como se mencionó anteriormente, presenta una similitud notable a nivel de frecuencias haplotípicas con el componente indígena del Uruguay actual, se asemeja particularmente a las poblaciones modernas de Tacuarembó (A= 21%; B= 34%; C= 32%; D= 13%) y Cerro Largo

(A= 22%; B= 38%; C= 32%; D= 8%). Ambas poblaciones presentan altos componentes maternos indígenas, de 62% (Bonilla et al. 2004) y 32% (Sans et al. 2006) respectivamente. Si además consideramos datos, publicados e inéditos, a nivel nacional y de otras localidades (*supra*, tabla 3.3), se observa que los haplogrupos B y C son los más frecuentes con la excepción de Montevideo, que presenta mayores frecuencias de haplogrupo A.

Esto – y otros datos discutidos más adelante – llevó a plantear que, contrario a la historiografía del Uruguay de mediados del siglo XIX, que supone que serían los Guaraní quienes mayormente se habrían integrado para conformar la población uruguaya actual, el componente materno indígena del Uruguay actual, con frecuencias de los haplogrupos B y C de aproximadamente 30% sobre el total de haplogrupos indígenas, señala a otro origen poblacional. Considerando que los estudios de ADNmt en Guaraníes coinciden en que estos presentan altas frecuencias de haplogrupo A y bajas frecuencias de haplogrupo C (Marrero et al. 2007b; Sala et al. 2010), es posible que el aporte mayoritario por vía materna a la población actual sea de origen pampeano-patagónico (concretamente, de la macro-etnia Charrúa, que incluye otros grupos como Guenoas o Minuanes, Bohanes y Yaros) y no Guaraní. La aparente no concordancia entre el dato histórico y el ADNmt podría ser explicada ya sea por un aporte Charrúa más temprano, en el siglo XVII y comienzos del XVIII, época de la cual hay pocos registros, o a una aporte mayoritario Guaraní masculino que se habría ido perdiendo en el tiempo (Sans y Figueiro 2009). Esto lleva además a plantear la posibilidad de analizar las poblaciones de mayor componente indígena de nuestro país como “reserva” genética que refleje fenómenos poblacionales antiguos. Así, las características genéticas de las poblaciones indígenas del Uruguay, aunque extintas, podrían ser estudiadas por aproximación al ADNmt de muestras de la población actual, con énfasis particular en estas poblaciones, como se ha propuesto también para la población mayoritariamente “blanca” del Estado de Rio Grande do Sul, que también presenta un importante aporte amerindio sin vinculaciones inmediatas con los grupos indígenas próximos (Marrero et al. 2005).

## 5.2.2. ANÁLISIS DE SECUENCIAS

### 5.2.2.1. ASPECTOS TÉCNICOS DE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS

Antes de profundizar en los análisis de afinidad de las secuencias obtenidas a través de los *median-joining networks* y los motivos de secuencia similares en Sudamérica, debemos explorar la posibilidad de que algunas de las mutaciones identificadas en nuestras secuencias antiguas pueden no ser auténticas. El daño *post-mortem* al ADN incluye, además de daño hidrolítico conducente a la ruptura del enlace fosfodiéster, daño oxidativo resultante en modificaciones de base (Höss et al. 1996) entre las cuales una de las más frecuentes es la pérdida del grupo amino en las citosinas, que lleva a la generación de “mutaciones” que son en realidad artefactos experimentales (Hofreiter et al. 2001). Esto implica que las mutaciones C→T y G→A deben ser vistos con cautela, ya que pueden ser producto de errores de amplificación. Dado que descartar todas estas mutaciones es una opción poco razonable a efectos operativos, y en virtud de la cantidad de secuencias de ADNmt disponibles en la actualidad, es posible actuar empleando un criterio de coherencia filogenética, de modo tal que si la mutación se halla en otras muestras, antiguas o modernas, es probable que se trate de una mutación auténtica.

Varias de las secuencias antiguas obtenidas se caracterizan, además del motivo básico que define a su correspondiente haplogrupo, por mutaciones adicionales consistentes en transiciones C→T o G→A. Discutiremos, una por una, las secuencias en cuestión.

La secuencia del *individuo 2 de Tres Reyes* consiste en el motivo del haplogrupo A2 típico americano (16111T-16223T-16290T-16319A-16362C), agregando las mutaciones y 16153A y 16295T. Ambas mutaciones se hallan en poblaciones modernas (16153A en poblaciones norteamericanas de origen mexicano (Saunier et al. 2008; Kumar et al. 2011) y 16295T en Córdoba (Bobillo et al. 2010) , pero no se han hallado individuos ni poblaciones que porten ambas mutaciones conjuntamente. El haber hallado A2+16295T en poblaciones modernas sudamericanas da mayores elementos para considerarla como auténtica,

mientras que, si bien no es posible descartar de momento la mutación 16153A, será de momento ignorada puesto que no se encontró asociada al haplogrupo A2 en Sudamérica.

La secuencia del *individuo 19-A de CH2D01-A* presenta el motivo mutacional del haplogrupo C1 típico americano (16223T-16298C-16325C-16327T) y la mutación 16250T. No se ha hallado ningún individuo del haplogrupo C1 con esta mutación, lo cual hace que su autenticidad pueda ser puesta en duda por su probable naturaleza artefactual. Por consiguiente, es probable que el individuo 19-A pertenezca al haplotipo ancestral del haplogrupo C1, y no a una forma derivada.

El motivo del *individuo 9 del Tres Reyes* porta las mutaciones del subhaplogrupo C1d (16051G-16223T-16298C-16325C-16327T), añadiendo la mutación 16259T. El subhaplogrupo C1d se encuentra ampliamente distribuido por América, por lo que su origen se plantea como anterior al ingreso del ser humano en el continente (Perego et al. 2010; Figueiro et al. 2011). Se registran secuencias semejantes a la de TR9, presentando las 5 mutaciones típicas de C1d y también 16259T, con los agregados de las mutaciones 16271C y 16311C, en Buenos Aires (Perego et al. 2010), en indígenas Wichí de Formosa (Cabana et al. 2006) y en Montevideo (Figueiro et al. 2011). Es posible pues que el motivo de TR9 represente una forma primitiva del linaje que actualmente se registra, o que, dado que las mutaciones 16271 y 16311 de los individuos modernos son citosinas, su ausencia en TR9 se deba a errores de PCR basadas en la desaminación de citosinas. Si ese fuera el caso, TR9 podría tener una secuencia idéntica a las demás del linaje, o con una sola mutación de diferencia, es decir, portadora de una de las mutaciones que lo definen.

Por último, las secuencias de *CG14E01-13* y *TR8* se caracterizan ambas por una timina en la posición 16325, lo que corresponde al estado primitivo; debido a la presencia en estos individuos de las mutaciones 16223T y 16362C, se puede argumentar que se produjo una mutación C→T en la posición 16325 de una secuencia del haplogrupo D1, revirtiendo dicha posición a su estado primitivo. El individuo TR8 presenta además tres cambios adicionales (16291T, 16294T y 16373A), en tanto que CG14E01-13 presenta 16209C y 16304C .

Dado que se han hallado individuos con la reversión en 16325 en indígenas de Formosa (Cabana et al. 2006), Mapuche de Argentina (Ginther et al. 1993), y en poblaciones mestizadas de la provincia argentina de Río Negro (Bobillo et al. 2010) y el departamento uruguayo de Artigas (Sans et al. en preparación), hay buenas razones para suponer su autenticidad en las muestras antiguas. Sin embargo, todos los individuos presentan mutaciones adicionales: las muestras de Artigas y de Formosa presentan además la mutación 16291T, en tanto que las muestras Mapuche y de Río Negro presentan las mutaciones 16187T y 16189C. Al estar presente 16291T en TR8, su afinidad con las muestras de Artigas y Formosa avalaría su autenticidad. Sin embargo, tanto 16294T y 16373A quedan en duda por ser transiciones C→T y G→A no asociados en la literatura con la reversión en 16325. Por otra parte, al ser transiciones T→C, las mutaciones 16209C y 16304C del individuo CG14E01-13 ofrecen pocas sospechas de que sean un artefacto, aún cuando no se han encontrado secuencias idénticas en poblaciones del área.

#### 5.2.2.2. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA Y CRONOLÓGICA DE LOS LINAJES IDENTIFICADOS

Las afinidades poblacionales de los linajes antiguos – tanto los indicados en el punto anterior como otros cuya autenticidad no fue puesta en duda – a través de la ubicación de sus secuencias antiguas en los *median-joining networks* tienen algunas particularidades que apuntan por un lado a eventos de flujo génico, y por otro a continuidades locales. En los siguientes párrafos discutiremos los aspectos genéticos poblacionales pertinentes en cada uno los linajes.

##### 5.2.2.2.1. A2+16295T

El linaje A2+16295T (mutación cuya autenticidad discutimos en el punto anterior) identificado en un individuo incluido en un entierro múltiple del sitio Tres Reyes datado en  $2245 \pm 55$  a.A.P., tiene como se señaló un representante moderno en la población actual de la provincia de Córdoba (Bobillo et al. 2010). El haplogrupo A se encuentra en un 15% en la población actual de Córdoba (García y Demarchi 2006), estando en frecuencias aún mayores

(23%) en poblaciones antiguas de esa área (Nores y Demarchi 2011). En función de ello, y en función de que la población temprana de la región pampeana argentina, analizada en este trabajo, no presenta el haplogrupo A, se plantea la posibilidad de que éste haya ingresado a la región pampeana en algún momento previo a 2300 a.A.P. Las evidencias arqueológicas en apoyo a esto son aproximadamente contemporáneas a la datación de Tres Reyes: hay referencias en el registro arqueológico de placas grabadas de las Sierras Centrales en sitios un poco más recientes (2000 a.A.P.) de la pampa seca, a aproximadamente 800km de distancia, lo cual indicaría contactos de larga distancia (Berón en Politis y Madrid 2001). En el registro etnohistórico, los Querandíes, grupo cazador-recolector identificado en las crónicas de viajeros del siglo XVI en la región norte de la actual provincia de Buenos Aires (Cabrera Pérez 1993; Bonomo y Latini 2012) son mencionados en las crónicas por moverse regularmente entre el Río de la Plata y las Sierras Centrales (Mazzanti 2006). Por lo tanto hay evidencias parciales, a nivel arqueológico e histórico, para apoyar la existencia de un margen de movilidad o contactos interpoblacionales lo suficientemente amplio como para sostener un origen en el centro de Argentina del linaje A2+16295T (Figura 5.1.A).

#### 5.2.2.2.2. C1+16311C

La distribución en América del haplogrupo C1 con la mutación 16311C identificado en el individuo 18B de CH2D01-A no abarca solamente a América del Sur, sino también a poblaciones de América del Norte, particularmente en México y en el sur de EE.UU (Saunier et al. 2008; Kemp et al. 2010; Kumar et al. 2011; Guardado-Estrada et al. 2012). Asimismo, fue hallado en la población de Islandia; el análisis de la región codificante de representantes de este linaje revelaron su pertenencia al subhaplogrupo C1e, no descrito con anterioridad, y que hasta el momento tampoco se cuenta entre los linajes fundadores de las poblaciones americanas (Ebenesersdóttir et al. 2011).

El motivo de la asociación de 16311C con diversos linajes estriba en que el sitio 16311 es un “sitio caliente” de alta tasa de mutación aún para el promedio de una región de alta mutabilidad como es la región hipervariable. Este sitio fue caracterizado como “rápido” en varios estudios (Hasegawa et al. 1993; Wakeley 1993; Meyer et al. 1999), y clasificado

como el tercer sitio más mutable del genoma mitocondrial por Soares et al. (2009). Por lo tanto, la utilidad de reconstrucción de fenómenos locales a través de este sitio queda limitada. Análisis de la región control completa o de la región codificante del ADNmt pueden brindarnos mutaciones adicionales que nos permitan identificar adecuadamente el linaje al que pertenece y ponerlo en un marco geográfico adecuado.

#### 5.2.2.2.3. C1+16092C

La secuencia HVRI del linaje C1+16092C compartida entre TR1 y las poblaciones actuales de Buenos Aires (Bobillo et al. 2010; Catelli et al. 2011), Montevideo (datos inéditos), Córdoba (Catelli et al. 2011), Formosa (Cabana et al. 2006) y Jujuy (datos inéditos) es idéntica en todos los casos. Esto indicaría que el área actual de distribución del linaje es el producto de la dispersión del mismo a partir de un posible centro de origen previo al 2300 A.P. Podemos intentar localizar el centro de origen del linaje analizando su frecuencia en diferentes poblaciones, y postulando como área de origen del linaje aquel donde presenta mayor frecuencia. Este supuesto es el seguido por García et al. (2012) para postular el origen y dispersión del subhaplogrupo D1j a partir del centro de Argentina. Realizando este ejercicio, constatamos que el linaje está presente en dos individuos de la provincia de Buenos Aires. Las fuentes (Bobillo et al. 2010; Catelli et al. 2011) omiten mayores datos en cuanto a localidad, y es posible que se trate de individuos de la región metropolitana de Buenos Aires. Si ese fuera el caso, nos encontramos frente a posibles inmigrantes de otras áreas del país, en particular el norte o Noroeste, o a países limítrofes del área andina (Avena et al. 2001). En caso de que, sin embargo, las muestras tengan raíces maternas profundas en la provincia, se abre la posibilidad de que sea Tres Reyes (o el área al que pertenece) el sitio de origen del linaje (Figura 5.1.B, punto "A").

También se puede realizar el ejercicio de buscar el centro de origen del linaje como la media ponderada por el tamaño muestral de las localizaciones registradas del linaje, lo cual en este caso ubicaría el origen del linaje en algún punto del centro de Argentina. Considerando la alta probabilidad de que las localizaciones en las localidades cosmopolitas de Buenos Aires y Montevideo sean el producto de migrantes del interior de los países

respectivos, optamos por eliminarlas de la muestra, lo cual ubica el centro de origen en la actual provincia de Santiago del Estero (Figura 5.1.B, punto “B”).

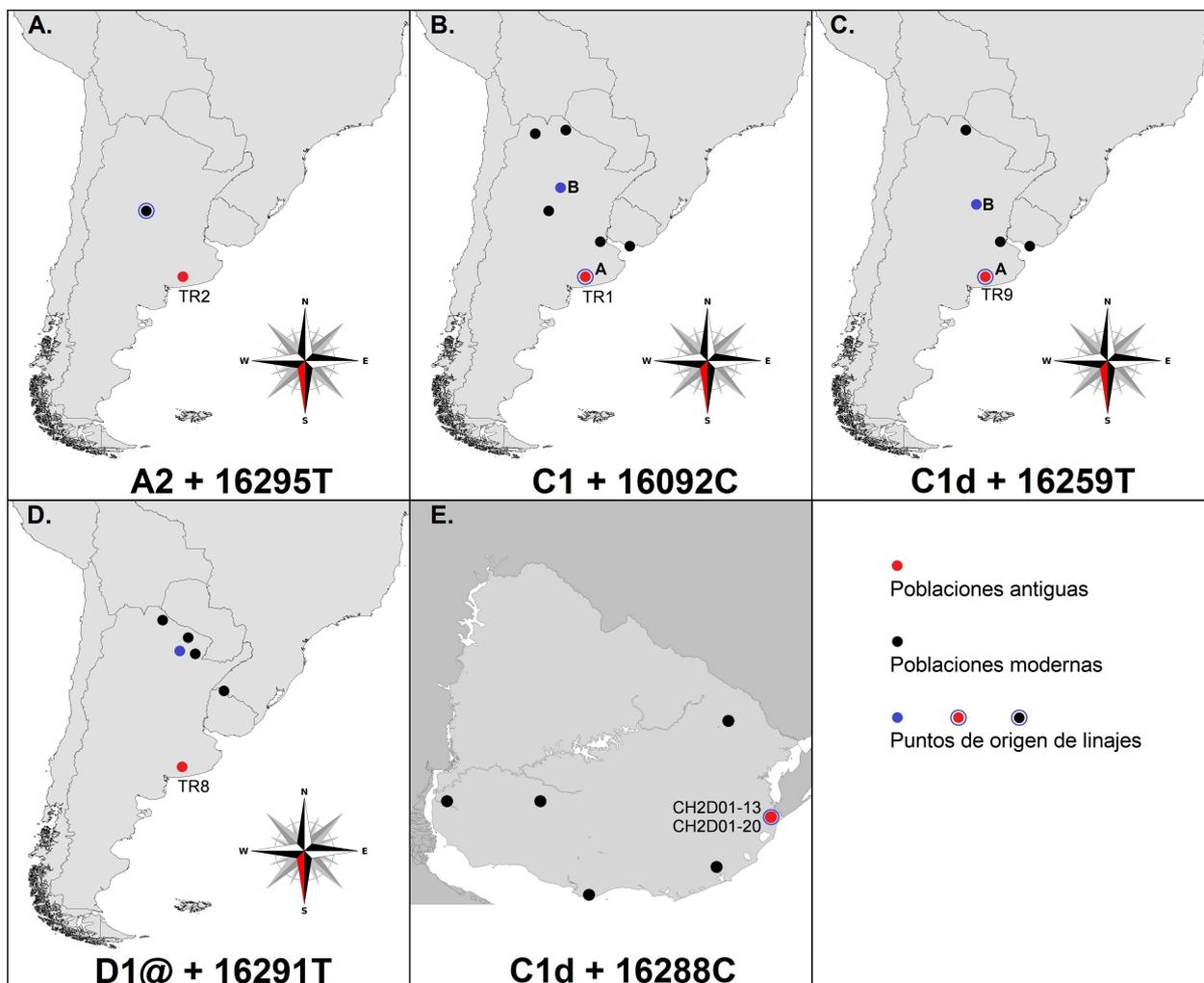


Figura 5.1: Localización geográfica de las muestras de diferentes linajes compartidos y sus orígenes.

#### 5.2.2.2.4. C1D+16259T

La forma del linaje C1d+16259T portada por TR9 cuenta con menos mutaciones que la secuencia compartida por las poblaciones actuales: las secuencias de Buenos Aires (Perego et al. 2010), de tres individuos Wichí de Formosa (Cabana et al. 2006) y la de Montevideo (Figueiro et al. 2011) cuentan con transiciones T→C en los sitios 16271 y 16311, este último sitio ya señalado como “rápido” y el primero, de baja tasa de mutación y, por lo tanto, relativamente estable. Considerando que no se ha encontrado al linaje C1d+16259 sin

mutaciones adicionales en ninguna población moderna, podemos plantear a la secuencia de TR9 como la primera de su linaje, surgido en algún momento previo al 2300 A.P., y el sitio Tres Reyes (o por lo menos la porción sudoriental de la provincia de Buenos Aires) como el lugar de origen del linaje (Figura 5.1.C, punto “A”).

A este escenario “a”, se agrega un escenario alternativo ya discutido a propósito de la autenticidad de las secuencias: que TR9 deba sus diferencias respecto a las poblaciones modernas en 16271 y 16311 a artefactos de PCR, siendo eventualmente portador de una secuencia idéntica a las demás del linaje, o con una de las mutaciones que lo definen. Suponiendo ese caso, podemos plantearnos calcular el lugar de origen del linaje como la media ponderada de la localización de las secuencias que la representan. La eliminación de las muestras de Buenos Aires y Montevideo, receptoras de migraciones desde el interior de sus respectivos países, deja como única población actual portadora del linaje a los Wichí de Formosa. El origen resultante del linaje es el centro de la provincia argentina de Santa Fe (Figura 5.1.C, punto “B”).

#### 5.2.2.2.5. D1+@16325

En cuanto al linaje del haplogrupo D1 con reversión en 16325 (D1+@16325), las dos muestras antiguas pertenecientes a este linaje representan condiciones filogenéticas y poblacionales diferentes:

1) El individuo *CG14E01-13*, del Este de Uruguay, agrega dos mutaciones a la reversión (16209C y 16304C), constituyendo un linaje único, sin representación en otras poblaciones antiguas y modernas. Eso podría indicar que el linaje D1+@16325 haya formado parte del poblamiento temprano del Este de Uruguay, y que el linaje representado por *CG14E01-13* sea una forma local derivada que no haya tenido oportunidad de dispersarse fuera del área del litoral Atlántico uruguayo, o que se haya extinguido. En cualquier caso, no es posible realizar más inferencias respecto al caso hasta tener, por vía de análisis de ADN antiguo o moderno, más datos.

2) El individuo *TR8*, al portar una mutación en la posición 16291, pertenece a un linaje afín hallado en Wichí, Pilagá y Toba de la provincia de Formosa (Cabana et al. 2006),

presente también en la actual población del Departamento de Artigas (Sans et al. en preparación), y diferente de la forma hallada en la Patagonia, que se caracteriza por el motivo mutacional adicional 16187T-16189C (Ginther et al. 1993; Bobillo et al. 2010). Si ignoramos las mutaciones adicionales 16294T y 16373A identificadas en TR8 (que podrían ser artefactos como se discutió anteriormente) se trataría de secuencias idénticas del mismo linaje, que para distinguir de la forma patagónica denominaremos D1@+16291. Debido a la alta frecuencia de este linaje en indígenas de Chaco, podemos postular como centro de origen del linaje el área oriental de la provincia argentina de Formosa, desde donde se habría dispersado hacia otras regiones. De ser este el caso, el individuo del linaje D1@+16291 enterrado en Tres Reyes representa el punto más austral de la presencia del linaje, a 1400km de su origen (Figura 5.1.D).

En el planteo de este escenario estamos suponiendo que el linaje, al igual que en la actualidad, estaba ausente de la región comprendida entre Tres Reyes (provincia de Buenos Aires) y el Chaco en tiempos prehistóricos, por lo que su presencia en Tres Reyes sería el producto de un evento puntual de movimiento a larga distancia. Es menester señalar que los grupos chaqueños fueron los últimos en ser sometidos al dominio del criollo, a finales del siglo XIX y principios del siglo XX, en tanto que el área intermedia, del centro de Argentina, la cuenca del Río de la Plata y la Mesopotamia argentina, fueron testigos de la presencia del europeo desde el siglo XVI (Hernández 1992). En el transcurso de estas dinámicas poblacionales intensas, es posible que ciertos linajes de ADN mitocondrial hayan desaparecido. Es, sin embargo, una importante evidencia en contra de este argumento el trabajo de García et al. (2012) que reconstruye el centro de origen en las Sierras Centrales del subhaplogrupo D1j y mapea su dispersión constatando una variación clinal de las frecuencias actuales del mismo. Esto indicaría que, sin descartar el papel de procesos históricos en la dispersión, la estabilidad histórica del componente indígena materno sería importante, con una tasa de extinción de linajes relativamente reducida.

## 5.2.2.2.6. C1D+16288C

El linaje C1d+16288C, detectado en el sitio CH2D01-A en el Este del Uruguay, cuenta con representantes modernos únicamente dentro del territorio del Uruguay. Asimismo, se identificó como el linaje de ADNmt del cacique Charrúa Vaimaca Perú, muerto en 1833 (Sans et al. 2010). Los análisis cronológicos, geográficos y de secuencia de las muestras antiguas y modernas (en uno de los cuales se efectuó la secuenciación completa del genoma mitocondrial), arroja los siguientes resultados, que discutimos en Sans et al. (2012):

- Aparte del motivo HVRI básico del linaje (16051G-16223T-16288C-16298C-16325C-16327T), tres sitios aparecen como polimórficos. El primero, 16140, se presenta en su estado primitivo (T) en CH2D01-20, y en su estado derivado (C) en CH2D01-13, registrándose una ambigüedad en Vaimaca Perú que puede deberse a heteroplasmia, a daño del ADN en algunas copias o a contaminación con ADN moderno. Todos los 5 individuos modernos del linaje portan la mutación 16140C. El individuo CH2D01-20 cuenta con una datación radiocarbónica directa de  $1610 \pm 46$  a.A.P. (AA-81800), que es marcada como la edad mínima del linaje. El individuo CH2D01-13 no cuenta con datación directa, estando la capa arqueológica en la que fue inhumado datada en  $1350 \pm 160$  a.A.P. (AC1198; (Bracco y Ures 1999). Considerando la extrema disparidad hallada en el Este de Uruguay entre las edades de los individuos y la capa de inhumación (Bracco 2006), y si aceptamos como heteroplasmia la ambigüedad 16140Y en el ADNmt de Vaimaca, podemos señalar la edad mínima de 16140C en 1350 años, aunque posiblemente no estaba fijada hace 200 años, estándolo en la población actual. La siguiente mutación, 16209C, está presente en tres individuos de los cinco modernos analizados, y ausente en las secuencias antiguas. Por último, 16519C, cuyo sitio fue secuenciado en tres de los individuos modernos, aparece en dos de ellos; su estado en la muestra antigua se desconoce. Su valor en reconstrucciones filogenéticas es, sin embargo, limitado, puesto que fue identificado como el sitio de mayor tasa de mutación del genoma mitocondrial (Soares et al. 2009).
- A nivel de la región codificante, ninguno de los individuos modernos del linaje porta la mutación 7697A, que fuera definida como diagnóstica del subhaplogrupo C1d por Tamm

et al. (2007) y Achilli et al. (2008), pero reconocida como polimórfica en el subhaplogrupo C1d por Perego et al. (2010) y Figueiro et al. (2011). En la muestra antigua, varios intentos de amplificación de dicho segmento fracasaron; por lo tanto, se desconoce su estado. En los individuos modernos en los que se secuenció la región control completa y parte de la región codificante, se identificaron las mutaciones 12378T (compartida por los tres individuos), 14922C y 15662G (presente sólo en un individuo) y 507C y 15313C (presentes en otro de los tres individuos).

- Los cinco individuos modernos portadores del linaje residen en Cerro Largo, Rocha, Trinidad (departamento de Flores), Soriano y Montevideo (Pagano et al. 2005; Sans et al. 2006; Figueiro et al. 2011; Sans et al. 2011). Una extrapolación del porcentaje de individuos de este linaje en la muestra total de secuencias de todo el país (5 en 728, o 0,7%) a la población uruguaya, la cantidad total de uruguayos contemporáneos con el linaje sería aproximadamente de 5500 individuos.

Debe enfatizarse que el linaje C1d+16288 no ha sido encontrado fuera del territorio uruguayo, con lo que nos encontramos frente a un linaje exclusivo de nuestro país. Llama particularmente la atención que el linaje no haya sido hallado en el sur del estado brasileño de Rio Grande do Sul, donde Marrero et al. (2007a) realizaron un estudio del aporte materno indígena en *gauchos* en busca elementos que sirvieran para definir el acervo genético de la macroetnia Charrúa, hallando solamente linajes que conectaban a los gauchos actuales con Guaraníes y Kaingang, o linajes de distribución continental. Debe agregarse además que ninguna de las mutaciones que definen al linaje en la región codificante ha sido hallada hasta el momento en el creciente número de secuencias mitocondriales completas de América. Por añadidura, la diversidad de secuencia a nivel de la región codificante (un total de 4 diferencias entre secuencias del linaje) apunta a un linaje con raíces temporales profundas en nuestro territorio. La suposición más sencilla en cuanto a la ubicación del centro de origen del linaje, y por la que optamos en este caso, es que se originó donde se le ha ubicado arqueológicamente, esto es, en el área de los “constructores de cerritos” en el departamento de Rocha (Figura 5.1.E).

En términos generales, para los linajes analizados, en lo referido al posible centro de origen de éstos, una explicación relativamente parsimoniosa es que el linaje se haya originado en el sitio donde se halla su representante más antiguo, es decir, el caso arqueológico del mismo. Esto fue considerado escenario posible para el linaje C1d+16259T por el eventual carácter primitivo de la secuencia de TR9, y en el caso del linaje C1d+16288C por la presencia de dos individuos prehistóricos en el Este con secuencias de las que las muestras modernas serían formas derivadas. Sin embargo, y si bien no puede descartarse como posibilidad en ningún caso, lo consideramos improbable para los linajes C1+16092 y D1@+16291T debido fundamentalmente a su actual distribución geográfica: el sitio Tres Reyes es en ambos casos el punto más austral de la distribución del linaje, y se encuentra ausente a latitudes mayores. En el caso del linaje D1+@16325, hay en Patagonia un linaje emparentado al de Tres Reyes pero con mutaciones diferentes, careciendo de la mutación 16291T y portando otras dos mutaciones. Por lo tanto, y aun considerando una posible inicio “reciente”, en Holoceno tardío final, de los contactos entre la Pampa y la Patagonia, en caso de un origen pampeano de los linajes C1+16092 y D1@+16291T, debería esperarse la presencia de éstos en Patagonia. La eventual aparición de los linajes en cuestión en muestras prehistóricas de latitudes australes aportaría a la contrastación de estas suposiciones.

### 5.2.3. IMPLICANCIAS PARA UN PANORAMA DIACRÓNICO DE LAS POBLACIONES DE LA REGIÓN PAMPEANA

Sobre la base de los elementos discutidos, podemos realizar una síntesis de elementos sincrónicos y diacrónicos de la microevolución y las dinámicas poblacionales prehistóricas en el área ampliamente comprendido como región pampeana:

1) La suposición de la composición haplotípica de un sitio – Arroyo Seco 2 – como representativa de toda la región pampeana en el Holoceno temprano, se basa en un problema de fragmentariedad del registro arqueológico: la muestra de Arroyo Seco 2 es la más antigua de la región, no existiendo otras muestras esqueléticas de edad equivalente,

con la excepción de individuos aislados (Politis y Bonomo 2011). Por lo tanto, y hasta que eventuales secuencias del ADNmt de los pobladores tempranos de la región pampeana nos permita establecer una imagen de mayor resolución respecto al *pool* génico de los mismos, la composición de Arroyo Seco servirá como un axioma de partida no verificado, sobre el cual nos apoyamos a lo largo de la investigación.

En cuanto a la generación de este acervo genético, podemos suponer, sobre la base de distintas evidencias en tal dirección, que la región continental del Cono Sur sudamericano fue poblado por un mismo *stock* poblacional en el correr de la transición Pleistoceno-Holoceno. Si bien se ha discutido una posible diferenciación temprana de las poblaciones andinas (Luiselli et al. 2000; Lewis et al. 2004) esto no atañe a las poblaciones que nos ocupan, localizadas hacia el este de la cordillera. Por otra parte, la posibilidad del poblamiento de Tierra del Fuego por dos contingentes poblacionales cronológicamente separados carece de sustento a nivel de ADNmt. Dos mecanismos pueden haber influido en la composición genética de este *stock*: por un lado, la reducción gradual de su variación por “efecto fundador seriado”; esto habría resultado en la ausencia del haplogrupo A en poblaciones de latitudes mayores a aproximadamente 35°S, y en la ausencia del haplogrupo B en poblaciones de latitudes más australes que aproximadamente 40°S. Por el otro, y en vista de las evidencias presentadas por Moraga et al. (2009) que hallan haplogrupo B en muestras de 8800 años de antigüedad en Patagonia, la deriva génica también podría haber actuado, dando lugar a la pérdida del haplogrupo B *a posteriori* del poblamiento por deriva génica. Cualquiera sea el caso, de acuerdo a la evidencia que se posee actualmente, es probable que la población de la región pampeana del Holoceno temprano haya sido relativamente homogénea, y que – por lo menos durante un período de la transición Pleistoceno-Holoceno – esta homogeneidad se haya mantenido por flujo génico, indirectamente inferido a través de redes de transporte de materias primas (Flegenhaimer et al. 2003).

2) La información de que disponemos no nos permite observar la evolución de las poblaciones de la región a lo largo del Holoceno, ya que carecemos de datos del Holoceno medio. Sin embargo, observamos que en el Holoceno tardío, las poblaciones de la región

pampeana argentina, el litoral del Río Uruguay y el litoral Atlántico uruguayo se encontraban diferenciadas. Por lo tanto, de las hipótesis de trabajo planteadas (ver *supra*, sección 2.2), la hipótesis nula de una falta de diferenciación entre las poblaciones del Holoceno tardío puede ser descartada, puesto que las frecuencias de haplogrupos entre las poblaciones analizadas difieren y, en las poblaciones para las que contamos con secuencias de la HVRI, los únicos motivos compartidos son los correspondientes al motivo ancestral del haplogrupo. En el caso de CG14E01-13 y TR8, que comparten el linaje D1+@16325, la divergencia entre las secuencias (totalizando como mínimo 3 mutaciones) nos indica que, si tienen ascendencia común, se podría tratar de un evento concomitante con el poblamiento inicial del área.

Sin embargo, sobre la base de los datos disponibles a nivel de frecuencias y motivos de secuencia, también estamos en condiciones de descartar la hipótesis alternativa 1, que postula una evolución independiente y aislada de cada linaje: la región pampeana argentina habría sido receptora de variación genética proveniente de poblaciones situadas más al norte (por ejemplo, de la región del Chaco), como posiblemente también sucedió con el Oeste de Uruguay – sin bien la falta de secuencias de dicha muestra nos impide profundizar al respecto. Por su parte, y si bien es probable que también haya sido sujeta a flujo génico, la población del Este del Uruguay no habría variado tan radicalmente con respecto a su *stock* original. La evidencia proporcionada por la diversidad de haplogrupos, la semejanza de su perfil de frecuencias con la muestra del Holoceno temprano, y por el linaje C1d+16288, de dispersión geográfica limitada a nuestro territorio, indican que durante el Holoceno, el Este de Uruguay habría acumulado estaba acumulando variación genética que habría mantenido un rango territorial limitado. En suma, la hipótesis 2, postulando contactos extrarregionales, sería la que mejor se ajusta a nuestros datos, si bien la intensidad del flujo génico sería diferente entre cada una de las poblaciones analizadas, encontrándose Tres Reyes en el extremo de un flujo génico más intenso y el Este uruguayo en el extremo de un flujo génico más limitado.

En cuanto a la gran variedad de linajes intercambiados entre la población representada por Tres Reyes y la región del Chaco, llama la atención la falta de linajes patagónicos en la muestra. Por ejemplo, en lugar de la forma patagónica del linaje

D1+@16325 que se encuentra en la actual provincia de Río Negro (Bobillo et al. 2010), lindante directamente con la Pampa suroriental donde se localiza Tres Reyes, se encuentra la forma chaqueña del mismo. Las investigaciones en el área de la cuenca inferior del Río Colorado, en la transición Pampa-Patagonia, durante el Holoceno tardío, indican que las poblaciones que la habitaban desarrollaron patrones de adaptación específicos, con una reorganización a nivel de tecnología, subsistencia, sistemas de asentamiento y movilidad en el Holoceno tardío final. Es recién en este período que se constatan evidencias en el área de contacto con las áreas adyacentes, en la forma de patrones de decoración formas de inhumación y morfología de artefactos líticos (Martínez 2008-2009). En este sentido, y en forma llamativa, por lo menos en términos genéticos el contacto con áreas al norte de la Pampa se abrió mucho antes de esta época.

Estas consideraciones aportan elementos a propósito de la hipótesis de reemplazo de poblaciones del sudeste de la región pampeana por otras provenientes de Patagonia (Barrientos y Pérez 2004) plantean como posible origen de estas poblaciones el río Chubut, a aproximadamente 700km de distancia). La muestra de Tres Reyes es una de las tomadas por Barrientos y Pérez (2005) para analizar la morfología craneana correspondiente al Holoceno tardío inicial (3500-2000 a.A.P.). Esta morfología difiere respecto a la del Holoceno medio inicial (8000-6000 a.A.P.) y representaría una población biológica diferente a ésta. Atendiendo a las críticas, formuladas sobre la base de evidencia arqueológica, de Martínez (2008-2009) y Politis (2008), y reconociendo las evidencias de convivencia de diferentes poblaciones a lo largo del Holoceno tardío final en la Pampa seca (Berón 2005), se puede afirmar que no hubo tal reemplazo. Ahora bien, sin llegar a postular un reemplazo poblacional, es posible afirmar que la población de Tres Reyes representa uno o varios eventos de flujo génico con poblaciones del norte del actual territorio argentino, en especial con la región del Chaco.

## 6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

### 6.1. CONCLUSIONES

A continuación se enumeran las principales conclusiones de la presente Tesis:

1. En el presente trabajo se analizaron los restos de un total de 85 individuos, alcanzando una determinación exitosa de haplogrupo de 45 individuos, cuya antigüedad se extiende de los 7800 a los 250 años radiocarbónicos antes del presente. La tasa de éxito general de este trabajo carece de correlación con la edad de las muestras, y deben invocarse otras causas para los casos no exitosos. Una causa importante de fracaso de la extracción fue la contaminación de las muestras, sea en el transcurso de la extracción de ADN o en la reacción de PCR. Se pueden definir tres fuentes de contaminación por ADN exógeno: alguno de los otros extractos analizados (contaminación cruzada o *carryover*), el investigador que realizó la extracción y amplificación por PCR del ADN de las muestras, y otros investigadores que manipularon las muestras, a veces durante varias décadas.
2. En cuanto a los resultados concretos de los análisis de las muestras, los resultados se resumen de la siguiente forma:
  - a. A nivel de las frecuencias de los haplogrupos A, B, C y D, se observa una reducida diversidad en la muestra de Arroyo Seco 2, empleada en este trabajo como representativa de las características del ADNmt de las poblaciones que poblaron la región pampeana durante la transición Pleistoceno/Holoceno. Las muestras del Oeste del Uruguay y la región pampeana argentina, ambas del Holoceno tardío, se hallan entre las muestras con mayor diversidad, mientras que la muestra del Este de Uruguay, aproximadamente del mismo rango temporal, tiene una diversidad menor, hallándose en la mitad del rango de diversidades entre el Holoceno temprano y el tardío.

- b. La comparación de las frecuencias de haplogrupos arroja que la muestra del Este uruguayo y la de Arroyo Seco se asemejan entre sí y a las poblaciones actuales de Cerro Largo y Tacuarembó. La muestra del Oeste del Uruguay es idéntica en frecuencias a los Mapuche de Argentina y similar a los Pilagá y Toba de la región del Chaco, y la muestra del Holoceno tardío de la Pampa argentina se asemeja a la población actual de la región y, en segunda instancia, a los Wichí de la provincia del Chaco. Por último, corresponde mencionar la fuerte similitud entre la muestra prehistórica del Uruguay y el componente indígena de la población actual del Uruguay.
  - c. Varios de los linajes de los haplogrupos A2, B2, C1 y D1 identificados a través de los análisis de secuencias en la muestra antigua son compartidos entre las muestras prehistóricas y una o varias poblaciones modernas. Se destacan los siguientes casos:
    - El linaje C1+16092C, hallado en el sitio Tres Reyes y presente en las poblaciones modernas del Chaco, el Noroeste argentino, Buenos Aires y Montevideo;
    - El linaje C1d+16259T, hallado en el sitio Tres Reyes y presente en las poblaciones modernas de Buenos Aires, Montevideo y el Chaco;
    - Una forma del linaje D1+@16325 con la mutación adicional 16291T, identificado en un individuo del sitio Tres Reyes, que se encuentra en tres poblaciones aborígenes actuales del Chaco y en el departamento uruguayo de Artigas;
    - El linaje C1d+16288C, identificado en el sitio CH2D01-A del Este de Uruguay e identificado en el Charrúa Vaimaca Perú y en 5 individuos en la población moderna. Este linaje no ha sido hasta el momento identificado fuera del territorio del Uruguay.
3. En suma, los resultados obtenidos llevan a las siguientes conclusiones sobre la dinámica temporal y espacial de las poblaciones humanas de la región pampeana durante el Holoceno:
    - a. La presencia de los haplogrupos B, C y D en la muestra de Arroyo Seco 2 indica una posible pérdida de haplogrupos por efecto fundador a medida que las poblaciones avanzaban hacia el sur. La correlación negativa de las frecuencias de los haplogrupos

A y B, y positiva de las frecuencias de B y C con la latitud, refuerzan esta propuesta de mecanismo. En virtud de ello, la presencia del haplogrupo A en muestras modernas debe tendría su origen en su arribo a la región pampeana desde latitudes menores luego del poblamiento inicial. La evidencia disponible no aporta al debate acerca de una oleada de poblamiento “paleoamericana” previa a la amerindia.

b. Si aceptamos a la muestra de Arroyo Seco como representativa de la estructura genética de toda la región durante el Holoceno temprano, las tres muestras poblacionales disponibles para el Holoceno tardío plantean un panorama de historias divergentes en distintas áreas de la región:

- El Oeste del Uruguay habría incorporado el haplogrupo A a través de flujo génico; la semejanza de la muestra a nivel de frecuencias con poblaciones de Chaco sugiere que este podría haber sido el origen del flujo. Sin embargo, para la muestra del Oeste del Uruguay únicamente se tiene datos por RFLP, razón por lo que la proveniencia de los nuevos linajes es incierta.
- Si bien el Este del Uruguay también habría sido sujeto a flujo génico en el correr del Holoceno, como atestigua la presencia de haplogrupo A en el Holoceno tardío, el área parece haber pasado por un período extenso de estabilidad a nivel su composición genética, a juzgar la ausencia de cambios notables en las frecuencias de los demás haplogrupos. Asimismo, los linajes informativos presentes en la muestra del Holoceno tardío consisten en un linaje sin representantes actuales y un linaje restringido al Uruguay.
- Por último, la muestra de Tres Reyes, representativa del Holoceno tardío de la región pampeana argentina, presenta frecuencias de haplogrupos de la muestra lo aproxima a las poblaciones del Chaco, tendencia confirmada por los análisis de secuencias, que ubican tres linajes chaqueños en el sitio. Un cuarto linaje compartido, perteneciente al haplogrupo A2, se encuentra actualmente en la provincia argentina de Córdoba. Para estos linajes se puede a) suponer como punto de origen para dichos linajes el sitio el sitio Tres Reyes; b) postular un centro intermedio de origen y difusión hacia Tres Reyes y sus localizaciones actuales; c) suponer el arribo de los linajes al área suroriental de la región

pampeana argentina provenientes de áreas correspondientes a su localización actual.

Aparte de las consideraciones expuestas, llama la atención la notable ausencia de linajes patagónicos entre los linajes compartidos de la muestra de Tres Reyes. Esto indicaría la falta de flujo génico con poblaciones localizadas en la vecindad austral inmediata del sitio, y el establecimiento de contactos hacia el norte, durante el Holoceno tardío inicial. En segundo lugar, se observa la semejanza en cuanto a frecuencias de haplogrupos con la región pampeana argentina actual, indicando una relativa estabilidad de la estructura genética del componente materno indígena del área desde el Holoceno tardío inicial hasta la actualidad, a pesar de las intensas dinámicas registradas en el Holoceno tardío final a partir del registro arqueológico y en tiempos históricos.

## 6.2. PERSPECTIVAS

### 6.2.1. SOBRE LOS ANÁLISIS DE ADN ANTIGUO EN MUESTRAS DE LA REGIÓN PAMPEANA

Las conclusiones arriba expuestas nos señalan vacíos de información a nivel de la estructura genética de poblaciones antiguas y modernas de la región pampeana que requieren trabajo futuro:

1. Para el trazado de las trayectorias poblacionales en la región pampeana en el Holoceno, debimos partir de la base de que la estructura de Arroyo Seco era representativa de toda la región. Esto sigue siendo un supuesto no verificado, contrastable únicamente con más muestras humanas correspondientes al Pleistoceno final o al Holoceno temprano. La mejor forma de sacar provecho de las muestras tempranas, en general de carácter excepcional, es la obtención de datos de secuencia de la resolución más alta posible. En este sentido, la secuenciación de alto rendimiento (*high-throughput sequencing*) presenta para estas muestras una serie de ventajas: además de posibilitar la obtención de genomas mitocondriales y nucleares completos a partir de muestras altamente

degradadas, garantiza la preservación de la muestra al ser necesaria una cantidad muy reducida de material de partida (50 mg frente al gramo de hueso requerido en los protocolos de extracción para análisis por PCR) y la posibilidad, mediante los análisis *in silico* de las secuencias, de identificar y descartar los productos de contaminación, reteniendo los segmentos auténticos (Stoneking y Krause 2011).

2. En cuanto al Holoceno tardío, la franja temporal cubierta es desde 2300 a.A.P. hasta aproximadamente 400 a.A.P. Sería posible extenderse levemente hacia atrás en el Holoceno tardío con muestras de la región pampeana argentina, pero el panorama arqueológico uruguayo no presenta dataciones radiocarbónicas sobre hueso humano de más de 1900 a.A.P. Es posible que futuros hallazgos – y futuras dataciones – brinden un marco temporal más amplio, además de mejorar el por ahora escaso panorama cronológico a nivel de restos humanos en el Uruguay.
3. Un registro arqueológico de especial relevancia para el estudio de dinámicas poblacionales en la región son los múltiples sitios del Holoceno tardío del delta del Paraná (Loponte et al. 2006; Politis et al. 2011). La obtención de muestras de esta área fracasó por motivos administrativos, por lo que, en principio, se depende de los análisis realizados por investigadores del territorio argentino para la generación de datos sobre la genética de dichas poblaciones. Por último, los datos de ADN antiguo de restos prehistóricos del centro de Argentina podrán arrojar resultados relevantes a propósito de linajes compartidos con el resto de la región pampeana. Este trabajo se encuentra en curso, con resultados alentadores (Nores y Demarchi 2011).

#### 6.2.2. SOBRE LOS ANÁLISIS DE ADN ANTIGUO EN EL URUGUAY

Los resultados obtenidos en la presente Tesis a propósito del acervo genético prehistórico de la población uruguayo señalan un conjunto de perspectivas, de carácter técnico y genético poblacional, que merecen nuestra atención para trabajo futuro:

1. El trabajo realizado pone de relieve el potencial y las limitantes del trabajo con ADN de restos antiguos en el Uruguay. Por motivos relacionados fundamentalmente con el

espacio de trabajo, los problemas de contaminación fueron en un momento extensivos, llevando a la constatación de problemas de infraestructura y equipamiento cuya solución es condición imprescindible para continuar con el trabajo en muestras antiguas. La actualización de los procedimientos de prevención ensayados en el año 2012 rindió resultados alentadores, y han comenzado a realizarse trabajos de adecuación del Laboratorio de ADN antiguo de Montevideo a partir de lo observado en el laboratorio de la Universidad de Utah.<sup>5</sup>

2. En cuanto a la información generada, un aumento en el tamaño muestral y la resolución de los datos nos permitirá refinar nuestro entendimiento de las dinámicas poblacionales en el territorio uruguayo durante el holoceno tardío. Asimismo, un aumento en la cantidad de dataciones radiocarbónicas sobre restos óseos humanos es imprescindible a fin de tener un marco cronológico adecuado, especialmente en la región Oeste, cuyo registro en un área tan reducida como la desembocadura del río Negro presenta una amplia heterogeneidad intersitio (ver *supra*, sección 3.1.3.1.1).
3. Por último, no debemos omitir la continuidad en la composición genética de entre la población prehistórica y el componente indígena moderno del Uruguay. Esta constatación, aparte de tener implicancias profundas para la construcción de la identidad nacional (Sans 2009; Sans 2011) señala direcciones para investigaciones futuras: las frecuencias de haplogrupos fundadores con mayor concordancia con la muestra prehistórica son las de Tacuarembó y Cerro Largo, que se cuentan entre las poblaciones del Uruguay con mayor aporte materno indígena, habiéndose además hallado el linaje C1d+16288 en Cerro Largo. Una profundización de los análisis de secuencias de ADN mitocondrial estas poblacionales puede rendir más linajes factibles de ser asociados con los grupos indígenas extintos del país. Paulatinamente, los datos de ADN antiguo de restos prehistóricos de nuestro país darán al ADNmt indígena del Uruguay una “profundidad de campo” cronológica adecuada.

---

<sup>5</sup> Los fondos para estos trabajos fueron provistos por la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) y la Comisión Permanente de Procesos y Condiciones de Estudio, Trabajo y Medio Ambiente Laboral en la Universidad de la República (PCET-MALUR).

## 7. REFERENCIAS CITADAS

- Abu Al-Soud W, y Rådström P. 2001. Purification and Characterization of PCR-Inhibitory Components in Blood Cells. *J Clin Microbiol* 39: 485-493.
- Achilli A, Perego UA, Bravi CM, Coble MD, Kong Q-P, Woodward SR, Salas A, Torroni A, y Bandelt H-J. 2008. The Phylogeny of the Four Pan-American mtDNA Haplogroups: Implications for Evolutionary and Disease Studies. *PLoS ONE* 3: e1764.
- Adler CJ, Haak W, Donlon D, y Cooper A. 2011. Survival and recovery of DNA from ancient teeth and bones. *J Archaeol Sci* 38: 956-964.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, y Lipman DJ. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *J Mol Biol* 215: 403-410.
- Alves-Silva J, da Silva Santos M, Guimarães PEM, Ferreira ACS, Bandelt H-J, Pena SDJ, y Ferreira Prado V. 2000. The Ancestry of Brazilian mtDNA Lineages. *Amer J Hum Genet* 67: 444-461.
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MHL, Coulson AR, Droulin J, Eperon IC, Nierlich DP, Rose BA, Sanger F et al. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457-465.
- Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, y Howell N. 1999. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet* 23: 147.
- Arredondo H. 1928. Informe Preliminar sobre la Arqueología de la Boca del Río Negro. *Revista de la Sociedad Amigos de la Arqueología*. Apartado.
- Austin JJ, Ross AJ, Smith AB, Fortey RA, y Thomas RH. 1997. Problems of reproducibility - does geologically ancient DNA survive in amber-preserved insects? *Proc R Soc Lond, Ser B: Biol Sci* 264: 467-474.
- Avena SA, Goicoechea AS, Bartomioli M, Fernandez V, Cabrera A, Dugoujon JM, Dejean C, Fabrykant G, y Carnese FR. 2007. Mestizaje en el sur de la Región Pampeana (Argentina). Su estimación mediante el análisis de marcadores proteicos y moleculares uniparentales. *Rev Argent Antropol Biol* 9: 56-76.
- Avena SA, Goicoechea AS, Dugoujon JM, Slepoy MG, Slepoy AS, y Carnese FR. 2001. Análisis antropogenético de los aportes indígena y africano en muestras hospitalarias de la ciudad de Buenos Aires. *Rev Argent Antropol Biol* 3: 79-99.
- Avena SA, Parolin ML, Boquet M, Dejean CB, Postillone MB, Alvarez Trentini Y, Di Fabio Rocca F, Mansilla F, Jones L, Dugoujon JM et al. 2010. Mezcla génica y linajes uniparentales en Esquel (Pcia. de Chubut). Su comparacion con otras muestras poblacionales argentinas. *J Basic Appl Genet* 21: 1-14.
- Avena SA, Parolin ML, Dejean CB, Ríos Part MC, Fabrikant G, Goicoechea AS, Dugoujon JM, y Carnese FR. 2009. Mezcla génica y linajes uniparentales en Comodoro Rivadavia (Prov. de Chubut, Argentina). *Rev Argent Antropol Biol* 11: 25-41.
- Bailliet G, Rothhammer F, Carnese FR, Bravi CM, y Bianchi NO. 1994. Founder Mitochondrial Haplotypes in Amerindian Populations. *Amer J Hum Genet* 54: 27-33.
- Bandelt H-J, Forster P, Sykes B, y Richards MB. 1995. Mitochondrial portraits of Human Populations Using Median Networks. *Genetics* 141: 743-753.
- Bandelt H-J, Forster P, y Röhl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16: 37-48.
- Barbosa AB, da Silva LAF, Azevedo DA, Balbino VQ, y Mauricio-da-Silva L. 2008. Mitochondrial DNA control region polymorphism in the population of Alagoas state, north-eastern Brazil. *J Forensic Sci* 53: 142-146.

- Baron H, Hummel S, y Herrmann B. 1996. Mycobacterium tuberculosis Complex DNA in Ancient Human Bones. *J Archaeol Sci* 23: 667-671.
- Barrientos G, y Pérez SI. 2004. La expansión y dispersión de poblaciones del norte de Patagonia durante el Holoceno tardío: evidencia arqueológica y modelo explicativo. En: Civalero MT, Fernández PM, y Guraieb AG, eds. *Contra viento y marea: Arqueología de Patagonia*. Buenos Aires: Instituto Nacional de Antropología y Pensamiento Latinoamericano. p 179-195.
- Barrientos G, y Pérez SI. 2005. Was there a population replacement during the Late mid-Holocene in the southeastern Pampas of Argentina? Archaeological evidence and Paleoecological basis. *Quat Int* 132: 95-105.
- Bayón C, y Flegenheimer N. 2004. Cambio de planes a través del tiempo para el traslado de roca en la pampa bonaerense. *Estudios Atacameños* 28: 59-70.
- Beals RL. 1957. Father Acosta on the First Peopling of the New World. *Amer Antiq* 23: 182-183.
- Bennett LB, Shriver MD, y Bowcock AM. 1998. Markers and Methods for Reconstructing Modern Human History. *DNA Sequence - The Journal of Sequencing and Mapping* 8: 329-341.
- Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, y Sayers EW. 2010. GenBank. *Nucleic Acids Res* 38(Database issue): D46-D51.
- Beovide L, Caporale M, y Baeza J. 2004. Arqueología costera en el área de la cuenca del río Santa Lucía, Uruguay. En: Beovide L, Barreto I, y Curbelo C, eds. *X Congreso Uruguayo de Arqueología: La Arqueología Uruguaya ante los desafíos del nuevo siglo*. Montevideo: Asociación Uruguaya de Arqueología (edición en CD-ROM).
- Beovide L, y Malán M. 2009. Puerto La Tuna: nuevos datos para un viejo debate. En: Beovide L, Erchini C, y Figueiro G, eds. *La arqueología como profesión: los primeros 30 años XI Congreso Nacional de Arqueología Uruguaya*. Montevideo: Asociación Uruguaya de Arqueología. p 97-110.
- Berón MA, y Politis GG. 1997. Arqueología pampeana en la década de los '90. Estado de las investigaciones y perspectivas. En: Berón MA, y Politis GG, eds. *Arqueología pampeana en la década de los '90*. Mendoza / Olavarría: Museo de Historia Natural de San Rafael / INCUAPA - UNCPBA. p 7-32.
- Berón MA. 2003. El sitio Chenque I. Un cementerio de cazadores-recolectores en La Pampa Seca. (Parque Nacional Lihue Calel, La Pampa, Argentina). *Atekna* 1: 241-272.
- Berón MA. 2005. Relaciones interétnicas e identidad social en el registro arqueológico. En: Williams V, y Alberti B, eds. *Género y etnicidad en la arqueología Sudamericana: Serie Teórica del INCUAPA nº 4*. Olavarría FACSU-UNICEN. p 119-138.
- Berón MA. 2007. Circulación de bienes como indicador de interacción entre las poblaciones de la Pampa Occidental y sus vecinos. En: Bayón C, Puppio A, González MI, Flegenheimer N, y Frére M, eds. *Arqueología en las Pampas, Tomo I*. Buenos Aires: Sociedad Argentina de Antropología. p 345-364.
- Bert F, Corella A, Gené M, Pérez-Pérez A, y Turbón D. 2004. Mitochondrial DNA diversity in the Llanos de Moxos: Moxo, Movima and Yuracare Amerindian populations from Bolivia lowlands. *Ann Hum Biol* 31: 9-28.
- Bertoni B, Figueiro G, Cabana G, McDonough JE, Bluteau C, Merriwether D, y Sans M. 2004. Primeras secuencias de ADN mitocondrial de indígenas prehistóricos del Uruguay. En: Beovide L, Barreto I, y Curbelo C, eds. *X Congreso Uruguayo de Arqueología: La Arqueología Uruguaya ante los desafíos del nuevo siglo*. Montevideo: Asociación Uruguaya de Arqueología (edición en CD-ROM).
- Bjørnstad G, Flagstad Ø, Hufthammer AK, y Røed KH. 2012. Ancient DNA reveals a major genetic change during the transition from hunting economy to reindeer husbandry in northern Scandinavia. *J Archaeol Sci* 39: 102-108.

- Bobillo M, Zimmermann B, Sala A, Huber G, Röck A, Bandelt H-J, Corach D, y Parson W. 2010. Amerindian mitochondrial DNA haplogroups predominate in the population of Argentina: towards a first nationwide forensic mitochondrial DNA sequence database. *Int J Legal Med* 124: 263-268.
- Bodner M, Perego UA, Huber G, Fendt L, Röck AW, Zimmermann B, Olivieri A, Gómez-Carballa A, Lancioni H, Angerhofer N et al. 2012. Rapid coastal spread of First Americans: Novel insights from South America's Southern Cone mitochondrial genomes. *Genome Res* 22: 811-820.
- Bonato SL, y Salzano FM. 1997a. Diversity and Age of the Four Major mtDNA Haplogroups, and Their Implications for the Peopling of the New World. *Amer J Hum Genet* 61: 1413-1423.
- Bonato SL, y Salzano FM. 1997b. A single and early migration for the peopling of the Americas supported by mitochondrial DNA sequence data. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 1866-1871.
- Bonilla C, Bertoni B, González S, Cardoso H, Brum-Zorrilla N, y Sans M. 2004. Substantial native American female contribution to the population of Tacuarembó, Uruguay, reveals past episodes of sex-biased gene flow. *Amer J Hum Biol* 16: 289-297.
- Bonomo M, Politis G, y Gianotti C. 2011. Montículos, Jerarquía Social y Horticultura en Las Sociedades Indígenas Del Delta Del Río Paraná (Argentina). *Latin Amer Antiq* 22: 297-333.
- Bonomo M, y Latini S. 2012. Arqueología y etnohistoria de la región metropolitana: las sociedades indígenas de Buenos Aires. En: *Buenos Aires, la historia de su pasaje natural*. Buenos Aires: Fundación de historia natural Félix de Azara. p 70-97.
- Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Wertheim van Dillen PME, y van der Nordaa J. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 28: 495-503.
- Boretto R, Bernal R, Schmitz PI, y Basile Becker I. 1973. Arqueología del Departamento de Río Negro. Esquema Tentativo de una Secuencia Cronológica para Sitios del Río Uruguay y Río Negro. *I Congreso Nacional de Arqueología III Encuentro de Arqueología del Interior: Antecedentes y anales de los congresos*. Fray Bentos: Museo Municipal de Historia Natural de Río Negro. p 215-251.
- Boyd WC. 1951. The Blood Groups and Types. En: Laughlin WS, ed. *The Physical Anthropology of the American Indian*. New York: The Viking Fund. p 127-137.
- Bracco R, y Ures C. 1999. Ritmos y dinámica constructiva de las estructuras monticulares. Sector Sur de la Cuenca de la Laguna Merín - Uruguay. En: López J, y Sans M, eds. *Arqueología y Bioantropología de las Tierras Bajas*. Montevideo: Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación. p 19-33.
- Bracco R. 2006. Montículos de la Cuenca de la Laguna Merín: Tiempo, Espacio y Sociedad. *Latin Amer Antiq* 17(4): 511-540.
- Bradley B, y Stanford D. 2004. The North Atlantic ice-edge corridor: a possible Palaeolithic route to the New World. *Wld Archaeol* 36(4): 459-478.
- Brown MD, Hosseini SH, Torroni A, Bandelt HJ, Allen JC, Schurr TG, Scozzari R, Cruciani F, y Wallace DC. 1998. mtDNA Haplogroup X: An Ancient Link between Europe/Western Asia and North America? *Amer J Hum Genet* 63: 1852-1861.
- Brum L. 2008. *Prácticas funerarias y complejidad emergente en el este uruguayo (departamento de Rocha)*. Monografía de grado inédita. Montevideo: Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación.
- Buikstra JE, y Ubelaker D, eds. 1994. *Standards for Data Collection from Human Skeletal Remains*. Fayetteville, Arkansas: Arkansas Archaeological Survey Research Series No. 44.
- Cabana GS, Merriwether DA, Hunley K, y Demarchi DA. 2006. Is the genetic structure of Gran Chaco populations unique? Interregional perspectives on native South American mitochondrial DNA variation. *Amer J Phys Anthropol* 131: 108-119.

- Cabrera Pérez L. 1993. Situaciones de contacto y políticas indígenas coloniales para el área uruguaya y surbrasileña. Trabajo presentado en el III Congreso Internacional de Etnohistoria. Santiago de Chile, manuscrito.
- Cabrera Pérez L. 1999. Funebria y sociedad entre los "constructores de cerritos" del Este uruguayo. En: López Mazz JM, y Sans M, eds. *Arqueología y Bioantropología de las Tierras Bajas*. Montevideo: Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación. p 63-80.
- Cabrera Pérez L. 2004. "Cerritos de Indios", transformaciones tecnológicas y mecanismos de construcción: Sitio CG14E01, "Isla Larga". En: Beovide L, Barreto I, y Curbelo C, eds. *X Congreso Uruguayo de Arqueología: La Arqueología Uruguaya ante los desafíos del nuevo siglo*. Montevideo: Asociación Uruguaya de Arqueología (edición en CD-ROM).
- Cabrera Pérez L, Durán Coirolo A, Femenías J, y Marozzi O. 2000. Investigaciones arqueológicas en el sitio CG14E01 ("Isla Larga") Sierra de San Miguel. Depto. Rocha. Uruguay. En: Durán Coirolo A, y Bracco Boksar R, eds. *Arqueología de las Tierras Bajas*. Montevideo: Ministerio de Educación y Cultura. p 183-194.
- Cabrera Pérez L, Lusiardo A, Figueiro G, y Sans M. 2013 en prensa. Señales de muerte violenta en un enterramiento en montículo en el este del Uruguay. En: López Mazz J, y Berón M, eds. *Indicadores arqueológicos de violencia, guerra y conflicto*. Montevideo: Comisión Sectorial de Investigación Científica / Universidad de la República.
- Cabrera Pérez L, y Marozzi O. 2001. Las áreas domésticas de los "constructores de cerritos": El sitio CG14E01. *Arqueología uruguaya hacia el fin del milenio: IX Congreso Nacional de Arqueología Uruguaya*. Montevideo: Gráficos del Sur. p 55-68.
- Cai D, Tang Z, Han L, Speller CF, Yang DY, Ma X, Cao Je, Zhu H, y Zhou H. 2009. Ancient DNA provides new insights into the origin of the Chinese domestic horse. *J Archaeol Sci* 36: 835-842.
- Cai D, Tang Z, Yu H, Han L, Ren X, Zhao X, Zhu H, y Zhou H. 2011. Early history of Chinese domestic sheep indicated by ancient DNA analysis of Bronze Age individuals. *J Archaeol Sci* 38: 896-902.
- Cano RJ, Poinar HN, Pieniazek NJ, Acra A, y Poinar Jr. GO. 1993. Amplification and sequencing of DNA from a 120-135-million-year-old weevil. *Nature* 363: 536-538.
- Caramelli D, Lalueza-Fox C, Vernesi C, Lari M, Casoli A, Mallegni F, Chiarelli B, Dupanloup I, Bertranpetit J, Barbujani G et al. 2003. Evidence for a genetic discontinuity between Neandertals and 24,000-year-old anatomically modern Europeans. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 6593-6597.
- Carlyle SW, Parr RL, Hayes MG, y O'Rourke DH. 2000. Context of Maternal Lineages in the Greater Southwest. *Amer J Phys Anthropol* 113: 85-101.
- Carnese FR, Mendisco F, Keyser C, Dejean CB, Dugoujon J-M, Bravi CM, Ludes B, y Crubézy E. 2010. Paleogenetical study of pre-Columbian samples from Pampa Grande (Salta, Argentina). *Amer J Phys Anthropol* 141: 452-462.
- Casas-Vargas A, Gómez A, Briceño I, Díaz-Matallana M, Bernal JE, y Rodríguez JV. 2011. High genetic diversity on a sample of pre-Columbian bone remains from Guane territories in northwestern Colombia. *Amer J Phys Anthropol* 146: 637-649.
- Castillo A. 2004. Excavaciones y museo: Profundizando en el conocimiento de los grupos "ceramistas" del litoral (Río Negro, Uruguay). En: Beovide L, Barreto I, y Curbelo C, eds. *X Congreso Uruguayo de Arqueología: La Arqueología Uruguaya ante los desafíos del nuevo siglo*. Montevideo: Asociación Uruguaya de Arqueología (edición en CD-ROM).
- Castiñeira C, Blasi A, Politis G, Bonomo M, Puerto L, Huarte R, Carbonari J, Mari F, y García-Rodríguez F. 2013. The origin and construction of pre-Hispanic mounds in the Upper Delta of the Paraná River (Argentina). *Archaeol Anthropol Sci* 5: 37-57.

- Catelli M, Alvarez-Iglesias V, Gomez-Carballa A, Mosquera-Miguel A, Romanini C, Borosky A, Amigo J, Carracedo A, Vullo C, y Salas A. 2011. The impact of modern migrations on present-day multi-ethnic Argentina as recorded on the mitochondrial DNA genome. *BMC Genet* 12: 77.
- Cavalli-Sforza LL, y Edwards AWF. 1967. Phylogenetic Analysis: Models and Estimation Procedures. *Evolution* 21: 550-570.
- Ciganda AL. 2009. *Informe de pasantía para la Licenciatura en Biología Humana*. Monografía de grado inédita. Montevideo: Licenciatura en Biología Humana.
- Clarke GN. 1999. Sperm cryopreservation: is there a significant risk of cross-contamination? *Human Reproduction* 14: 2941-2943.
- Cocilovo JA, Varela HH, Quevedo S, Standen V, y Costa-Junqueira MA. 2004. La diferenciación geográfica de la población humana arcaica de la costa norte de Chile (5000-3000 AP) a partir del análisis estadístico de rasgos métricos y no métricos del cráneo. *Rev Chil Hist Nat* 77: 679-693.
- Collard M, y Wood B. 2000. How reliable are human phylogenetic hypotheses? *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 5003-5006.
- Comas J. 1974. *Antropología de los pueblos iberoamericanos*. Barcelona: Editorial Labor.
- Cooper A, Mourier-Chauviré C, Chambers GK, von Haeseler A, Wilson AC, y Pääbo S. 1992. Independent origins of New Zealand moas and kiwis. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 8741-8744.
- Cooper A, y Poinar H. 2000. Ancient DNA: Do It Right or Not at All. *Science* 289: 1139.
- Crawford MH. 1998. *The origins of Native Americans: evidence from anthropological genetics*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Crespo CM, Lanata JL, Pérez A, Hajduk A, Avena SA, Carnese FR, y Dejean CB. 2012. Primeros resultados del análisis de ADN antiguo en restos esqueléticos de colecciones de museos de Bariloche y Puerto San Julián (Patagonia Argentina). Trabajo presentado en el XII Congreso de la Asociación Latinoamericana de Antropología Biológica. San José de Costa Rica.
- Curbelo C, Cabrera L, Fusco N, Martínez E, Bracco R, Femenías J, y López JM. 1990. Sitio CH2D01, área de San Miguel, Depto. de Rocha, R. O. del Uruguay. Estructura de sitio y zonas de actividad. *Revista do CEPA* 17: 333-344.
- Chinnery PF. 2006. Mitochondrial DNA in Homo Sapiens. En: Bandelt H-J, Macaulay V, y Richards M, eds. *Human Mitochondrial DNA and the Evolution of Homo sapiens*: Springer Berlin Heidelberg. p 3-15.
- de Saint Pierre M, Gandini F, Perego UA, Bodner M, Gómez-Carballa A, Corach D, Angerhofer N, Woodward SR, Semino O, Salas A et al. 2012. Arrival of Paleo-Indians to the Southern Cone of South America: New Clues from Mitogenomes. *PLoS ONE* 7: e51311.
- DeGiorgio M, Jakobsson M, y Rosenberg NA. 2009. Explaining worldwide patterns of human genetic variation using a coalescent-based serial founder model of migration outward from Africa. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 16057-16062.
- Deguilloux MF, Moquel J, Pemonge MH, y Colombeau G. 2009. Ancient DNA supports lineage replacement in European dog gene pool: insight into Neolithic southeast France. *J Archaeol Sci* 36: 513-519.
- Dejean CB, Crouau-Roy B, Goicoechea AS, Avena SA, y Carnese FR. 2004. Genetic variability in Amerindian populations of Northern Argentina. *Genet Mol Biol* 27: 489-495.
- Dejean CB, Goicoechea AS, Avena SA, Salaberry MT, Slepoy A, y Carnese FR. 2003. Linajes mitocondriales amerindios en una muestra poblacional de la región metropolitana de Buenos Aires. *Rev Argent Antropol Biol* 5: 65.
- Demarchi DA, Panzetta-Dutari GM, Colantonio SE, y Marcellino AJ. 2001. Absence of the 9-bp deletion of mitochondrial DNA in pre-Hispanic inhabitants of Argentina. *Hum Biol* 73: 575-582.

- Denaro M, Blanc H, Johnson MJ, Chen KH, Wilmsen E, Cavalli-Sforza LL, y Wallace DC. 1981. Ethnic variation in Hpa I endonuclease cleavage patterns of human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 5768-5772.
- Denevan WM. 1992. Native American Populations in 1492: Recent Research and a Revised Hemispheric Estimate. En: Denevan WM, ed. *The Native population of the Americas in 1492, second edition*. Madison: The University of Wisconsin Press. p xvii-xxix.
- Derenko MV, Grzybowski T, Malyarchuk BA, Czarny J, Miscicka-Sliwka D, y Zakharov IA. 2001. The presence of mitochondrial haplogroup X in Altaians from south Siberia. *Amer J Hum Genet* 69: 237-241.
- Dillehay TD. 1990. Mapuche ceremonial landscape, social recruitment and resource rights. *Wld Archaeol* 22: 223-241.
- Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, y Mattick JS. 1991. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res* 19: 4008.
- Dornelles CL, Bonatto SL, De Freitas LB, y Salzano FM. 2005. Is haplogroup X present in extant South American Indians? *Amer J Phys Anthropol* 127: 439-448.
- Drancourt M, Aboudharam G, Signoli M, Dutour O, y Raoult D. 1998. Detection of 400-year-old *Yersinia pestis* DNA in human dental pulp: An approach to the diagnosis of ancient septicemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 12637-12640.
- Easton RD, Merriwether DA, Crews DE, y Ferrell RE. 1996. mtDNA variation in the Yanomami: evidence for additional New World founding lineages. *Amer J Hum Genet* 59: 213-225.
- Ebenesersdóttir SS, Sigurðsson Á, Sánchez-Quinto F, Lalueza-Fox C, Stefánsson K, y Helgason A. 2011. A new subclade of mtDNA haplogroup C1 found in icelanders: Evidence of pre-columbian contact? *Amer J Phys Anthropol* 144: 92-99.
- Edwards CJ, MacHugh DE, Dobneykm, Martin L, Russell N, Horwitz LK, McIntosh SK, MacDonald KC, Helmer D, Tresset A et al. 2004. Ancient DNA analysis of 101 cattle remains: limits and prospects. *J Archaeol Sci* 31: 695-710.
- Eshleman JA, Malhi RS, y Smith DG. 2003. Mitochondrial DNA Studies of Native Americans: Conceptions and Misconceptions of the Population Prehistory of the Americas. *Evolutionary Anthropology* 12: 7-18.
- Eyre-Walker A, Smith NH, y Smith JM. 1999. How clonal are human mitochondria? *Proc R Soc Lond, Ser B: Biol Sci* 266: 477-483.
- Fabra M, y Demarchi DA. 2011. Geographic Patterns of Craniofacial Variation in Pre-Hispanic Populations from the Southern Cone of South America. *Hum Biol* 83: 491-507.
- Fagundes NJR, Kanitz R, Eckert R, Valls ACS, Bogo MR, Salzano FM, Smith DG, Silva WA, Zago MA, Ribeiro-dos-Santos AK et al. 2008b. Mitochondrial Population Genomics Supports a Single Pre-Clovis Origin with a Coastal Route for the Peopling of the Americas. *Amer J Hum Genet* 82: 583-592.
- Fagundes NJR, Kanitz R, y Bonatto SL. 2008a. A Reevaluation of the Native American MtDNA Genome Diversity and Its Bearing on the Models of Early Colonization of Beringia. *PLoS ONE* 3: e3157.
- Farias ME. 2005. *El guaraní arqueológico meridional: Entre el axioma y la heterodoxia*. Tesis de Doctorado inédita. Porto Alegre: Pontificia Universidad Católica do Rio Grande do Sul.
- Fehren-Schmitz L, Reindel M, Cagigao ET, Hummel S, y Herrmann B. 2010. Pre-Columbian population dynamics in coastal southern Peru: A diachronic investigation of mtDNA patterns in the Palpa region by ancient DNA analysis. *Amer J Phys Anthropol* 141: 208-221.
- Fehren-Schmitz L, Warnberg O, Reindel M, Seidenberg V, Tomasto-Cagigao E, Isla-Cuadrado J, Hummel S, y Herrmann B. 2011. Diachronic Investigations of Mitochondrial and Y-Chromosomal Genetic Markers in Pre-Columbian Andean Highlanders from South Peru. *Ann Hum Genet* 75: 266-283.

- Figueiro G, Hidalgo PC, y Sans M. 2011. Control Region Variability of Haplogroup C1d and the Tempo of the Peopling of the Americas. *PLoS ONE* 6: e20978.
- Figueiro G, y Sans M. 2007. Primeros resultados del análisis de ADN mitocondrial del sitio Arroyo Seco 2, Provincia de Buenos Aires, Argentina. *Rev Argent Antropol Biol* 9: 78.
- Figueiro G, y Sans M. 2008. Este versus Oeste: afinidades genéticas de las poblaciones prehistóricas del territorio uruguayo. Trabajo presentado en el X Congreso de la Asociación Latinoamericana de Antropología Biológica. La Plata.
- Figueiro G. 2006. *Estudio de las características y la continuidad de la población prehistórica de Arroyo Seco, Argentina, a través del ADN mitocondrial*. Tesis de Maestría inédita. Montevideo: Universidad de la República.
- Figueiro G. 2013 en prensa. Continuidad temporal en la composición genética de las poblaciones indígenas del Uruguay. *Colección Avances de Investigación (Tomo Docentes)*. Montevideo: Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación.
- Flegenheimer N, Bayón C, Valente M, Baeza J, y Femenías J. 2003. Long distance tool stone transport in the Argentine Pampas. *Quat Int* 109-110: 49-64.
- Forbes BA, y Hicks KE. 1996. Substances interfering with direct detection of Mycobacterium tuberculosis in clinical specimens by PCR: effects of bovine serum albumin. *J Clin Microbiol* 34: 2125-2128.
- Forster P, Harding R, Torroni A, y Bandelt HJ. 1996. Origin and evolution of Native American mtDNA variation: a reappraisal. *Amer J Hum Genet* 59: 935-945.
- Foulds LR, Hendy MD, y Penny D. 1979. A graph theoretic approach to the development of minimal phylogenetic trees. *J Mol Evol* 13: 127-149.
- Fountain D, Ralston M, Higgins N, Gorlin JB, Uhl L, Wheeler C, Antin JH, Churchill WH, y Benjamin RJ. 1997. Liquid nitrogen freezers: a potential source of microbial contamination of hematopoietic stem cell components. *Transfusion* 37: 585-591.
- García A, Pauro M, Nores R, Bravi CM, y Demarchi DA. 2012. Phylogeography of Mitochondrial Haplogroup D1: An Early Spread of Subhaplogroup D1j from Central Argentina. *Amer J Phys Anthropol* 149: 583-590.
- García A, y Demarchi DA. 2006. Linajes parentales amerindios en poblaciones del norte de Córdoba. *Rev Argent Antropol Biol* 8: 57-71.
- García A, y Demarchi DA. 2009. Incidence and Distribution of Native American mtDNA Haplogroups in Central Argentina. *Hum Biol* 81: 59-69.
- García F, Moraga M, Vera S, Henríquez H, Llop E, Aspillaga E, y Rothhammer F. 2006. mtDNA microevolution in Southern Chile's archipelagos. *Amer J Phys Anthropol* 129: 473-481.
- García-Bour J, Pérez-Pérez A, Álvarez S, Fernández E, López-Parra AM, Arroyo-Pardo E, y Turbón D. 2004. Early Population Differentiation in Extinct Aborigines From Tierra del Fuego-Patagonia: Ancient mtDNA Sequences and Y-Chromosome STR Characterization. *Amer J Phys Anthropol* 123: 361-370.
- Gascue A, Bortolotto N, Fleitas M, y Gómez Trincabelli J. 2011a. *Informe arqueológico para el Área protegida Esteros de Farrapos y zona de influencia: relevamiento de antecedentes*. CURE - FHCE, informe técnico a SNAP: Esteros de Farrapos. Inédito.
- Gascue A, Bortolotto N, y Gómez Trincabelli J. 2011b. *Informe sobre los materiales arqueológicos depositados en el Centro Democrático de Nuevo Berlín (Río Negro)*. Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación, informe técnico al Municipio de Nuevo Berlín. Inédito.
- Gascue C, Mimbacas A, Sans M, Gallino JP, Bertoni B, Hidalgo PC, y Cardoso H. 2005. Frequencies of the Four Major Amerindian mtDNA Haplogroups in the Population of Montevideo, Uruguay. *Hum Biol* 77: 873-878.
- Gianotti C. 2005. Arqueología del Paisaje en Uruguay. Origen y desarrollo de la arquitectura en tierra y su relación con la construcción del espacio doméstico en la prehistoria de las tierras bajas.

- En: Mameli L, y Muntañola E, eds. *América Latina: realidades diversas*. Barcelona: Instituto Catalán de Cooperación Iberoamericana - Casa de América. p 104-123.
- Gidley JW. Paleontological Evidence Bearing on the Problem of the Origin of the American Aborigines. En: Fewkes, JW ed. "The Problems of the Unity or Plurality and the Probable Place of Origin of the American Aborigines". *Amer Anthropol* 14: 18-23.
- Giles RE, Blanc H, Cann HM, y Wallace DC. 1980. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 6715-6719.
- Ginther C, Corach D, Penacino GA, Rey JA, Carnese FR, Hutz MH, Anderson A, Just J, Salzano FM, y King MC. 1993. Genetic variation among the Mapuche Indians from the Patagonian region of Argentina: mitochondrial DNA sequence variation and allele frequencies of several nuclear genes. *Experientia Supplementum* 67: 211-219.
- Goicoechea AS, Carnese FR, Dejean C, Avena SA, Weimer TA, Franco MHLP, S.M. Callegari-Jacques, Estalote AC, Simões MLMS, Palatnik M et al. 2001. Genetic Relationships Between Amerindian Populations of Argentina. *Amer J Phys Anthropol* 115: 133-143.
- González-José R, Bortolini MC, Santos FR, y Bonatto SL. 2008. The peopling of America: Craniofacial shape variation on a continental scale and its interpretation from an interdisciplinary view. *Amer J Phys Anthropol* 137: 175-187.
- Gonzalez-José R, Gonzalez-Martin A, Hernandez M, Pucciarelli HM, Sardi M, Rosales A, y Van der Molen S. 2003. Craniometric evidence for Palaeoamerican survival in Baja California. *Nature* 425: 62-65.
- González-José R, Neves W, Lahr MM, González S, Pucciarelli H, Martínez MH, y Correal G. 2005. Late Pleistocene/Holocene craniofacial morphology in Mesoamerican Paleoindians: Implications for the peopling of the New World. *Amer J Phys Anthropol* 128: 772-780.
- González-Oliver A, Márquez-Morfín L, Jiménez JC, y Torre-Blanco A. 2001. Founding Amerindian Mitochondrial DNA Lineages in Ancient Maya From Xcaret, Quintana Roo. *Amer J Phys Anthropol* 116: 230-235.
- Götherström A, Collins MJ, Angerbjörn A, y Lidén K. 2002. Bone preservation and DNA amplification. *Archaeometry* 44: 395-404.
- Green RE, Krause J, Briggs AW, Maricic T, Stenzel U, Kircher M, Patterson N, Li H, Zhai W, Fritz MH-Y et al. 2010. A Draft Sequence of the Neandertal Genome. *Science* 328: 710-722.
- Greenberg JH, Turner II CG, y Zegura SL. 1986. The settlement of the Americas: A comparison of the linguistic, dental end genetic evidence. *Curr Anthropol* 4: 477-497.
- Grier C, Flanigan K, Winters M, Jordan LG, Lukowski S, y Kemp BM. 2013. Using ancient DNA identification and osteometric measures of archaeological Pacific salmon vertebrae for reconstructing salmon fisheries and site seasonality at Dionisio Point, British Columbia. *J Archaeol Sci* 40: 544-555.
- Guardado-Estrada M, Medina-Martinez I, Juarez-Torres E, Roman-Bassaure E, Macias L, Alfaro A, Alcantara-Vazquez A, Alonso P, Gomez G, Cruz-Talonia F et al. 2012. The Amerindian mtDNA haplogroup B2 enhances the risk of HPV for cervical cancer: de-regulation of mitochondrial genes may be involved. *J Hum Genet* 57: 1434-5161.
- Hagelberg E, Goldman N, Liò P, Whelan S, Schiefenhövel W, Clegg JB, y K BD. 1999. Evidence for mitochondrial DNA recombination in a human population of island Melanesia. *Proc R Soc Lond, Ser B: Biol Sci* 266: 485-492.
- Hagelberg E, y Clegg JB. 1991. Isolation and Characterization of DNA from Archaeological Bone. *Proc R Soc Lond, Ser B: Biol Sci* 244: 45-50.
- Hagelberg E. 1994. Ancient DNA Studies. *Evolutionary Anthropology* 2: 199-207.
- Handt O, Krings M, Ward RH, y Pääbo S. 1996. The Retrieval of Ancient Human DNA Sequences. *Amer J Hum Genet* 59: 368-376.

- Hänni C, Brousseau T, Laudet V, y Stehelin D. 1995. Isopropanol precipitation removes PCR inhibitors from ancient bone extracts. *Nucleic Acids Res* 23: 881-882.
- Harpending HC. 1994. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Hum Biol* 66: 591-600.
- Harris H. 1966. Enzyme Polymorphisms in Man. *Proc R Soc Lond, Ser B: Biol Sci* 164: 298-310.
- Hasegawa M, Di Rienzo A, Kocher TD, y Wilson AC. 1993. Toward a more accurate time scale for the human mitochondrial DNA tree. *J Mol Evol* 37: 347-354.
- Hauswirth WW, Dickel CD, Rowold DJ, y Hauswirth MA. 1994. Inter- and intrapopulation studies of ancient humans. *Experientia* 50: 585-591.
- Hawass Z, Gad YZ, Ismail S, Khairat R, Fathalla D, Hasan N, Ahmed A, Elleithy H, Ball M, Gaballah F et al. 2010. Ancestry and pathology in king tutankhamun's family. *JAMA* 303: 638-647.
- Hedges REM. 2002. Bone diagenesis: an overview of processes. *Archaeometry* 44: 319-328.
- Helgason A, Hickey E, Goodacre S, Bosnes V, Stefánsson K, Ward R, y Sykes B. 2001. mtDNA and the Islands of the North Atlantic: Estimating the Proportions of Norse and Gaelic Ancestry. *Amer J Hum Genet* 68: 723-737.
- Henn BM, Gignoux CR, Feldman MW, y Mountain JL. 2009. Characterizing the Time Dependency of Human Mitochondrial DNA Mutation Rate Estimates. *Mol Biol Evol* 26: 217-230.
- Hernández I. 1992. *Los indios de Argentina*. Madrid: MAPFRE.
- Hernández I. 2003. *Autonomía o ciudadanía incompleta: El Pueblo Mapuche en Chile y Argentina*. Santiago de Chile: Pehuén Editores.
- Heyer E, Zietkiewicz E, Rochowski A, Yotova V, Puymirat J, y Labuda D. 2001. Phylogenetic and Familial Estimates of Mitochondrial Substitution Rates: Study of Control Region Mutations in Deep-Rooting Pedigrees. *Amer J Hum Genet* 69: 1113-1126.
- Higuchi R, Bowman B, Freiberger M, Ryder OA, y Wilson AC. 1984. DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature* 312: 282-284.
- Ho SYW, Phillips MJ, Cooper A, y Drummond AJ. 2005. Time Dependency of Molecular Rate Estimates and Systematic Overestimation of Recent Divergence Times. *Mol Biol Evol* 22: 1561-1568.
- Hofreiter M, Jaenicke V, Serre D, von Haeseler A, y Pääbo S. 2001. DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA. *Nucleic Acids Res* 29: 4793-4799.
- Horai S, Kondo R, Nakagawa-Hattori Y, Hayashi S, Sonoda S, y Tajima K. 1993. Peopling of the Americas, founded by four major lineages of mitochondrial DNA. *Mol Biol Evol* 10: 23-47.
- Höss M, Jaruga P, Zastawny TH, Dizdaroglu M, y Pääbo S. 1996. DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. *Nucleic Acids Res* 24: 1304-1307.
- Höss M, y Pääbo S. 1993. DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method. *Nucleic Acids Res* 21: 3913-3914.
- Hrdlička A. The Bearing of Physical Anthropology on the Problems under Consideration. En: Fewkes, JW ed. "The Problems of the Unity or Plurality and the Probable Place of Origin of the American Aborigines". *Amer Anthropol* 14: 8-12.
- Hrdlička A, Holmes WH, Willis B, Wright FE, y Fenner CN. 1912. *Early man in South America (Bureau of American Ethnology, Bulletin no. 52)*. Washington: Government Printing Office.
- Hubbe M, Harvati K, y Neves W. 2011. Paleoamerican morphology in the context of European and East Asian late Pleistocene variation: Implications for human dispersion into the new world. *Amer J Phys Anthropol* 144: 442-453.
- Hubby JL, y Lewontin R. 1966. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. I. The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 54: 577-594.

- Innis MA, Myambo KB, Gelfand DH, y Brow MA. 1988. DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 9436-9440.
- Iriarte J, Holst I, Marozzi O, Listopad C, Alonso E, Rinderknecht A, y Montaña J. 2004. Evidence for cultivar adoption and emerging complexity during the mid-Holocene in the La Plata basin. *Nature* 432: 614-617.
- Jaenicke-Després V, Buckler ES, Smith BD, Gilbert MTP, Cooper A, Doebley J, y Pääbo S. 2003. Early Allelic Selection in Maize as Revealed by Ancient DNA. *Science* 302: 1206-1208.
- Jara P, Villegas V, López de Mesa C, Torres D, Bautista E, Bernal J, Gómez A, y Briceño I. 2007. Análisis de polimorfismos del ADN mitocondrial (ADNmt) en un grupo precolombino Muisca. *Cuadernos de medicina en investigación y salud* 1: 103-111.
- Johnson MJ, Wallace DC, Ferris DC, Rattazzi MC, y Cavalli-Sforza LL. 1983. Radiation of Human Mitochondrial DNA Types Analyzed by Restriction Endonuclease Cleavage Patterns. *J Mol Evol* 19: 255-271.
- Jorde LB. 1985. Human Genetic Distance Studies: Present Status and Future Prospects. *Annu Rev Anthropol* 14: 343-373.
- Kaestle FA, y Smith DG. 2001. Ancient Mitochondrial DNA Evidence for Prehistoric Population Movement: The Numic Expansion. *Amer J Phys Anthropol* 115: 1-12.
- Kemp BM, González-Oliver A, Malhi RS, Monroe C, Schroeder KB, McDonough J, Rhett G, Resendéz A, Peñalosa-Espinosa RI, Buentello-Malo L et al. 2010. Evaluating the Farming/Language Dispersal Hypothesis with genetic variation exhibited by populations in the Southwest and Mesoamerica. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 6759-6764.
- Kemp BM, Malhi RS, McDonough J, Bolnick DA, Eshleman JA, Rickards O, Martinez-Labarga C, Johnson JR, Lorenz JG, Dixon EJ et al. 2007. Genetic analysis of early holocene skeletal remains from Alaska and its implications for the settlement of the Americas. *Amer J Phys Anthropol* 132: 605-621.
- Kemp BM, Tung TA, y Summar ML. 2009. Genetic continuity after the collapse of the Wari empire: Mitochondrial DNA profiles from Wari and post-Wari populations in the ancient Andes. *Amer J Phys Anthropol* 140: 80-91.
- Kemp BM, y Schurr TG. 2010. Ancient and Modern Genetic Variation in the Americas. En: Auerbach BM, ed. *Human Variation in the Americas*. Carbondale: Center for Archaeological Investigations, Occasional Paper No. 38. Southern Illinois University. p 12-50.
- Kemp BM, y Smith DG. 2005. Use of bleach to eliminate contaminating DNA from the surface of bones and teeth. *Forensic Sci Int* 154: 53-61.
- Kimura M, y Weiss GH. 1964. The stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. *Genetics* 49: 561-576.
- Kreider CA. 1996. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Appl Environ Microbiol* 62: 1102-1106.
- Krings M, Capelli C, Tschentscher F, Geisert H, Meyer S, von Haeseler A, Grossschmidt K, Possnert G, Paunovic M, y Pääbo S. 2000. A view of Neandertal genetic diversity. *Nat Genet* 26: 144-146.
- Krings M, Stone AC, Schmitz RW, Krainitzki H, Stoneking M, y Pääbo S. 1997. Neandertal DNA Sequences and the Origin of Modern Humans. *Cell* 90: 19-30.
- Kruskal JB. 1956. On the Shortest Spanning Subtree of a Graph and the Traveling Salesman Problem. *Proceedings of the American Mathematical Society* 7: 48-50.
- Kruskal JB. 1964a. Multidimensional scaling by optimizing goodness of fit to a nonmetric hypothesis. *Psychometrika* 29: 1-27.
- Kruskal JB. 1964b. Nonmetric multidimensional scaling: A numerical method. *Psychometrika* 29: 115-129.

- Kumar S, Bellis C, Zlojutro M, Melton PE, Blangero J, y Curran JE. 2011. Large scale mitochondrial sequencing in Mexican Americans suggests a reappraisal of Native American origins. *BMC Evol Biol* 11: 293.
- Laguens A. 2009. De la diáspora al laberinto: Notas y reflexiones sobre la dinámica relacional del poblamiento humano en el centro-sur de Sudamérica. *Arqueología Suramericana* 5: 42-67.
- Lalueza C, Pérez-Pérez A, Prats E, Cornudella L, y Turbón D. 1997. Lack of founding Amerindian mitochondrial DNA lineages in extinct Aborigines from Tierra del Fuego-Patagonia. *Hum Mol Genet* 6: 41-46.
- Lalueza-Fox C, Sampietro ML, Caramelli D, Puder Y, Lari M, Calafell F, Martínez-Maza C, Bastir M, Fordea J, de la Rasilla M et al. 2005. Neandertal Evolutionary Genetics: Mitochondrial DNA Data from the Iberian Peninsula. *Mol Biol Evol* 22: 1077-1081.
- Lewis CM, Buikstra JE, y Stone AC. 2007a. Ancient DNA and Genetic Continuity in the South Central Andes. *Latin Amer Antiq* 18: 145-160.
- Lewis CM, Lizárraga B, Tito RY, López PW, Iannaccone GC, Medina A, Martínez R, Polo SI, de la Cruz AF, Cáceres AM et al. 2007b. Mitochondrial DNA and the Peopling of South America. *Hum Biol* 79: 159-178.
- Lewis CM, Tito RY, Lizárraga B, y Stone AC. 2004. Land, Language, and Loci: mtDNA in Native Americans and the Genetic History of Peru. *Amer J Phys Anthropol* 127: 351-360.
- Lindahl T. 1993. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362: 709-715.
- López Mazz JM. 1999. Construcción del paisaje y cambio cultural en las tierras bajas de la Laguna Merín. En: López Mazz JM, y Sans M, eds. *Arqueología y Bioantropología de las Tierras Bajas*. Montevideo: Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación. p 35-65.
- López Mazz JM. 2001. Las estructuras tumulares (Cerritos) del litoral Atlántico Uruguayo. *Latin Amer Antiq* 12: 231-255.
- López Mazz JM, Gascue A, y Moreno Rudolph F. 2003-2004. La prehistoria del este del Uruguay: cambio cultural y aspectos ambientales. *AnMurcia* 19-20: 9-24.
- López Mazz JM, Nadal O, Suárez X, de León V, y Salvo X. 2009. La gestión regional de los recursos minerales en las tierras bajas del este: el espacio como variable de la producción lítica. En: Beovide L, Erchini C, y Figueiro G, eds. *La arqueología como profesión: los primeros 30 años XI Congreso Nacional de Arqueología Uruguaya*. Montevideo: Asociación Uruguaya de Arqueología. p 473-485.
- Loponte D, Acosta A, y Musali J. 2006. Complexity among Hunter-Gatherers from the Pampean Region, South America. En: Grier C, Kim J, y Uchiyama J, eds. *Beyond affluent foragers: rethinking hunter-gatherer complexity*. Oxford: Oxbow Books. p 106-125.
- Luiselli D, Simoni L, Tarazona-Santos E, Pastor S, y Pettener D. 2000. Genetic Structure of Quechua-Speakers of the Central Andes and Geographic Patterns of Gene Frequencies in South Amerindian Populations. *Amer J Phys Anthropol* 113: 5-17.
- Macaulay V, Hill C, Achilli A, Rengo C, Clarke D, Meehan W, Blackburn J, Semino O, Scozzari R, Cruciani F et al. 2005. Single, Rapid Coastal Settlement of Asia Revealed by Analysis of Complete Mitochondrial Genomes. *Science* 308: 1034-1036.
- Macaulay V, Richards M, y Sykes B. 1999. Mitochondrial DNA recombination - no need to panic. *Proc R Soc Lond, Ser B: Biol Sci* 266: 2037-2039.
- MacHugh DE, Edwards CJ, Bailey JF, Bancroft DR, y Bradley DG. 2000. The Extraction and Analysis of Ancient DNA From Bone and Teeth: a Survey of Current Methodologies. *Ancient Biomol* 3: 81-102.
- Maeso C. 1977. *Investigaciones arqueológicas*. Montevideo: Imprenta Don Bosco.
- Malécot G. 1969. *The Mathematics of Heredity*. San Francisco: W H Freeman.
- Malhi RS, Kemp BM, Eshleman JA, Cybulski J, Smith DG, Cousins S, y Harry H. 2007. Mitochondrial haplogroup M discovered in prehistoric North Americans. *J Archaeol Sci* 34: 642-648.

- Malhi RS, y Smith DG. 2002. Brief Communication: Haplogroup X Confirmed in Prehistoric North America. *Amer J Phys Anthropol* 119: 84-86.
- Malmström H, Storå J, Dalén L, Holmlund G, y Götherström A. 2005. Extensive Human DNA Contamination in Extracts from Ancient Dog Bones and Teeth. *Mol Biol Evol* 22: 2040-2047.
- Mandrini RJ, y Ortelli S. 2002. Los "araucanos" en las pampas. En: Boccara G, ed. *Colonización, resistencia y mestizaje en las Américas (siglos XVI-XX)*. Quito: Ediciones Aya-Yala/Instituto Francés de Estudios Andinos. p 237-257.
- Manly BFJ. 1994. *Multivariate Statistical Methods: A Primer. Second Edition*. London / New York: Chapman & Hall / CRC.
- Mantel N. 1967. The Detection of Disease Clustering and a Generalized Regression Approach. *Cancer Res* 27: 209-220.
- Marota I, Basile C, Ubaldi M, y Rollo F. 2002. DNA decay rate in papyri and human remains from Egyptian archaeological sites. *Amer J Phys Anthropol* 117: 310-318.
- Marrero AR, Pereira Das Neves Leite F, De Almeida Carvalho B, Martins Peres L, Kommers TC, Mânica Da Cruz I, Salzano FM, Ruiz-Linares A, Araújo Da Silva Júnior W, y Cátira Bortolini M. 2005. Heterogeneity of the genome ancestry of individuals classified as White in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Amer J Hum Biol* 17: 496-506.
- Marrero AR, Bravi C, Stuart S, Long JC, Pereira das Neves Leite F, Kommers T, Carvalho CMB, Pena SDJ, Ruiz-Linares A, Salzano FM et al. 2007a. Pre- and Post-Columbian Gene and Cultural Continuity: The Case of the *Gaucho* from Southern Brazil. *Hum Hered* 64: 160-171.
- Marrero AR, Silva-Junior WA, Bravi CM, Hutz MH, Petzl-Erler ML, Ruiz-Linares A, Salzano FM, y Bortolini MC. 2007b. Demographic and Evolutionary Trajectories of the Guarani and Kaingang Natives of Brazil. *Amer J Phys Anthropol* 132: 301-310.
- Martínez G. 2008-2009. Arqueología del curso inferior del río Colorado: estado actual del conocimiento e implicaciones para la dinámica poblacional de cazadores-recolectores pampeano-patagónicos. *Cazadores-recolectores del Cono Sur - Revista de Arqueología* 3: 71-92.
- Martínez Marignac VL, Bertoni B, Parra EJ, y Bianchi NO. 2004. Characterization of Admixture in an Urban Sample from Buenos Aires, Argentina, Using Uniparentally and Biparentally Inherited Genetic Markers. *Hum Biol* 76: 543-557.
- Maruca Sosa R. 1957. *La nación Charrúa*. Montevideo: Editorial Letras.
- Mazzanti DL. 2006. La construcción de territorios sociales durante el Holoceno tardío. El caso de las sierras de Tandilia, Argentina. *Relaciones de la Sociedad Argentina de Antropología* XXXI: 277-300.
- Meltzer DJ. 2006. *Folsom: New Archaeological Investigations of a Classic Paleoindian Bison Kill*. Berkeley: University of California Press.
- Mendisco F, Keyser C, Hollard C, Seldes V, Nielsen AE, Crubézy E, y Ludes B. 2011. Application of the iPLEXTM Gold SNP genotyping method for the analysis of Amerindian ancient DNA samples: Benefits for ancient population studies. *Electrophoresis* 32: 386-393.
- Merriwether DA, Cabana GS, y Reed DM. 2000. *Kennewick Man Ancient DNA Analysis: Final Report Submitted to the Department of the Interior, National Park Service*. [http://www.cr.nps.gov/archeology/Kennewick/Merriwether\\_Cabana.htm](http://www.cr.nps.gov/archeology/Kennewick/Merriwether_Cabana.htm) (acceso marzo 2013).
- Merriwether DA, Rothhammer F, y Ferrell RE. 1995. Distribution of the four founding lineage haplotypes in native Americans suggests a single wave of migration for the New World. *Amer J Phys Anthropol* 98: 411-430.
- Meyer S, Weiss G, y von Haeseler A. 1999. Pattern of Nucleotide Substitution and Rate Heterogeneity in the Hypervariable Regions I and II of Human mtDNA. *Genetics* 152: 1103-1110.

- Monsalve MV, Cárdenas F, Guhl F, Delaney AD, y Devine DV. 1996. Phylogenetic analysis of mtDNA lineages in South American mummies. *Ann Hum Genet* 60: 293-303.
- Moraga M, Aspillaga E, Santoro C, Standen V, Carvallo P, y Rothhammer F. 2001. Análisis de ADN mitocondrial en momias del norte de Chile avala hipótesis de origen amazónico de poblaciones andinas. *Rev Chil Hist Nat* 74: 719-726.
- Moraga M, Mena F, Reyes O, Barrientos G, Goñi R, Franco N, y Borrero L. 2009. Linajes mitocondriales fundadores en restos humanos prehistóricos de Patagonia y Tierra del Fuego. Trabajo presentado en las Novenas Jornadas Nacionales de Antropología Biológica. Puerto Madryn, Argentina.
- Moraga M, Santoro CM, Standen VG, Carvallo P, y Rothhammer F. 2005. Microevolution in prehistoric Andean populations: Chronologic mtDNA variation in the desert valleys of northern Chile. *Amer J Phys Anthropol* 127: 170-181.
- Moraga ML, Rocco P, Miquel JF, Nervi F, Llop E, Chakraborty R, Rothhammer F, y Carvallo P. 2000. Mitochondrial DNA polymorphisms in Chilean aboriginal populations: implications for the peopling of the southern cone of the continent. *Amer J Hum Genet* 113: 19-29.
- Moreno F, Cosse M, Figueiro G, Repetto L, y González S. 2012. Primera amplificación de ADN antiguo de venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*): su relevancia para la biología de la conservación y la arqueología. Trabajo presentado en el II Congreso de Zoología del Uruguay. Montevideo, Uruguay.
- Motti J, Muzzio M, Ramallo V, García A, Alfaro E, Dipierri J, Bailliet G, Coble M, y Bravi C. 2009. No es lo que parece: Sitios diagnósticos revertantes en el ADN mitocondrial. Trabajo presentado en las Novenas Jornadas Nacionales de Antropología Biológica. Puerto Madryn, Argentina.
- Mullis KB, Faloona FA, Scharf S, Saiki RK, Horn G, y Erlich HA. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 51: 263-273.
- Mut P, Figueiro G, Hidalgo PC, y Sans M. 2012. Determinación de sexo a partir de técnicas moleculares en restos humanos prehistóricos: estandarización y primeros resultados. Trabajo presentado en el XII Congreso de la Asociación Latinoamericana de Antropología Biológica. San José, Costa Rica.
- Nass MMK, y Nass S. 1963. Intramitochondrial Fibers with DNA Characteristics. I. Fixation and Electron Staining Reactions. *J Cell Biol* 19: 593-611.
- Nei M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Columbia University Press.
- Nei M, Tajima F, y Tatenos Y. 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *J Mol Evol* 19(2): 153-170.
- Nicholas KB, Nicholas HB, y Deerfield DW. 1997. GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation. *EMBNEWNEWS* 4: 14.
- Noelli FS. 1999-2000. A ocupação humana na região sul do Brasil: arqueologia, debates e perspectivas – 1872/2000. *Revista USP* 44: 218-269.
- Nordborg M. 1998. On the probability of Neanderthal ancestry. *Amer J Hum Genet* 63: 1237-1240.
- Nores R, y Demarchi DA. 2011. Análisis de haplogrupos mitocondriales en restos humanos de sitios arqueológicos de la provincia de Córdoba. *Rev Argent Antropol Biol* 13: 43-54.
- Novellino P, Gil A, Neme G, y Durán V. 2004. El consumo de maíz en el Holoceno tardío del oeste argentino: isótopos estables y caries. *Rev Esp Antropol Amer* 34: 85-110.
- O'Rourke DH. 2006. Blood groups, immunoglobulins, and genetic variation. En: Ubelaker D, ed. *Handbook of North American Indians, vol 3: Environment, Origins, and Population*. Washington, D.C.: Smithsonian Institution. p 762-776.
- O'Rourke DH, Hayes MG, y Carlyle SW. 2000a. Ancient DNA Studies in Physical Anthropology. *Annu Rev Anthropol* 29: 217-242.

- O'Rourke DH, Hayes MG, y Carlyle SW. 2000b. Spatial and Temporal Stability of mtDNA Haplogroup Frequencies in Native North America. *Hum Biol* 72: 15-34.
- O'Rourke DH, Mobarry A, y Suarez BK. 1992. Patterns of genetic variation in Native America. *Hum Biol* 64: 417-434.
- O'Rourke DH, y Raff JA. 2010. The Human Genetic History of the Americas: The Final Frontier. *Curr Biol* 20: R202-R207.
- Ovchinnikov IV, Götherström A, Romanova GP, Kharitonov VM, Lidén K, y Goodwin W. 2000. Molecular analysis of Neanderthal DNA from the northern Caucasus. *Nature* 404: 490-493.
- Pääbo S. 1985. Molecular cloning of Ancient Egyptian mummy DNA. *Nature* 314: 644-645.
- Pääbo S, Gifford JA, y Wilson AC. 1988. Mitochondrial DNA sequences from a 7000-year old brain. *Nucleic Acids Res* 16: 9775-9787.
- Pääbo S, Higuchi RG, y Wilson AC. 1989. Ancient DNA and the Polymerase Chain Reaction: The emerging field of molecular archaeology. *J Biol Chem* 264: 9709-9712.
- Pääbo S, Irwin DM, y Wilson AC. 1990. DNA Damage Promotes Jumping between Templates during Enzymatic Amplification. *J Biol Chem* 265: 4718-4721.
- Pääbo S, Poinar H, Serre D, Jaenicke-Després V, Hebler J, Rohland N, Kuch M, Krause J, Vigilant L, y Hofreiter M. 2004. Genetic Analyses from Ancient DNA. *Annu Rev Genet* 38: 645-679.
- Pagano S, Sans M, Pimenoff V, Cantera AM, Alvarez JC, Lorente JA, Peco JM, Mones P, y Sajantila A. 2005. Assessment of HV1 and HV2 mtDNA variation for forensic purposes in an Uruguayan population sample. *J Forensic Sci* 50: 1239-1242.
- Paradis E, Claude J, y Strimmer K. 2004. APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics* 20: 289-290
- Parr RL, Carlyle SW, y O'Rourke DH. 1996. Ancient DNA analysis of Fremont Amerindians of the Great Salt Lake Wetlands. *Amer J Phys Anthropol* 99: 507-518.
- Parson W, y Dür A. 2007. EMPOP—A forensic mtDNA database. *Forensic Sci Int Genet* 1: 88-92.
- Perego UA, Achilli A, Angerhofer N, Accetturo M, Pala M, Olivieri A, Kashani BH, Ritchie KH, Scozzari R, Kong Q-P et al. 2009. Distinctive Paleo-Indian Migration Routes from Beringia Marked by Two Rare mtDNA Haplogroups. *Curr Biol* 19: 1-8.
- Perego UA, Angerhofer N, Pala M, Olivieri A, Lancioni H, Kashani BH, Carossa V, Ekins JE, Gómez-Carballa A, Huber G et al. 2010. The initial peopling of the Americas: A growing number of founding mitochondrial genomes from Beringia. *Genome Res* 20: 1174-1179.
- Pereira M. 2012. *Uma análise osteobiográfica dos remanescentes ósseos do sítio arqueológico RS-LS-85: cerrito Oscar Erocildo Abreu*. Monografía de grado inédita. Rio Grande: Universidade Federal do Rio Grande.
- Pérez SI, Bernal V, Gonzalez PN, Sardi M, y Politis GG. 2009. Discrepancy between Cranial and DNA Data of Early Americans: Implications for American Peopling. *PLoS ONE* 4: e5746.
- Pérez SI, Bernal V, y Gonzalez PN. 2007. Morphological Differentiation of Aboriginal Human Populations From Tierra del Fuego (Patagonia): Implications for South American Peopling. *Amer J Phys Anthropol* 133: 1067-1079.
- Pérez SI, y Monteiro LR. 2009. Nonrandom Factors in Modern Human Morphological Diversification: A Study of Craniofacial Variation in Southern South American Populations. *Evolution* 63: 978-993.
- Pilli E, Modi A, Serpico C, Achilli A, Lancioni H, Lippi B, Bertoldi F, Gelichi S, Lari M, y Caramelli D. 2013. Monitoring DNA Contamination in Handled vs. Directly Excavated Ancient Human Skeletal Remains. *PLoS ONE* 8: e52524.
- Pintos S, y Bracco R. 1999. Modalidades de enterramiento y huellas de origen antrópico en especímenes óseos humanos. - Tierras bajas del Este del Uruguay (R. O. U). En: López Mazz JM, y Sans M, eds. *Arqueología y Bioantropología de las Tierras Bajas*. Montevideo: Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación. p 81-106.

- Poinar HN, y Stankiewicz BA. 1999. Protein preservation and DNA retrieval from ancient tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 8426-8431.
- Politis GG. 2000. Los cazadores de las llanuras. En: Tarragó MN, ed. *Nueva Historia Argentina Tomo I: Los pueblos originarios y la conquista*. Buenos Aires: Editorial Sudamericana. p 63-103.
- Politis GG. 2003. The Theoretical Landscape and the Methodological Development of Archaeology in Latin America. *Latin Amer Antiq* 14: 115-142.
- Politis GG. 2008. The Pampas and Campos of South America. En: Silvermann H, y Isbell W, eds. *Handbook of South American Archaeology*. New York: Springer. p 235-260.
- Politis GG, Barrientos G, y Scabuzzo C. 2013 en prensa. Los Entierros Humanos. En: Politis G, y Gutierrez MA, eds. *Estado Actual de las Investigaciones en el Sitio Arroyo Seco 2*. Olavarría: Facultad de Ciencias Sociales, UNCPBA.
- Politis GG, Bonomo M, Castiñeira C, y Blasi A. 2011. Archaeology of the Upper Delta of the Paraná River (Argentina): Mound Construction and Anthropogenic Landscapes in the Los Tres Cerros locality. *Quat Int* 245: 74-88.
- Politis GG, Messineo PG, y Kaufmann CA. 2004. El poblamiento temprano de las llanuras pampeanas de Argentina y Uruguay. *Complutum* 15: 207-224.
- Politis GG, y Madrid PE. 2001. Arqueología Pampeana: Estado actual y perspectivas. En: Berberían EE, y Nielsen AE, eds. *Historia Argentina Prehispánica, tomo II*. Córdoba: Editorial Brujas. p 737-814.
- Polzin T, y Daneshmand SV. 2003. On Steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs. *Operations Research Letters* 31: 12-20.
- Postillone MB, Fuchs ML, Avena SA, Cocilovo JA, Carnese FR, y Dejean CB. 2012. Resultados preliminares en ADN antiguo en una muestra precolombina del sitio Arqueológico Agua Caliente de Rachaite, NOA, Argentina. Trabajo presentado en el XII Congreso de la Asociación Latinoamericana de Antropología Biológica. San José de Costa Rica.
- Powell JF, y Neves WA. 1999. Craniofacial morphology of the first Americans: Pattern and process in the peopling of the New World. *Amer J Phys Anthropol* Suppl 29: 153-188.
- Pucciarelli HM. 2004. Migraciones y variación craneofacial humana en América. *Complutum* 15: 225-247.
- R Development Core Team. 2011. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Viena. <http://www.R-project.org/>.
- Rådström P, Knutsson R, Wolffs P, Lövenklev M, y Löfström C. 2004. Pre-PCR processing. *Mol Biotechnol* 26: 133-146.
- Raff J, Tackney J, y O'Rourke DH. 2010. South from Alaska: A Pilot aDNA Study of Genetic History on the Alaska Peninsula and the Eastern Aleutians. *Hum Biol* 82: 677-693.
- Raff JA, Bolnick DA, Tackney J, y O'Rourke DH. 2011. Ancient DNA perspectives on American colonization and population history. *Amer J Phys Anthropol* 146: 503-514.
- Ramachandran S, Deshpande O, Roseman CC, Rosenberg NA, Feldman MW, y Cavalli-Sforza LL. 2005. Support from the relationship of genetic and geographic distance in human populations for a serial founder effect originating in Africa. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 15942-15947.
- Raoult D, Aboudharam G, Crubézy E, Larrouy G, Ludes B, y Drancourt M. 2000. Molecular identification by "suicide PCR" of *Yersinia pestis* as the agent of Medieval Black Death. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 12800-12803.
- Rasmussen M, Li Y, Lindgreen S, Pedersen JS, Albrechtsen A, Moltke I, Metspalu M, Metspalu E, Kivisild T, Gupta R et al. 2010. Ancient human genome sequence of an extinct Palaeo-Eskimo. *Nature* 463: 757-762.
- Reich D, Green RE, Kircher M, Krause J, Patterson N, Durand EY, Viola B, Briggs AW, Stenzel U, Johnson PLF et al. 2010. Genetic history of an archaic hominin group from Denisova Cave in Siberia. *Nature* 468: 1053-1060.

- Ribeiro-dos-Santos AKC, Santos SEB, Machado AL, Guapindaia V, y Zago MA. 1996. Heterogeneity of Mitochondrial DNA Haplotypes in Pre-Columbian Natives of the Amazon Region. *Amer J Phys Anthropol* 101: 29-37.
- Roberts FHH. 1937. The Folsom Problem in American Archaeology. En: MacCurdy GG, ed. *Early Man: as depicted by leading authorities at the International Symposium, the Academy of Natural Sciences, Philadelphia, March 1937*. Philadelphia: J. B. Lippincott. p 153-162.
- Robin ED, y Wong R. 1988. Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells. *Journal of Cellular Physiology* 136: 507-513.
- Rogan PK, y Salvo JJ. 1990. Study of Nucleic Acids Isolated From Ancient Remains. *Ybk Phys Anthropol* 33: 195-214.
- Rogers AR, y Harpending H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol Biol Evol* 9: 552-569.
- Rogers JS. 1972. Measures of genetic similarity and genetic distance. *Studies in Genetics VII*. Austin: University of Texas Publication 7213. p 145-153.
- Rohland N, y Hofreiter M. 2007a. Comparison and optimization of ancient DNA extraction. *BioTechniques* 42: 343-352.
- Rohland N, y Hofreiter M. 2007b. Ancient DNA extraction from bones and teeth. *Nature Protocols* 2: 1756-1762.
- Roseman CC. 2004. Detecting interregionally diversifying natural selection on modern human cranial form by using matched molecular and morphometric data. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(35): 12824-12829.
- Rothhammer F, Moraga M, Rivera M, Santoro CM, Standen VG, García F, y Carvallo P. 2003. Análisis de ADNmt de restos esqueléticos del sitio arqueológico de Tiwanaku y su relación con el origen de sus constructores. *Chungará (Arica)* 35: 269-274.
- Rudbeck L, Gilbert MTP, Willerslev E, Hansen AJ, Lynnerup N, Christensen T, y Dissing J. 2005. mtDNA analysis of human remains from an early Danish Christian cemetery. *Amer J Phys Anthropol* 128: 424-429.
- Sagan L. 1967. On the origin of mitosing cells. *J Theor Biol* 14: 225-274.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, y Erlich HA. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Sala A, Argüelles CF, Marino ME, Bobillo C, Fenocchio A, y Corach D. 2010. Genetic Analysis of Six Communities of Mbyá-Guaraní Inhabiting Northeastern Argentina by Means of Nuclear and Mitochondrial Polymorphic Markers. *Hum Biol* 82: 433-456.
- Salas A, Jaime JC, Alvarez-Iglesias V, y Carracedo A. 2008. Gender bias in the multiethnic genetic composition of central Argentina. *J Hum Genet* 53: 662-674.
- Sambrook J, Fritsch EF, y Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sans M. 1988. *Las poblaciones prehistóricas del Uruguay*. Montevideo: Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación.
- Sans M. 1999. Pautas de adaptación en el Este del Uruguay a partir de los restos esqueléticos humanos. En: López Mazz JM, y Sans M, eds. *Arqueología y Bioantropología de las Tierras Bajas*. Montevideo: Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación. p 107-126.
- Sans M. 2009. "Raza", adscripción étnica y genética en Uruguay. *Runa* 30: 163-174.
- Sans M. 2011. National identity, census data, and genetics in Uruguay. En: Gibbon S, Ventura-Santos R, y Sans M, eds. *Racial identities, genetic ancestries and health in South America*. New York: Palgrave-MacMillan. p 195-212.

- Sans M, Figueiro G, Ackermann E, Barreto I, Egaña A, Bertoni B, Poittevin-Gilmet E, Maytia D, e Hidalgo PC. 2011. Mitochondrial DNA in Basque Descendants from the City of Trinidad, Uruguay: Uruguayan- or Basque-like Population? *Hum Biol* 83: 55-70.
- Sans M, Figueiro G, Sanguinetti C, Echarte-Rafaelli L, Portela C, Taranto L, Pizzarossa C, Oliver R, Manikowski R, Barreto I et al. 2010. The last Charrua Indian (Uruguay): analysis of the remains of Chief Vaimaca Perú. *Nature Precedings*. s/p.
- Sans M, Figueiro G, y Hidalgo PC. 2012. A New Mitochondrial C1 Lineage from the Prehistory of Uruguay: Population Genocide, Ethnocide and Continuity. *Hum Biol* 84: 287-305.
- Sans M, Merriwether DA, Hidalgo PC, Bentancor N, Weimer TA, Franco MH, Alvarez I, Kemp BM, y Salzano FM. 2006. Population structure and admixture in Cerro Largo, Uruguay, based on blood markers and mitochondrial DNA polymorphisms. *Amer J Hum Biol* 18: 513-522.
- Sans M, Mones P, Figueiro G, Barreto I, Bravi C e Hidalgo PC. s/d. The mitochondrial DNA history of an old village founded with Indians from the former Jesuitic Missions in northern Uruguay. Manuscrito en preparación.
- Sans M, y Figueiro G. 2009. Continuidad indígena en la población uruguaya actual: ¿Guaraníes o Charrúas? En: Beovide L, Erchini C, y Figueiro G, eds. *La arqueología como profesión: los primeros 30 años XI Congreso Nacional de Arqueología Uruguay*. Montevideo: Asociación Uruguaya de Arqueología. p 344-359
- Saunier JL, Irwin JA, Just RS, O'Callaghan J, y Parsons T, J. 2008. Mitochondrial control region sequences from a U.S. 'Hispanic' population sample. *Forensic Sci Int Genet* 2: e19-23.
- Schmitz PI. 1973. Cronología de las culturas del sudeste de Rio Grande do Sul. *I Congreso Nacional de Arqueología III Encuentro de Arqueología del Interior: Antecedentes y anales de los congresos*. Fray Bentos: Museo de Historia Natural de Río Negro. p 105-117.
- Schmitz PI, Naue G, y Basile Becker II. 1991. Os aterros dos campos do sul; a tradição Vieira. En: Kern AA, ed. *Arqueologia Pré-Histórica do Rio Grande do Sul*. Porto Alegre: Ed. Mercado Aberto. p 221-250.
- Schmitz RW, Serre D, Bonani G, Feine S, Hillgruber F, Krainitzki H, Pääbo S, y Smith FH. 2002. The Neandertal type-site revisited: interdisciplinary investigations of skeletal remains from the Neander Valley, Germany. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 13342-13347.
- Schurr TG, Ballinger SW, Gan Y-Y, Hodge JA, Merriwether DA, Lawrence DN, Knowler WC, Weisskm, y Wallace DC. 1990. Amerindian Mitochondrial DNAs have Rare Asian Mutations at High Frequencies, Suggesting They Derived from Four Primary Maternal Lineages. *Amer J Hum Genet* 46: 613-623.
- Schurr TG, y Sherry ST. 2004. Mitochondrial DNA and Y Chromosome Diversity and the Peopling of the Americas: Evolutionary and Demographic Evidence. *Amer J Hum Biol* 16: 420-439.
- Serrano A. 1972. *Líneas fundamentales de la arqueología del litoral (Una tentativa de periodización)*. Córdoba, Argentina: Instituto de Antropología, Universidad Nacional de Córdoba.
- Shepard RN. 1962. The analysis of proximities: Multidimensional scaling with an unknown distance function. I. *Psychometrika* 27: 125-140.
- Shepard RN. 1980. Multidimensional scaling, tree-fitting, and clustering. *Science* 210: 390-398.
- Shimada I, Shinoda K, Farnum J, Corruccini R, y Watanabe H. 2004. An integrated analysis of pre-Hispanic mortuary practices: a Middle Sican case study. *Curr Anthropol* 45: 369-402.
- Shinoda K, Adachi N, Guillen S, y Shimada I. 2006. Mitochondrial DNA Analysis of Ancient Peruvian Highlanders. *Amer J Phys Anthropol* 131: 98-107.
- Smith DG, Malhi RS, Eshleman J, Lorenz JG, y Kaestle FA. 1999. Distribution of mtDNA Haplogroup X Among Native North Americans. *Amer J Phys Anthropol* 110: 271-284.
- Smith DG, Malhi RS, Eshleman JA, Kaestle FA, y Kemp BM. 2005. Mitochondrial DNA Haplogroups of Paleoamericans in North America. En: Bonnicksen R, Lepper BT, Stanford D, y Waters MR,

- eds. *Paleoamerican Origins: Beyond Clovis*. College Station, Texas: Texas A&M University Press. p 243-254.
- Soares P, Ermini L, Thomson N, Mormina M, Rito T, Röhl A, Salas A, Oppenheimer S, Macaulay V, y Richards MB. 2009. Correcting for Purifying Selection: An Improved Human Mitochondrial Molecular Clock. *Amer J Hum Genet* 84: 740-759.
- Speller CF, Kemp BM, Wyatt SD, Monroe C, Lipe WD, Arndt UM, y Yang DY. 2010. Ancient mitochondrial DNA analysis reveals complexity of indigenous North American turkey domestication. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 2807-2812.
- Spuhler JN. 1951. Some Genetic Variations in American Indians. En: Laughlin WS, ed. *The Physical Anthropology of the American Indian*. New York: The Viking Fund. p 177-202.
- Stewart TD. 1960. A Physical Anthropologist's View of the Peopling of the New World. *Southwestern Journal of Anthropology* 16: 259-273.
- Stone AC, y Stoneking M. 1993. Ancient DNA From a Pre-Columbian Amerindian Population. *Amer J Phys Anthropol* 92: 463-471.
- Stone AC, y Stoneking M. 1998. mtDNA Analysis of a Prehistoric Oneota Population: Implications for the Peopling of the New World. *Amer J Hum Genet* 62: 1153-1170.
- Stone AC, y Stoneking M. 1999. Analysis of Ancient DNA from a prehistoric Amerindian Cemetery. *Philos Trans R Soc Lond, Ser B: Biol Sci* 354: 153-159.
- Stoneking M. 2000. Hypervariable Sites in the mtDNA Control Region Are Mutational Hotspots. *Amer J Hum Genet* 67: 1029-1032.
- Stoneking M, y Krause J. 2011. Learning about human population history from ancient and modern genomes. *Nat Rev Genet* 12(9):603-614.
- Suárez R, y López Mazz JM. 2003. Archaeology of the Pleistocene-Holocene transition in Uruguay: an overview. *Quat Int* 109-110: 65-76.
- Suárez X. 2009. ¿Monumentalidad en tierra entre los cazadores recolectores del este uruguayo? En: Beovide L, Erchini C, y Figueiro G, eds. *La arqueología como profesión: los primeros 30 años XI Congreso Nacional de Arqueología Uruguayo*. Montevideo: Asociación Uruguaya de Arqueología. p 238-253.
- Sykes NJ, Baker KH, Carden RF, Higham TFG, Hoelzel AR, y Stevens RE. 2011. New evidence for the establishment and management of the European fallow deer (*Dama dama dama*) in Roman Britain. *J Archaeol Sci* 38: 156-165.
- Tamm E, Kivisild T, Reidla M, Metspalu M, Smith DG, Mulligan CJ, Bravi CM, Rickards O, Martinez-Labarga C, Khusnutdinova EK et al. 2007. Beringian Standstill and Spread of Native American Founders. *PLoS ONE* 2: e829.
- Taylor GM, Blau S, Mays S, Monot M, Lee OYC, Minnikin DE, Besra GS, Cole ST, y Rutland P. 2009. Mycobacterium leprae genotype amplified from an archaeological case of lepromatous leprosy in Central Asia. *J Archaeol Sci* 36: 2408-2414.
- Torgerson W. 1952. Multidimensional scaling: I. Theory and method. *Psychometrika* 17: 401-419.
- Torres MM, Bravi CM, Bortolini MC, Duque C, Callegari-Jacques S, Ortiz D, Bedoya G, Groot de Restrepo H, y Ruiz-Linares A. 2006. A revertant of the major founder Native American haplogroup C common in populations from northern South America. *Amer J Hum Biol* 18: 59-65.
- Torrioni A, Schurr TG, Yang C-C, Szathmary EJE, Williams RC, Schanfield MS, Troup GA, Knowler WC, Lawrence DN, Weisskm et al. 1992. Native American Mitochondrial DNA Analysis Indicates That the Amerind and the Nadene Populations Were Founded by Two Independent Migrations. *Genetics* 130: 153-162.
- van Oven M, y Kayser M. 2009. Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Hum Mutat* 30: E386-E394.

- Venables WN, y Ripley BD. 2002. *Modern Applied Statistics with S, Fourth edition*. New York: Springer.
- Vernesi C, Caramelli D, Dupanloup I, Bertorelle G, Lari M, Cappellini E, Moggi-Cecchi J, Chiarelli B, Castri L, Casoli A et al. 2004. The Etruscans: A Population-Genetic Study. *Amer J Hum Genet* 74: 694-704.
- Vogelstein B, y Gillespie D. 1979. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 615-619.
- von Cramon-Taubadel N. 2009. Revisiting the homoiology hypothesis: the impact of phenotypic plasticity on the reconstruction of human population history from craniometric data. *J Hum Evol* 57: 179-190.
- Wakeley J. 1993. Substitution rate variation among sites in hypervariable region 1 of human mitochondrial DNA. *J Mol Evol* 37: 613-623.
- Wallace DC, Garrison K, y Knowler WC. 1985. Dramatic Founder Effects in Amerindian Mitochondrial DNAs. *Amer J Phys Anthropol* 68: 149-155.
- Wallace DC. 2007. Why Do We Still Have a Maternally Inherited Mitochondrial DNA? Insights from Evolutionary Medicine. *Annu Rev Biochem* 76: 781-821.
- Wang S, Lewis CM, Jr., Jakobsson M, Ramachandran S, Ray N, Bedoya G, Rojas W, Parra MV, Molina JA, Gallo C et al. 2007. Genetic Variation and Population Structure in Native Americans. *PLoS Genet* 3: e185.
- Ward RH, Frazier BL, Dew-Jager K, y Pääbo S. 1991. Extensive mitochondrial diversity within a single Amerindian Tribe. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 8720-8724.
- Waters MR, y Stafford TW, Jr. 2007. Redefining the Age of Clovis: Implications for the Peopling of the Americas. *Science* 315: 1122-1126.
- Weisskm, y Woolford E. 1986. Reply to Greenberg et al. *Curr Anthropol* 27(5): 491-492.
- Wilbur AK, Bouwman AS, Stone AC, Roberts CA, Pfister L-A, Buikstra JE, y Brown TA. 2009. Deficiencies and challenges in the study of ancient tuberculosis DNA. *J Archaeol Sci* 36: 1990-1997.
- Wilmsen EN. 1965. An Outline of Early Man Studies in the United States. *Amer Antiq* 31: 172-192.
- Wright S. 1943. Isolation by distance. *Genetics* 28: 114-138.
- Yang DY, Eng B, Waye JS, Dudar JC, y Saunders SR. 1998. Technical note: improved DNA extraction from ancient bones using silica-based spin columns. *Amer J Phys Anthropol* 105: 539-543.
- Yang DY, y Watt K. 2005. Contamination controls when preparing archaeological remains for ancient DNA analysis. *J Archaeol Sci* 32: 331-336.
- Yang NN, Mazières S, Bravi C, Ray N, Wang S, Burley M-W, Bedoya G, Rojas W, Parra MV, Molina JA et al. 2010. Contrasting Patterns of Nuclear and mtDNA Diversity in Native American Populations. *Ann Hum Genet* 74: 525-538.

## ANEXOS

I: Protocolos de extracción empleados en el presente trabajo.

II: Artículos (publicados o en prensa) conteniendo resultados parciales de la presente Tesis.

**ANEXO I:** Protocolos de extracción empleados en el presente trabajo.

A: Protocolo de fenol-cloroformo-álcool isoamílico (2002-2010)

B: Protocolo del kit GeneClean® for Ancient DNA (MP Biomedicals) (2011)

C: Protocolo adaptado de tiocianato de guanidinio y columnas de sílice (2012)

## ANEXO I-A

Protocolo de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico para extracción de ADN antiguo, usado en el laboratorio de ADN antiguo de Montevideo de 2002 a 2010 (basado en Baron et al. 1996)

### 1) DESCALCIFICACIÓN

Echar hasta 0,3 g de polvo de hueso en tubos etiquetados de 15 mL.

Agregar 2 mL 0.5M EDTA (pH 8.0).

Sellar con *parafilm*. Dejar agitando a temperatura ambiente por 72-96 horas.

Centrifugar 1 minuto a 700 rpm.

### 2) DIGESTIÓN CON PROTEINASA K<sup>6</sup>

Agregar 1.925 mL de agua.

Agregar 75 µL de proteinasa K 20 mg/mL.

Agitar en *vortex* e incubar rotando 1,5h a 60°C.

### 3) EXTRACCIÓN DEL ADN

Agregar un volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (p/c/i; ~4 mL) a las muestras.

Mezclar lentamente por 10 minutos.

Centrifugar 3 minutos a 1500 rpm.

Transferir la fase acuosa de cada muestra a una alícuota de p/c/i (Normalmente la fase superior; agregar fenol o quedarse con ambas fases en caso de duda).

Mezclar lentamente por 10 minutos.

Centrifugar 3 minutos a 1500 rpm.

Transferir la fase acuosa de cada muestra a una alícuota de cloroformo.

Mezclar lentamente por 10 minutos.

Centrifugar 3 minutos a 1500 rpm.

---

<sup>6</sup> A diferencia de otras proteasas, la proteinasa K no es inhibida por el EDTA utilizado en la descalcificación.

#### 4) PRECIPITACIÓN DEL ADN

Transferir la fase acuosa de cada muestra a una alícuota de 80  $\mu$ L de acetato de sodio y 3,3 mL de isopropanol<sup>7</sup> (el pH del acetato de sodio ha de ser reducido a 4-4,5 con ácido clorhídrico; pH de la mezcla: 6,5-7,0)

Mezclar por inversión durante 2 minutos.

Agregar 10  $\mu$ L de suspensión de sílice (*glassmilk*).

Rotar lentamente durante 20 minutos a 55 °C.

Centrifugar 3 minutos a 700 rpm. Desechar líquido con cuidado, y volver a centrifugar si el *pellet* de *glassmilk* se desprende.

1) Agregar 4 ml de etanol 80% helado. Agitar en *vortex*.

2) Centrifugar 3 minutos a 700 rpm.

3) Volcar etanol con cuidado de que el *glassmilk* permanezca.

Repetir 1-3 una vez.

Colocar los tubos de lado y dejar secar en incubadora a 60°C por 2 horas, o hasta que se haya evaporado el etanol.

#### 5) ELUCIÓN

Agregar 125  $\mu$ L de Tris-EDTA. Agitar bien en *vortex*.

Centrifugar a 750 rpm. Transferir a un tubo etiquetado sin el *glassmilk*.<sup>8</sup>

---

<sup>7</sup> Hänni et al. (1995) sugieren el uso de isopropanol en la primera precipitación dado que tiene una supuesta mayor selectividad por el ADN. Asimismo, Poinar et al. (1998) indican que el isopropanol es más eficiente a la hora de quitar el soluto de color amarronado atribuido a productos de Maillard, y que inhiben fuertemente la PCR.

<sup>8</sup> La suspensión de sílice es un paso adicional en la eliminación de coextractos potencialmente inhibidores de la reacción de PCR, pero es a su vez un inhibidor.

## ANEXO I-B

Protocolo de empleo del *kit* GeneClean® for Ancient DNA, usado en el laboratorio de ADN antiguo del Departamento de Antropología de la Universidad de Utah, 2011

*Nota:* Las soluciones “Dehyb A”, “Salton Wash 1”, “Salton Wash 2”, “Alcohol Wash”, el *glassmilk* y la solución de elución son proporcionadas con el *kit*. El EDTA, la proteinasa K y el alcohol absoluto para adicionar al Alcohol Wash antes de su empleo son proporcionados por el usuario.

### 1) DESCALCIFICACIÓN Y DIGESTIÓN

Agregar 2 mL EDTA 0.5M (pH 8.0) y 250 µg/mL de proteinasa K por cada 0.3-0.6 g de fragmentos de hueso. Incubar *overnight* a 55°C.

Si la digestión de los fragmentos resultase incompleta, agregar otros 250 µg/mL de proteinasa K y digerir por un día adicional. (opcional)

### 2) CAPTURA DEL ADN

Centrifugar los tubos y transferir 2 mL de sobrenadante a nuevos tubos.

Agregar al sobrenadante 1 mL de Dehyb A solution y 400 µL de *glassmilk*. Incubar a temperatura ambiente por 2-3 horas.

### 3) TRANSFERENCIA DEL ADN A COLUMNAS DE SÍLICE

a) Transferir no más de 700 µL de mezcla EDTA+Dehyb A+*glassmilk* a una columna.

b) Centrifugar 1 min. Descartar eluido y transferir otra alícuota de mezcla.

Repetir a) y b) hasta que se haya pasado toda la suspensión por la columna.

### 4) LAVADO DEL PELLETT *Glassmilk*-ADN

Agregar 500 µL de Salton Wash 1 a la columna. Centrifugar 1 min y descartar el eluido.

Agregar 500 µL de Salton Wash 2 a la columna. Centrifugar 1 min y descartar el eluido.

Agregar 500 µL de Alcohol Wash a la columna. Centrifugar 1 min y descartar el eluido.

Repetir.

Centrifugar las columnas por 2 min para eliminar el remanente de alcohol.

## 5) ELUCIÓN

Agregar 100  $\mu\text{L}$  de solución de elución, agitar para resuspender el *glassmilk* depositado en la columna e incubar 10-20 minutos.

Centrifugar y guardar el eluido.

## ANEXO I-C

Protocolo GeneClean® for Ancient DNA adaptado para kit de purificación de productos de PCR (Qiagen, Invitrogen o similares, abril 2012)

### DÍA 1

#### PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Fraccionar aproximadamente 1 g de material en una bolsa plástica.

Transferir los fragmentos a un tubo estéril de 50 mL y llenar con hipoclorito 5%. Incubar en rotación a temperatura ambiente 20 minutos.

Descartar el hipoclorito y agregar agua ultrapura, enjuagando dos veces. Agregar un tercer volumen de agua y rotar 20 minutos a temperatura ambiente.

Descartar toda el agua posible. Irradiar el tubo abierto con UV-C durante 20 minutos, agitando el contenido a los 10 minutos.

#### 1) DESCALCIFICACIÓN Y DIGESTIÓN

Agregar 2 mL EDTA 0.5M (pH 8.0) y 250 µg/mL (25 µL) de proteinasa K por cada 0.3-0.6 g de fragmentos de hueso. Incubar *overnight* a 55°C.

Si la digestión de los fragmentos resultase incompleta, agregar otros 250 µg/mL de proteinasa K y digerir por un día adicional. (opcional)

### DÍA 2

#### 2) CAPTURA DEL ADN

Centrifugar los tubos y transferir 1 mL de sobrenadante a nuevos tubos.

Agregar al sobrenadante 4 mL de *buffer* de captura (*binding buffer* del kit o *buffer* tiocianato - Rohland y Hofreiter 2007) y 400 µL de *glassmilk*.

Verificar pH de la mezcla agregando una alícuota a una tira de papel pH. Si el pH fuera mayor que 5-6, agregar 8-10 µL de ácido acético glacial.

Incubar a temperatura ambiente por 2-3 horas.

### 3) TRANSFERENCIA DEL ADN A COLUMNAS DE SÍLICE

a) Transferir no más de 700 µL de mezcla EDTA + *Binding buffer* + *glassmilk* a una columna.

b) Centrifugar 1 min. Descartar el eluído y transferir otra alícuota de mezcla.

Repetir a) y b) hasta que se haya pasado toda la suspensión por la columna.

### 4) LAVADO DEL *PELLET* Y LA COLUMNA

Agregar 500 µL de *Wash buffer* del *kit* o etanol 95° a la columna. Centrifugar 1 min y descartar el eluído. Repetir.

Centrifugar las columnas por 2 min para eliminar el remanente de alcohol.

### 5) ELUCIÓN

Agregar 100 µL de TE 1x, agitar para resuspender el *glassmilk* depositado en la columna e incubar 10-20 minutos.

Centrifugar y guardar el eluído. Usar sin diluir en PCR en proporción 1:10.

**ANEXO II:** Artículos (publicados o en prensa) conteniendo resultados parciales de la presente Tesis.

#### **Anexo II-A**

**Figueiro G**, Hidalgo PC, y Sans M. 2011. Control Region Variability of Haplogroup C1d and the Tempo of the Peopling of the Americas. *PLoS ONE* 6(6):e20978.

A partir de la compilación de todas las secuencias de las regiones HVRI y HVRII disponibles hasta la fecha del subhaplogrupo americano C1d y la incorporación de secuencias nuevas de 15 individuos del Uruguay portadores del subhaplogrupo, en este artículo se analizan las relaciones filogenéticas y la distribución geográfica de los linajes derivados, calculándose una edad aproximada del origen del subhaplogrupo basada en dos tasas diferentes de mutación de la región hipervariable. Se discute la cantidad de linajes fundadores y su velocidad de dispersión por el continente, y se enfatiza la importancia de linajes fuertemente locales, uno de los cuales, caracterizada por el motivo mutacional 16051G-16223T-16288C-16298C-16325C-16327T, es analizado en esta Tesis por su presencia en restos prehistóricos y su restricción geográfica al territorio uruguayo.

#### **Anexo II-B**

Sans M, **Figueiro G**, y Hidalgo PC. 2012. A New Mitochondrial C1 Lineage from the Prehistory of Uruguay: Population Genocide, Ethnocide and Continuity. *Hum Biol* 84(3):287-305.

El artículo analiza las características y la variabilidad de un nuevo linaje del subhaplogrupo C1d, determinado en restos prehistóricos del este de Uruguay (aprox. 1600 a.A.P.), en los restos del cacique Vaimaca Perú (m. 1833) y en cinco individuos de la población moderna del Uruguay. La comparación de las secuencias HVRI de las muestras antiguas revela dos mutaciones adicionales: 16140C, polimórfica en las secuencias antiguas pero aparentemente fijada en la población moderna, y 16209C, polimórfica en la población moderna y ausente en la muestra antigua. Por añadidura, la secuenciación del genoma mitocondrial completo de un individuo moderno y la secuenciación parcial de otros dos

arroja como resultado no sólo una serie de mutaciones en la región codificante ausentes en otras muestras del subhaplogrupo, sino una variabilidad notable dentro de la población moderna, apuntando a una gran profundidad temporal del linaje. La secuenciación, replicación y análisis de las muestras antiguas del linaje constituye parte de esta Tesis.

#### **Anexo II-C**

**Figueiro G.** 2013 (en prensa). Continuidad temporal en la composición genética de las poblaciones indígenas del Uruguay. *Colección Avances de Investigación (Tomo Docentes)*. Montevideo: Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación.

El artículo presenta un avance de los análisis comparativos, realizados en esta Tesis, de las frecuencias de haplogrupos A, B, C y D obtenidas en muestras antiguas en comparación de otras poblaciones, antiguas y modernas, del Cono Sur sudamericano. El énfasis del artículo está puesto en la gran semejanza entre las frecuencias de haplogrupos indígenas en la muestra antigua y las del componente indígena de la población actual del Uruguay, así como la semejanza del perfil de frecuencias prehistórico con el hallado en las poblaciones modernas de Cerro Largo y Tacuarembó. Estos elementos se discuten en función de la posibilidad de analizar con más profundidad el aporte indígena en estas poblaciones en busca de linajes característicos de grupos hoy extintos, de los que el linaje C1d hallado en muestras prehistóricas y en la población moderna constituyen un ejemplo.

# Control Region Variability of Haplogroup C1d and the Tempo of the Peopling of the Americas

Gonzalo Figueiro\*, Pedro C. Hidalgo, Mónica Sans

Departamento de Antropología Biológica, Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

## Abstract

**Background:** Among the founding mitochondrial haplogroups involved in the peopling of the Americas, haplogroup C1d has been viewed as problematic because of its phylogeny and because of the estimates of its antiquity, apparently being much younger than other founding haplogroups. Several recent analyses, based on data from the entire mitochondrial genome, have contributed to an advance in the resolution of these problems. The aim of our analysis is to compare the conclusions drawn from the available HVR-I and HVR-II data for haplogroup C1d with the ones based on whole mitochondrial genomes.

**Methodology/Principal Findings:** HVR-I and HVR-II sequences defined as belonging to haplogroup C1d by standard criteria were gathered from the literature as well as from population studies carried out in Uruguay. Sequence phylogeny was reconstructed using median-joining networks, geographic distribution of lineages was analyzed and the age of the most recent common ancestor estimated using the  $\rho$ -statistic and two different mutation rates. The putative ancestral forms of the haplogroup were found to be more widespread than the derived lineages, and the lineages defined by np 194 were found to be widely distributed and of equivalent age.

**Conclusions/Significance:** The analysis of control region sequences is found to still harbor great potential in tracing microevolutionary phenomena, especially those found to have occurred in more recent times. Based on the geographic distributions of the alleles of np 7697 and np 194, both discussed as possible basal mutations of the C1d phylogeny, we suggest that both alleles were part of the variability of the haplogroup at the time of its entrance. Moreover, based on the mutation rates of the different sites stated to be diagnostic, it is possible that the anomalies found when analyzing the haplogroup are due to paralogy.

**Citation:** Figueiro G, Hidalgo PC, Sans M (2011) Control Region Variability of Haplogroup C1d and the Tempo of the Peopling of the Americas. PLoS ONE 6(6): e20978. doi:10.1371/journal.pone.0020978

**Editor:** Carles Lalueza-Fox, Institut de Biologia Evolutiva - Universitat Pompeu Fabra, Spain

**Received:** March 3, 2011; **Accepted:** May 16, 2011; **Published:** June 13, 2011

**Copyright:** © 2011 Figueiro et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by the following institutions: Sample collection and analysis: The Susan G. Komen Breast Cancer Foundation (United States of America), <http://ww5.komen.org/> (project: "Genetic ancestry and breast cancer risk in an admixed Latin American population from Uruguay") and DNA sequence analysis: Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC, Universidad de la República, Uruguay), <http://www.csic.edu.uy/> (project: "Piezas de un rompecabezas: el ADN mitocondrial del cacique Charrúa Vaimaca Perú y su relación con otros individuos y poblaciones" [Pieces of a puzzle: the mitochondrial DNA of Charrúa chief Vaimaca Perú and its relationship to other individuals and populations]). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: [vazfigue@gmail.com](mailto:vazfigue@gmail.com)

## Introduction

The estimation of the antiquity of the human peopling of the Americas has relied heavily on the coalescence ages of the four major founding mitochondrial DNA (mtDNA) haplogroups A, B, C and D [1] (the American variants of which are now named A2, B2, C1, and D1 [2]), with various ages and mechanisms of entrance proposed. Although the most parsimonious mechanism proposed for the initial peopling of the Americas is that of a single migration event [3–6], two- [1,7–9] and four-migration [10] models have also been proposed. Moreover, the antiquity of the migration(s) is still subject of much debate. When using mtDNA data, the accuracy of the estimation is based on the resolution of the data and on the assumption that the Time to the Most Recent Common Ancestor (TMRCA) of the haplogroup in question is as close as possible to the time of arrival of its carriers. Haplogroup C1 in particular has recently been consistently subdivided into four haplogroups originated in Beringia: C1a, C1b, C1c, and C1d. The

last three are considered as founding American haplogroups, while C1a would have experienced an ancient "backflow" into Asia, not being found in America [11].

Tamm et al. [11] calculated the average coalescence time of the founding Native American C1 haplogroups to be  $13,900 \pm 2,700$  years before present (yBP). Based on analyses of complete mitochondrial genomes, haplogroup C1d was initially defined by a mutation at nucleotide position (np) 7697 in the coding region [11]. Later, an A→G substitution at np 16051, located in the hypervariable region I (HVR-I) was included as a criterion [12]. More recently, this substitution was determined to be at the base of the evolutionary history of the haplogroup, with the 7697A mutation as a later event [13]. Subsequent, more comprehensive analyses of complete C1d mitochondrial genomes defined a singular lineage named C1d1, and a paralog named C1d\* lacking the 7697A mutation [14]. Moreover, the possibility of a control region mutation in np 194 at the root of the haplogroup was discussed, but left open.

As the vertebrate mitochondrial genome is highly mutable, uniparental and non-recombinant, the analysis of whole genomes provides high-resolution data for the analysis of population histories. In spite of these obvious advantages, much of current sequence data refers only to the control region (CR), operationally easier to amplify, sequence, and analyze. Hypervariable regions (HVR) I and II, included in the CR, concentrate approximately 40% of the known variability in 4% of the genome [15]. In this paper, we analyze a set of HVR-I and HVR-II haplogroup C1d sequences, seeking to compare the results with the inferences drawn from whole-genome analyses, and discussing the potential of control region sequences in the tracing of local microevolutionary phenomena.

## Materials and Methods

### Published sequences

North, Central and South American HVR-I (N = 170) and HVR-II (N = 101) sequences belonging to haplogroup C1d as defined by the 16051G mutation plus at least three of the four HVR-I mutations found in haplogroup C1 (16223T, 16298C, 16325C, and 16327T) were collected from the literature (Figure 1; Supporting information, Table S1).

### Unpublished sequences

Sequences (N = 15) selected for this study (Table 1; Figure 1, inset), all belonging to haplogroup C and carrying the 16051G



**Figure 1. Geographic location of the populations carrying haplogroup C1d.** The numbers correspond to those found in Table S1. *Inset:* Birthplaces of the individuals whose sequences were obtained in this study (see Table 1 for details). doi:10.1371/journal.pone.0020978.g001

Table 1. Sequences obtained in this study.

Sample ID	Birthplace	64	73	194	195	228	249	263	290	291	310!	315!	350	7697	16051	16092	16129	16140	16172	16188	16192	16209	16221	16223	16259	16266	16271	16287	16288	16298	16311	16325	16327		
rCRS		C	A	C	T	G	A	A	A	A	-	-	A	G	A	T	G	T	T	T	C	C	C	C	C	C	T	C	T	T	T	T	C		
KC004	Montevideo, Uruguay	.	G	T	.	.	d	G	d	d	.	C	.	A	G	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
KC018	Montevideo, Uruguay	.	G	T	.	.	d	G	d	d	.	C	.	.	G	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
KC043	Montevideo, Uruguay	.	G	T	C	.	d	G	d	d	C	C	G	A	G	.	.	.	.	.	.	.	.	T	T	.	C	.	.	.	.	.	.	.	
KC049	Buenos Aires, Argentina	.	G	T	C	.	d	G	d	d	C	C	.	A	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
KC150	Mercedes, Uruguay	.	G	T	C	.	d	G	d	d	C	C	.	A	G	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
KC161	Constitución, Uruguay	T	G	T	.	.	d	G	d	d	.	C	.	A	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
KC163	Tupambaá, Uruguay	T	G	T	C	.	d	G	d	d	C	C	.	A	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
KC208	Rocha, Uruguay	.	G	T	.	.	d	G	d	d	.	C	.	.	G	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
KP040	Canelones, Uruguay	.	G	T	.	.	d	G	d	d	.	C	.	.	A	G	.	.	.	.	.	T	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
KP053	Canelones, Uruguay	.	G	T	.	.	d	G	d	d	.	C	.	.	A	G	.	.	.	.	.	T	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
KP055	Montevideo, Uruguay	.	G	T	.	.	d	G	d	d	.	C	.	.	A	G	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
KP079	Montevideo, Uruguay	.	G	T	.	.	d	G	d	d	.	C	.	.	A	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
KP108	Chuy, Uruguay	.	G	T	.	.	d	G	d	d	.	C	.	.	A	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B11	Trinidad, Uruguay	G	T	.	.	.	d	G	d	d	.	C	.	.	G	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
UryAr010	Artigas, Uruguay	G	T	C	A	d	G	d	d	d	.	C	.	.	G	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

Dots indicate identity with the revised Cambridge Reference Sequence (rCRS). Blank spaces indicate lack of data.  
doi:10.1371/journal.pone.0020978.t001

mutation, come from Uruguayan individuals sampled as part of several different population studies conducted during recent years. In all cases, familial data was gathered, and blood samples were collected after obtaining written informed consent for population studies. Total genomic DNA from blood samples was extracted according to the “salting out” method [16]. HVR-I and HVR-II were amplified by PCR and sequenced in separate, overlapping fragments (15996–16498 for HVR-I and 16347–397 for HVR-II). The PCR products, purified using silica columns, were sent to be sequenced in an external service (Macrogen Inc., Seoul, South Korea).

In addition, the samples were tested for the presence of diagnostic haplogroup C 13262 *HincII*(-) polymorphism and for the 7697 G→A mutation. The latter was detected by digesting a 184 bp PCR segment carrying the polymorphic site (amplified using primers 7630F: 5'-CAAGACGCTACTTCCCC-3' and 7778R: 5'-GGC-GGGCAGGATAGTTC-3' specifically designed for this study) overnight with 1 unit of *MaeI* restriction enzyme. The presence of the mutation (7694 *MaeI*(-)) was verified by agarose gel electrophoresis of the digested PCR products.

### Analysis of the set of sequences

**HVR-I analysis.** The sequences were truncated to 315 bp, spanning from np 16051 to np 16365 (according to the Revised Cambridge Reference Sequence [17]). Using the trimmed set of sequences, a median-joining network [18] was generated using Network 4.5 (<http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm>). The network was further processed using the maximum parsimony (MP) calculation [19] and visualizing the minimum number of trees necessary for explaining the original network. Weights were assigned to the sites in an inverse proportion to the relative mutation rates given by Meyer et al. [20] (i.e., if a given site had the average rate, a weight of 8 was assigned, if the rate was twice the average the assigned weight was 6, and so on).

Although the exclusion of data is never desirable, the high mutability of the control region makes the proper evaluation of multiple hits difficult. Therefore, seeking a compromise between avoiding multiple hits and including as much informative data as possible, a careful selection of sites to be excluded was made, based on previous analyses which provide a site-by-site evaluation of mutational hotspots in the control region. Sites 16093, 16129, 16189, 16311, and 16362 (five sites out of a total 50 variable positions in the database) were purposefully ignored, as they appear mutated on average 88 times (4%) in the data set analyzed by Soares et al. [15] and are classified as fast-evolving in at least one of three previous studies [20–22].

**HVR-I and HVR-II joint analysis.** For those samples with data for both HVR-I and HVR-II, HVR-I was defined as spanning np 16024 to np 16383, and HVR-II from np 57 to np 372 [11]. A median-joining network was generated as described above, and in addition to the HVR-I sites mentioned, indels in polynucleotide stretches and HVR-II sites 146, 150, 152, and 195 (nine sites in a total 62 variable positions) were ignored for the construction of the network. These sites appear mutated 107 times (5%) [15], and have an estimated mutation rate six times above average in a previous study [20].

**Geographic distribution.** The geographic coordinates of the populations listed in Table S1 were registered according to the exact place of the listed locality or, in the case of broader regions (i.e. administrative divisions or even countries), its approximate geographic centre. These coordinates were used for plotting the location of specific variants, as well as for calculating mean linear distances between populations carrying the same variant. Calculation of linear distances based on geographic coordinates

and statistical analysis (Mann-Whitney U test) of the distances were carried out using the *gmt* and *base* packages in the R 2.8.1 environment (<http://www.r-project.org>).

**TMRCAs estimates.** Based on the networks, possible ancestral lineages were identified and the diversification time of these lineages were calculated using the  $\rho$ -statistic [5,23] and two mutation rates. The first rate, of 11.7 mutations/base/million generations [24], is based on genealogical inference, and an average pre-industrial generation span of 25 years [25] was assumed. For this rate, calculations were made using the raw sequences. The other study is based on phylogenetic inference, and estimates an average rate of  $9.883 \times 10^{-2}$  mutations/base/million years [15]. In this case, for calculating  $\rho$ , indels in general and a number of sites, estimated to have mutation rates three times or more above the average of their respective region [20], were left out of the calculation: these sites are 16093, 16126, 16129, 16148, 16163, 16172, 16183, 16187, 16189, 16192, 16223, 16230, 16270, 16278, 16293, 16294, 16309, 16311, 16319, and 16362 (HVR-I) and 64, 73, 93, 146, 150, 151, 152, 153, 182, 185, 186, 189, 195, 198, 199, 200, 207, 236, 247, 263, and 316 (HVR-II). Standard error for the TMRCA estimate was based on the variance estimate of  $\rho$  [26]. All calculations were carried out using the *ape* 2.2–4 [27] and *base* packages in the R 2.8.1 environment.

## Results

### HVR-I analysis

The Median-Joining Network generated using the HVR-I sequences was comprised by a minimum of 5 MP trees, one of which is shown in Figure 2. Some of the sites providing multiple links (16209, 16223, 16298 and 16327) are documented as very mutable [15,20–22], so they could be witnessing recurrent mutation. Nonetheless, they affect secondary branches: the primary branches (i.e., leading to the root) are highly consistent. Moreover, the exclusion of the five hypervariable sites 16093, 16129, 16189, 16311, and 16362 had the effect of drastically reducing the total number of back mutations necessary to explain the relationships between haplotypes, from 40 to 16 (data not shown).

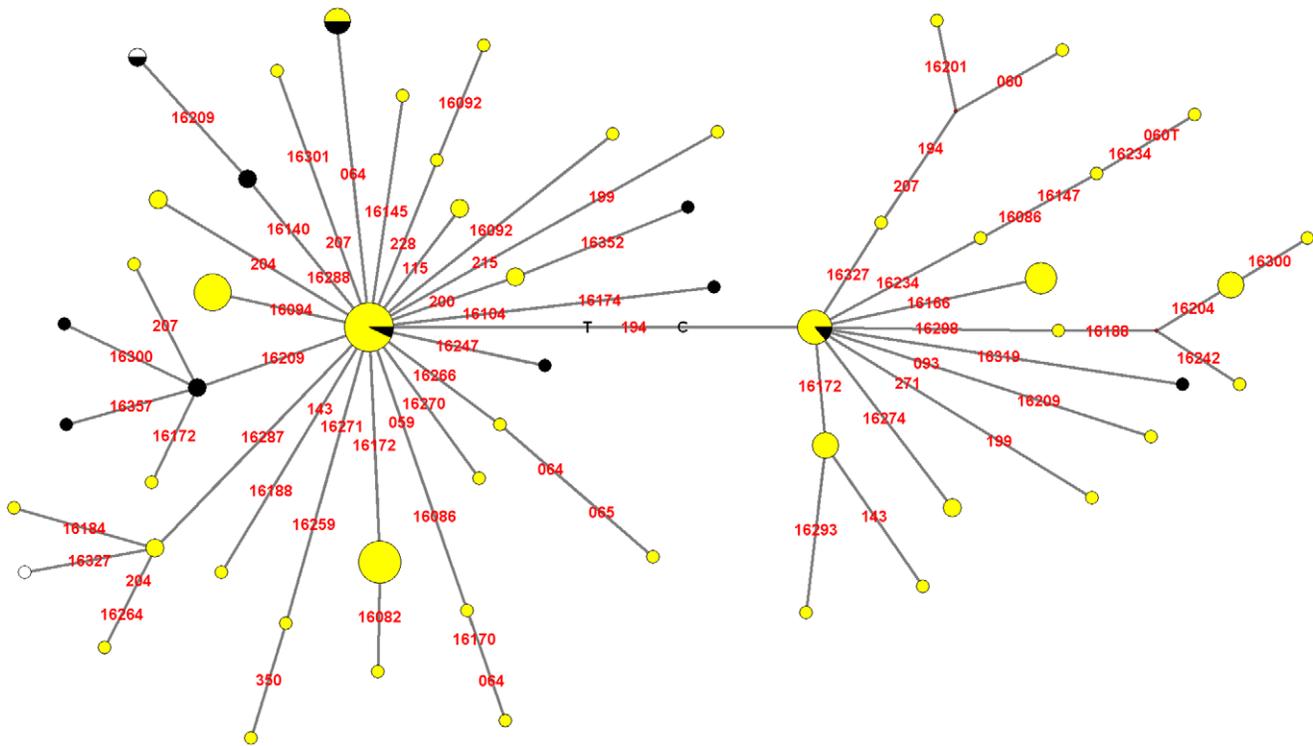
### HVR-I and HVR-II analysis

The Median-Joining Network generated using the HVR-I and HVR-II sequences employing the whole sample was comprised by a minimum of 4 MP trees, one of which is shown in Figure 3. The network shows quite clearly the presence of two ancestral lineages, one characterized by a cytosine in np 194 and the other characterized by a thymine in this position. This mutation has been considered to be a possible basal state for the C1d clade [14]. The exclusion of the five hypervariable HVR-I sites plus the additional four HVR-II sites 146, 150, 152, and 195 reduced the number of minimum back mutations from 46 to 20 (data not shown).

### Geographic distribution

The distribution of the ancestral (16051G-16223T-16298C-16325C-16327T) and derived lineages for the HVR-I analysis is shown in Figure 4A. Both types of lineages can be found throughout the Americas. The ancestral lineage has a large geographic distribution, with a mean interpopulation distance of 4,762 Km and 10% of the distances below 1,000 Km. In contrast to the ancestral lineage, populations sharing a same derived lineage are located on average 2,786 Km away, with 28% of the distances being less than 1,000 Km. The difference between the distance distributions is statistically significant ( $U = 14,027$ ,  $Z = 5.63$ ,  $p < .0001$ ).



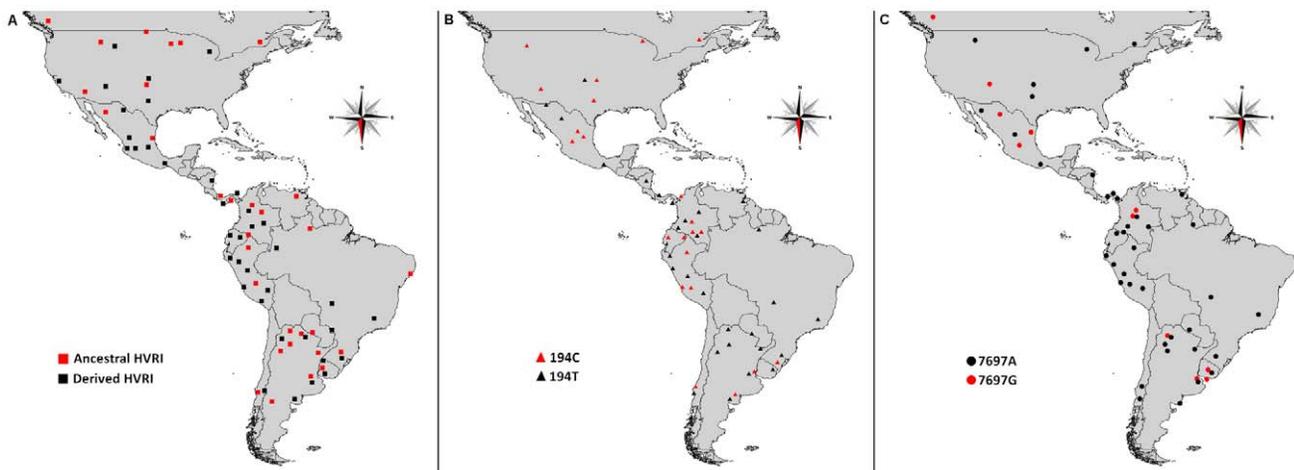


**Figure 3. Median-Joining Network generated from the compiled HVR-I and HVR-II sequences.** Yellow: fraction of the lineage carrying the 7697G→A mutation. Black: fraction of the lineage carrying the ancestral 7697G allele. White: fraction of the lineage lacking data on the state of np 7697.

doi:10.1371/journal.pone.0020978.g003

research will have to be done in order to establish the amount of “maturation” of Beringian haplogroups prior to the peopling [11,28]. Its extent would be heavily dependent on the time of the purported standstill (most probably a minimum of 5,000 years [29]) and on the effective size of the group that entered the continent, which to this day is a subject of debate, ranging from a magnitude of a hundred individuals [30–32] to 5–10,000 individuals [4,28]. We wish to stress that given the *maximum*

registered size of 180 individuals in modern hunter-gatherer groups during the most aggregated phases of their mobility cycle [33,34], effective population sizes beyond the hundreds for the human groups peopling the Americas are far from likely. Nonetheless, if the peopling of the continent occurred as a more or less continuous flow during the period of time in which passage from Asia was possible, the effective size of the resulting metapopulation would be higher.



**Figure 4. Distribution of C1d lineages in the Americas.** A: Distribution of the ancestral and derived lineages as defined using HVR-I only. B: Distribution of lineages carrying the 194C and 194T alleles. C: Distribution of lineages with and without the 7697G→A mutation.

doi:10.1371/journal.pone.0020978.g004

**Table 2.**  $\rho$ -statistics and TMRCA estimates for various root lineages.

Lineage	$\rho^*$	$\sigma^*$	TMRCA*	$\Delta T^*$	$\rho^{**}$	$\sigma^{**}$	TMRCA**	$\Delta T^{**}$
HVRI	1.484	0.513	10063.2	3481.6	0.863	0.425	16904.5	8332.6
HVRI+II	2.257	0.643	7717.7	2198.4	1.406	0.582	22616.6	9365.9
HVRI+II 194C	2.086	0.680	7130.6	2325.9	1.086	0.503	18811.1	8715.9
HVRI+II 194T	1.895	0.663	6436.5	2251.8	1.171	0.545	20289.7	9446.5

\*TMRCA based on a genealogical mutation rate [24]; fast-evolving sites included.

\*\*TMRCA based on a phylogenetic mutation rate [15]; fast-evolving sites not included.

doi:10.1371/journal.pone.0020978.t002

### Time estimates, molecular clock and the tempo of the peopling of the Americas

The age estimates using the two mutation rates (Table 2) vary almost twofold, even when the genealogical mutation rate was applied including hypervariable sites, i.e., on raw sequences. This leads us to two important considerations. A recent study [35] shows that there is a sharp increase in mtDNA mutation rate for human populations younger than 15,000 years, attributed to a series of bottlenecks up to 50,000 yBP. The archaeological estimates of human settlement in South America at 15,000 yBP imply that the entrance into North America must be older, but the question of how much older is subject to debate. Considering point estimates of 12,900–15,000 yBP for the date of the entrance of man to the continent [35], American populations would be located chronologically at the exact point where pedigree rates are useful. Therefore, we must bear in mind that the ages calculated on pedigree-based rates might be underestimations. It must nonetheless be noted that a HVR-I mutation rate calibrated using the sequence of an Early Holocene specimen [36] yields an age estimate equivalent to the pedigree-based rate used in this work with the generation interval raised to 30 years (data not shown). Moreover, regarding recent observations by Cox [37] on the Type I error associated to molecular datings based on the  $\rho$ -statistic, none of the age estimates can be taken into account with certainty, and alternatively, more computer-intensive estimates should be employed.

However, some inferences are possible based on present data. As for the potential of the hypervariable region as a “proxy” for mitochondrial variability as a whole, it is obvious that the standard error of variability estimates based on a mere 4% of the genome will be much higher than the standard error of whole-genome estimates. Also, the phylogenetic resolution of analyses based on whole genomes will certainly be higher: only 49 of the 70 lineages defined in the detailed tree in the analysis made by Perego et al. [14] are defined by HVR-I mutations, HVR-II mutations, or both. Moreover, whole-genome sequences tell a different story than control region sequences, given that the former can carry evidence of selection, which cannot be seen in the latter. Nevertheless, if we compare the ages inferred from the HVR sequences with the ones inferred from whole-genome studies using the same rate [15], there is a difference of 1,400 years, which comfortably falls within the most stringent standard error [14]. Moreover, it must be noted that of the 49 lineages mentioned above, 42 were found to be reproduced in our HVR-I+HVR-II network (Figure 3). The implication of this is that, for studies regarding the peopling of the continent as a whole, control region sequences still have a lot to offer as a relatively fast and easy way to explore the mitochondrial variability within a given region.

As for the tempo of the peopling of the Americas, it has recently been explicitly referred to as “swift” without further detail [11].

Based on the near identity of the age of the MRCA of the South American C1d lineages (Table 3) and the estimate for the American phylogeny (Table 2), we propose that the measure of “swift” could be on the order of magnitude of a millennium, as was initially postulated for the Clovis expansion [38] – although we are not stating that the Clovis expansion and the initial peopling of the Americas were simultaneous events. Furthermore, present genetic variability in America can be explained by coastal migration, which would also have the outcome of a relatively fast rate of advance, as has been shown by simulations [39].

Regarding certain details on the phylogeny of haplogroup C1d, the HVR-I+HVR-II network shown in Figure 3, as well as the related  $\rho$ -statistics (Tables 2 and 3) show that the average evolution of the 194C lineages is only slightly lower than the one in 194T lineages – and higher if hypermutable sites are taken into account – implying that C1d most probably retained a polymorphism in np 194, with 194C as the ancestral state. Frequent back mutations in 194 would result in a substantially lower amount of mutations in 194C lineages. The excess of mutations in 194C lineages is apparent when  $\rho$  is calculated on pooled data using 194T as the root, which pushes the TMRCA back to 22,000 years. Interestingly, the use of 194C as the root lineage on pooled data (not shown) does only increase the  $\rho$  value, which implies that we are observing a major, and rather non-parsimonious, ancestral polymorphism in haplogroup C1d. Further still, although the confidence intervals for the ages of the MRCA of the 194T and 194C variants overlap, the mean difference might be indicating that the 194C and 194T C1d variants might have had independent origins. This inference about the status of the 194T mutation in the phylogeny of C1d is a major difference with respect to conclusions reached by previous work [14]. It could be a difference due to the different methodological approaches employed in the construction of the phylogenies, and to the

**Table 3.**  $\rho$ -statistics and TMRCA estimates for various root lineages, using lineages present only in South America.

Lineage	$\rho^*$	$\sigma^*$	TMRCA*	$\Delta T^*$	$\rho^{**}$	$\Sigma^{**}$	TMRCA**	$\Delta T^{**}$
HVRI	1.528	0.570	10362.0	3864.9	0.850	0.465	16664.6	9102.5
HVRI+II	2.068	0.644	7068.6	2201.7	1.243	0.582	19999.4	9370.3
HVRI+II 194C	1.952	0.869	6674.8	2970.8	0.905	0.593	15675.9	10271.8
HVRI+II 194T	1.825	0.657	6201.0	2230.4	1.190	0.541	20626.2	9370.7

\*TMRCA based on a genealogical mutation rate [24]; fast-evolving sites included.

\*\*TMRCA based on a phylogenetic mutation rate [15]; fast-evolving sites not included.

doi:10.1371/journal.pone.0020978.t003

different processes that can be observed by analyzing a non-coding sequence compared to non-coding and coding sequences together.

### On the status of 7697G and 16051 in the C1d clade

The distribution of the 7697A/G polymorphism, which was not considered in our analyses, is rather irregular in the C1d phylogenies (shown as black portions of the lineages in Figures 2 and 3), and has a pan-American distribution (Figure 4C) as noted in previous work [14]. Taking the three mutations considered at different times as being ancestral to haplogroup C1d (16051G [12,13], 194T [14] and 7697A [11]), it must be noted that 7697A→G is a mutation which leads to an amino acid change, while the other two are non-coding mutations. Of the latter, 194 is a site with an average mutation rate for HVR-II [20] and was observed mutated 12 times (0.55%) in a total 2,196 mtDNA genomes [15], and 16051 has a mutation rate four times above average for HVR-I [20] (that is, double of that of HVR-II [15]) and was observed mutated 21 times in 2,196 sequences (0.96%) [15]. This taken into account, back mutations in np 16051 are the most likely. Thus, we must consider the possibility of C1d being a paraphyletic group, and its variability being under-represented.

### On the potential of localized subhaplogroups

As a final note, although control region sequences may lack the power of whole-genome analyses in tracing discrete migration events in the earlier stages of the peopling of the Americas [40], they still have a great potential in the investigation of more recent microevolutionary phenomena. In this case, we want to point out two geographically restricted lineages which might be of great interest: One is defined by the HVR-II 194T-195C motif, which is found in Argentina (especially the Northwestern part of the country) and Uruguay. The other is defined by the HVR-I 16140C-16288C motif, which has hitherto been found only in

Uruguayan samples. Sequences as these might serve as “private” variants useful for tracing population and individual movements, even in historic times.

### Accession numbers

The Uruguayan sequences reported in this paper have been submitted to GenBank, with accession numbers HQ848717-HQ848739 and JF317298.

### Supporting Information

**Table S1** Ethnic groups and regions in which haplogroup C1d has been found. (DOC)

### Acknowledgments

We thank Bernardo Bertoni, Mónica Cappetta, and Elizabeth Ackermann for the DNA extracts analyzed in this work. We also thank all researchers and students who worked in the project “Genetic ancestry and breast cancer risk in an admixed Latin American population from Uruguay” for collecting part of the Uruguayan samples included in this study. The sample from Artigas was collected and extracted by Pablo Mones and sequenced as a courtesy by Claudio M. Bravi, to both of whom we are deeply indebted. Dennis H. O’Rourke provided insightful comments on an earlier version of the manuscript. We thank Carles Lalueza-Fox and three anonymous reviewers who contributed greatly to improve the content of the manuscript.

### Author Contributions

Conceived and designed the experiments: GF PCH MS. Performed the experiments: GF. Analyzed the data: GF PCH MS. Wrote the paper: GF PCH MS.

### References

- Torroni A, Schurr TG, Cabell MF, Brown MD, Neel JV, et al. (1993) Asian affinities and continental radiation of the four founding Native American mtDNAs. *Am J Hum Genet* 53: 563–590.
- Bandelt HJ, Herrstadt C, Yao YG, Kong QP, Kivisild T, et al. (2003) Identification of Native American founder mtDNAs through the analysis of complete mtDNA sequences: some caveats. *Ann Hum Genet* 67: 512–524.
- Bonato SL, Salzano FM (1997) Diversity and age of the four major mtDNA haplogroups, and their implications for the peopling of the New World. *Am J Hum Genet* 61: 1413–1423.
- Bonato SL, Salzano FM (1997) A single and early migration for the peopling of the Americas supported by mitochondrial DNA sequence data. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 1866–1871.
- Forster P, Harding R, Torroni A, Bandelt HJ (1996) Origin and evolution of Native American mtDNA variation: a reappraisal. *Am J Hum Genet* 59: 935–945.
- Merrifether DA, Rothhammer F, Ferrell RE (1995) Distribution of the four founding lineage haplotypes in native Americans suggests a single wave of migration for the New World. *Am J Phys Anthropol* 98: 411–430.
- Schurr TG, Ballinger SW, Gan Y-Y, Hodge JA, Merrifether DA, et al. (1990) Amerindian mitochondrial DNAs have rare Asian mutations at high frequencies, suggesting they derived from four primary maternal lineages. *Am J Hum Genet* 46: 613–623.
- Torroni A, Schurr TG, Yang C-C, Szathmary EJE, Williams RC, et al. (1992) Native American mitochondrial DNA analysis indicates that the Amerind and the Nadene populations were founded by two independent migrations. *Genetics* 130: 153–162.
- Wallace DC (1995) Mitochondrial DNA variation in human evolution, degenerative disease, and aging. *Am J Hum Genet* 57: 201–223.
- Horai S, Kondo R, Nakagawa-Hattori Y, Hayashi S, Sonoda S, et al. (1993) Peopling of the Americas, founded by four major lineages of mitochondrial DNA. *Mol Biol Evol* 10: 23–47.
- Tamm E, Kivisild T, Reidla M, Metspalu M, Smith DG, et al. (2007) Beringian standstill and spread of native american founders. *PLoS ONE* 2: e829.
- Achilli A, Perego UA, Bravi CM, Coble MD, Kong Q-P, et al. (2008) The phylogeny of the four pan-American mtDNA haplogroups: implications for evolutionary and disease studies. *PLoS ONE* 3: e1764.
- Malhi RS, Cybulski JS, Tito RY, Johnson J, Harry H, et al. (2010) Brief communication: mitochondrial haplotype C4c confirmed as a founding genome in the Americas. *Am J Phys Anthropol* 141: 494–497.
- Perego UA, Angerhofer N, Pala M, Olivieri A, Lancioni H, et al. (2010) The initial peopling of the Americas: A growing number of founding mitochondrial genomes from Beringia. *Genome Res* 20: 1174–1179.
- Soares P, Ermini L, Thomson N, Mormina M, Rito T, et al. (2009) Correcting for purifying selection: an improved human mitochondrial molecular clock. *Am J Hum Genet* 84: 740–759.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 16: 1215.
- Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, et al. (1999) Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet* 23: 147.
- Bandelt HJ, Forster P, Röhl J (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16: 37–48.
- Polzin T, Daneshmand SV (2003) On Steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs. *Operations Research Letters* 31: 12–20.
- Meyer S, Weiss G, von Haeseler A (1999) Pattern of nucleotide substitution and rate heterogeneity in the hypervariable regions I and II of human mtDNA. *Genetics* 152: 1103–1110.
- Hasegawa M, Di Rienzo A, Kocher TD, Wilson AC (1993) Toward a more accurate time scale for the human mitochondrial DNA tree. *J Mol Evol* 37: 347–354.
- Wakeley J (1993) Substitution rate variation among sites in hypervariable region 1 of human mitochondrial DNA. *J Mol Evol* 37: 613–623.
- Morral N, Bertranpetit J, Estivill X, Nunes V, Casals T, et al. (1994) The origin of the major cystic fibrosis mutation ( $\Delta F508$ ) in European populations. *Nat Genet* 7: 169–175.
- Heyer E, Zietkiewicz E, Rochowski A, Yotova V, Puymirat J, et al. (2001) Phylogenetic and familial estimates of mitochondrial substitution rates: study of control region mutations in deep-rooting pedigrees. *Am J Hum Genet* 69: 1113–1126.
- Fenner JN (2005) Cross-cultural estimation of the human generation interval for use in genetics-based population divergence studies. *American Journal of Physical Anthropology* 128: 415–423.

26. Saillard J, Forster P, Lynnerup N, Bandelt H-J, Norby S (2000) mtDNA variation among Greenland Eskimos: the edge of the Beringian expansion. *Am J Hum Genet* 67: 718–726.
27. Paradis E, Claude J, Strimmer K (2004) APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics* 20: 289–290.
28. Kitchen A, Miyamoto MM, Mulligan CJ (2008) A three-stage colonization model for the peopling of the Americas. *PLoS ONE* 3: e1596.
29. Goebel T, Waters MR, O'Rourke DH (2008) The late pleistocene dispersal of modern humans in the Americas. *Science* 319: 1497–1502.
30. Hey J (2005) On the number of New World founders: a population genetic portrait of the peopling of the Americas. *PLoS Biology* 3: e193.
31. Lanata JL, Martino L, Osella A, Garcia-Herbst A (2008) Demographic conditions necessary to colonize new spaces: the case for early human dispersal in the Americas. *World Archaeology* 40: 520–537.
32. Surovell TA (2003) Simulating coastal migration in New World colonization. *Curr Anthropol* 44: 580–591.
33. Binford LR (2001) *Constructing frames of reference: an analytical method for archaeological theory building using ethnographic and environmental data sets*. Berkeley: University of California Press.
34. Hamilton MJ, Milne BT, Walker RS, Burger O, Brown JH (2007) The complex structure of hunter-gatherer social networks. *Proc R Soc B* 274: 2195–2202.
35. Henn BM, Gignoux CR, Feldman MW, Mountain JL (2009) Characterizing the time dependency of human mitochondrial DNA mutation rate estimates. *Mol Biol Evol* 26: 217–230.
36. Kemp B, Malhi R, McDonough J, Bolnick D, Eshleman J, et al. (2007) Genetic analysis of early Holocene skeletal remains from Alaska and its implications for the settlement of the Americas. *Am J Phys Anthropol* 132: 605–621.
37. Cox MP (2008) Accuracy of molecular dating with the rho statistic: deviations from coalescent expectations under a range of demographic models. *Human Biology* 80: 335–357.
38. Martin PS (1973) The discovery of America. *Science* 179: 969–974.
39. Fix AG (2005) Rapid deployment of the five founding Amerind mtDNA haplogroups via coastal and riverine colonization. *Am J Phys Anthropol* 128: 430–436.
40. Perego UA, Achilli A, Angerhofer N, Accetturo M, Pala M, et al. (2009) Distinctive Paleo-Indian migration routes from Beringia marked by two rare mtDNA haplogroups. *Current Biology* 19: 1–8.

---

## ***A New Mitochondrial C1 Lineage from the Prehistory of Uruguay: Population Genocide, Ethnocide, and Continuity***

MONICA SANS,<sup>1</sup>\* GONZALO FIGUEIRO,<sup>1</sup> AND PEDRO C. HIDALGO<sup>1</sup>

*Abstract* Uruguayan population has been considered as of European descent, as its Native populations victims of genocide apparently disappeared in the 19th century. Contradicting this national belief, genetic studies have shown a substantial Native contribution. However, the continuity between prehistoric, historic, and present populations remains unproved. With the aim of adding elements to prove a possible population continuity, we studied a mitochondrial lineage, part of haplogroup C1, analyzing the complete genome of a modern Uruguayan individual and the hypervariable region I (HVRI) in prehistoric, historic, and contemporary individuals. Several individuals carried the mutations that characterize this lineage: two from an archaeological mound located in the east of the country, the Charrúa Indian chief Vaimaca Perú and five individuals from the present population. The lineage was initially characterized by its HVRI sequence, having the four typical C1 mutations and adding 16051G and 16288C; other mutations were also found: 16140C was found in all but the oldest individual, dated 1,610 years BP, while 16209C, 16422C, and 16519C were found only in some individuals. Hypervariable region II showed the typical C1 mutations and 194T. The coding region, analyzed in modern individuals, was characterized by 12378T, while other mutations found were not common to all of them. In summary, we have found and described a new lineage that shows continuity from prehistoric mound builders to the present population, through a representative of the extinct Charrúa Indians. The lineage appeared at least 1,600 years ago and is carried by approximately 0.7% of the modern Uruguayan population. The continuity of the lineage supports alternative perspectives about Uruguayan national identity and the meaning of the genocide, best labeled as ethnocide because of its consequences. It also contributes to the discussion about who the prehistoric mound builders were, and to the origin, at least in the maternal line, of a Charrúa Indian. From a more general perspective, we can conclude that the characteristics, evolution, and expansion of founder haplogroup C in America have not yet been elucidated.

<sup>1</sup>Department of Biological Anthropology, College of Humanities and Educational Sciences, University of the Republic, Magallanes 1577, 11,200 Montevideo, Uruguay.

\*Correspondence to: Monica Sans. E-mail: msans@fhuce.edu.uy.

*Human Biology*, June 2012, v. 84, no. 3, pp. 287–305.

Copyright © 2012 Wayne State University Press, Detroit, Michigan 48201-1309.

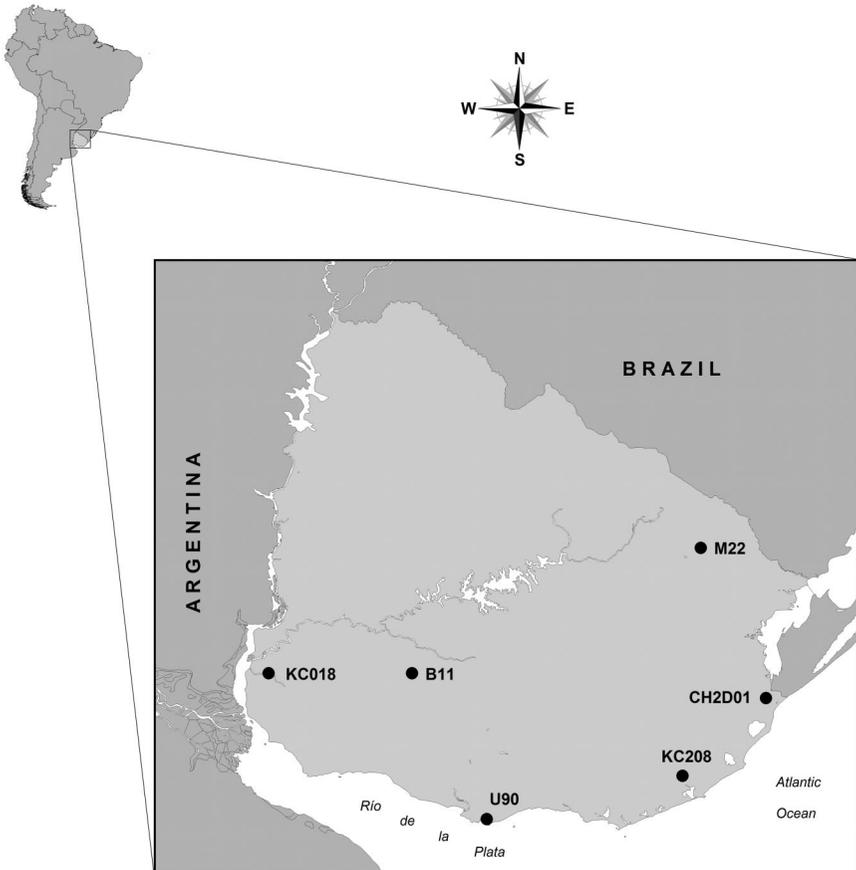
KEY WORDS: PEOPLING OF AMERICA, URUGUAY, MITOCHONDRIAL C1 LINEAGE PREHISTORY, ANCESTRY, NATIONAL IDENTITY.

Uruguay, in southern South America, has an estimated population of 3,251,526 inhabitants (INE 2012). The population has been characterized as of European descent, with a small contribution of African descendants (Ribeiro 1969). Historically, Uruguayan identity has been marked by the genocide of the Native populations found in the territory at the time of the European conquest and up until the 19th century. Of the military campaigns organized against them, the one that occurred in 1831 at Salsipuedes is considered to be the last (Acosta y Lara 1979). The Charrúa Chief Vaimaca Perú, mentioned later in this paper, is one of the few men that survived.

Contradicting national belief, genetic studies have shown that Native contribution is not negligible, being in fact of a greater magnitude than the African contribution (Hidalgo et al. 2005; Sans et al. 1997; among others). But the continuity between past Native populations and to quantify its contribution to present Uruguayan populations remain elusive, and a symbolic break with the past—especially between prehistoric and contemporary populations—still exists.

Uruguayan prehistory extends back to around 10,000 years ago (Suárez and López 2003); however, the oldest human remains are dated in  $1,910 \pm 50$  years BP (URU 0311), belonging to the archaeological site of El Cerro in western Uruguay (Castillo 2004). This date coincides with the beginning of a cultural period, named Upper Component A by Cabrera Pérez (1994), which lasted until approximately 400 years ago, and was characterized by the emergence of regional cultural differences, the widespread use of pottery and bone tools, complex social organization, and human burials in mounds. Mound-building started around 4,000 years ago, and still persisted during the first centuries of the Iberian colonization, but apparently at the beginning the structures were not used for funerary purposes (Bracco 2006; López 2000). Thousands of them are found in broad areas of the country, in the East, North, and West, as well as in neighboring countries. The mounds in the East were intensively investigated in the last two decades, showing evidence of societies with complex socio-cultural processes, including elaborated funerary rites, pottery, and plant domestication, the latter being the object of debate (see, e.g., Bracco 2006; Iriarte et al. 2008). While economy was mainly based on hunting and gathering, mound-builders probably used some domesticated plants (Cabrera Pérez 2000; Pintos 2000; Sans and Femenías 2000).

Little is known about the ethnic identity of the mound-builders. Bracco (1998) mentioned that Guenoa Indians (which belonged to the major ethnic group known as Charrúa or Guenoa, probably with Pampean-Patagonian origin) were their descendants. Years before, Brazilian archaeologists had related mound-builders with Minuanes, the Spanish name for the Guenoa (Basile Becker 1984; Schmitz et al. 1991; among others), while in the 19th century, Mabilde [1897] (1983) had related them with the Kaingang (“Coroados”). The Charrúa/Guenoa macrogroup was one of the three or four that populated Uruguay at the time of the conquest, together with the Chaná, the Guaraní (who arrived to the territory much later), and—although not confirmed—the Arachán (Cabrera



**Figure 1.** Map of Uruguay showing the place of birth of modern C1d individuals carrying 16051G and 16288°C and the location of the CH2D01 archaeological site. Note: The location marked for KC018 is the birthplace of her mother (all other subjects were born in the same place as their parents).

Pérez 1992; Cavellini 1987; Pi Hugarte 1993). There is no mention in any historical chronicle of Kaingang living in the Uruguayan territory.

Most mounds hold human burials, but all the skeletons are more recent than the archaeological level where they are found, suggesting the digging of later, intrusive graves. Archaeologists have interpreted this as the existence of an initial phase in the mound built, not related with its posterior funerary function (Bracco 2000; Cabrera Pérez 2000; Pintos and Bracco 1999). Primary or secondary burials and, more recently, urns with complete or partial bodies (Cabrera Pérez 2000) have been excavated in the mounds. One of the more studied sites is CH2D01, located in San Miguel region (*departamento*—major administrative division—of Rocha) (Figure 1). It is composed by two mounds, A and B, and its

peripheral area was used as a domestic area (Curbelo et al. 1990; Femenías et al. 1992; López 1992).

In 2001, we started to analyze DNA from the skeletons buried in mound CH2D01-A. Initially, we obtained partial hypervariable region I (HVRI) mitochondrial DNA (mtDNA) sequences from four individuals, three belonging to haplogroup C and one to haplogroup B (Bertoni et al. 2004). Intriguingly, two of them were similar, having a T to C transition at nucleotide position (np) 16288 besides the four typical C haplogroup transitions (at positions 16223, 16298, 16325, 16327; all positions according to the Cambridge Reference Sequence, Anderson et al. 1981). Initially, this fact was interpreted as a family relationship between both, a woman buried in the deepest level (individual 20, buried at a depth of 1.20 m) and a man buried at 0.50 m. As in both cases, the sequences only covered part of the HVRI (16192–16355); no further conclusions were drawn. Further mtDNA studies in contemporary Uruguayan population showed the presence of these five mutations in different living individuals. The aim of the present study is to define this possible new lineage and to analyze its continuity from prehistoric to present times, analyzing all modern and ancient individuals presenting haplogroup C and the presence of a transition in position 16288, their variations and estimated times of divergence. The information obtained will be discussed in the context of Uruguayan national identity and the genocide of the Native populations.

## Materials and Methods

### Individuals and Populations

*Ancient Populations.* To obtain data about mtDNA in prehistoric populations, we analyzed individuals buried in the two mounds that compose site CH2D01 in the San Miguel region, Rocha. Mound A had five archaeological levels, level E being the deepest. Level D was dated in  $2,090 \pm 90$  years BP ( $14^\circ\text{C}$  on charcoal, KR139), while the upper, level A, had various radiocarbon dates between 400 and 200 years BP (Bracco 2006; Bracco et al. 2000; López 1992). At least 17 individuals were recovered: two were children whose remains were badly preserved and were not analyzed. From the other 15, we extracted DNA from 11 individuals, including the re-extraction of DNA from the five individuals whose partial HVRI sequences had been published before, two of which, belonging to haplogroup C, carried 16288°C (Bertoni et al. 2004). In mound B which was smaller than mound A, four individuals were found. DNA from the two best-preserved individuals was extracted.

We have also included mtDNA from the Charrúa Chief Vaimaca Perú (born in Uruguay around 1780 and deceased in France in 1833) (Sans et al. 2010). His remains were repatriated in 2002 after being kept in the Musée d'Histoire Naturelle, where he had died in captivity after being taken prisoner during the aforementioned Salsipuedes campaign. As Vaimaca's remains are the only remains of an individual self-identified as a Charrúa, they were considered

of utmost importance, and an agreement was signed between the Uruguayan government and the University of the Republic to study the remains.

**Modern Populations.** We obtained information about published and unpublished sequences from different regions of Uruguay. Unpublished sequences were obtained from a breast-cancer study conducted by us and N. Artagaveytia, B. Bertoni, C. Bonilla, and R. Kittles, coming from different parts of the country ( $n = 417$ ); some of them were published previously (Figueiro et al. 2011), and from Bella Unión ( $n = 70$ ), in the northwestern region of the country, obtained by P. Mones. The published sequences were from 24 individuals from Tacuarembó (Bonilla et al. 2004), 120 from different parts of the country (Pagano et al. 2005), 43 from Cerro Largo (Sans et al. 2006), and 54 from Trinidad (Sans et al. 2011). The total number of sequences analyzed was 728, all of them covering at least HVRI.

Individuals participating in our studies gave written consent to participate in ancestry studies (permissions by College of Humanities and Educational Sciences except in the case of a cancer study where permissions were obtained at the University of Chicago, USA, and the College of Medicine, University of the Republic, Uruguay).

## **DNA Extraction and Analyses**

*Ancient DNA Extraction.* Ancient DNA (aDNA) extractions were performed in the Ancient DNA laboratory of the Department of Biological Anthropology in Montevideo, using a combined phenol/chloroform (Sambrook et al. 1989) and silica suspension (Boom et al. 1990) method, with a previous 72-h EDTA decalcification and an overnight proteinase K digestion. Apart from the extractions from the archaeological specimens, two independent DNA extractions, from two molars, were carried out on the remains of Vaimaca Perú, using the same method.

In five cases, extractions done before at the University of Michigan (Bertoni et al. 2004) were replicated in Montevideo. Finally, repeat extractions from the two individuals relevant for this work were performed in the Ancient DNA Laboratory of the Department of Anthropology, University of Utah, employing the GeneClean for Ancient DNA Kit (MP Biomedicals) (see Table 1 for details about the samples and successful replications).

**Ancient Individuals PCR Amplification and mtDNA Typing.** Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis was performed on all ancient specimens and on Chief Vaimaca in order to determine the haplogroup using the restriction polymorphisms at positions 663, 13259, and 5176, and the 9 bp deletion between 8281–8289 defining, respectively, major haplogroups A, C, D, and B (Wallace and Torroni 1992), using primers described in the literature (Moraga et al. 2000 for haplogroups A, B and D, and Handt et al. 1996 for

**Table 1.** HVR-I Sequences of Samples CH2D01–13, CH2D01–20, and Charrúa Chief Vaimaca Perú<sup>a</sup>

<i>Sample</i>	<i>Extraction</i>	<i>Coverage</i>	<i>Differences with rCRS</i>
CH2D01-13	Bertoni et al. 2004	16192-16355FR	16223-16288-16298-16325-16327
CH2D01-13	Montevideo	16036-16218FR 16262-16371FR	16051-16140 16288-16298-16325-16327
CH2D01-13	Utah	16043-16161FR 16287-16400FR	16051-16140 16288-16298-16325-16327-16353
CH2D01-20	Bertoni et al. 2004	16196-16355 FR	16223-16288-16298-16325-16327
CH2D01-20	Montevideo	16036-16204F 16055-16217FR 16153-16217FR	16051
CH2D01-20	Utah	16183-16400 FR	16223-16288-16298-16325-16327-16366
Vaimaca Perú	1	16035-16082R 16047-16114F 16035-16144R 16209-16336FR	16051-16140Y 16223-16288-16298-16325-16327
Vaimaca Perú	1*	16055-16217FR 16209-16303FR 16239-16356 FR	16140 16223-16288-16298 16288-16298-16325-16327
Vaimaca Perú	2	16035-16144 R 16209-16303FR 16239-16356FR 16347-16410FR	16051-16140Y 16223-16288-16298 16288-16298-16325-16327

a. “Montevideo” denotes the sequences of repeat extracts carried out in the Montevideo laboratory. “Utah” denotes the sequences from the independent extractions carried out by G.F. at the aDNA laboratory of the University of Utah.

F: Only forward strand sequenced; R: Only reverse strand sequenced; FR: Forward and reverse strand sequenced.

(\*) PCR fragments inserted into plasmids.

haplogroup C). The success of the PCR reaction was verified by electrophoresis in 2% agarose gel with ethidium bromide. The PCR products for the determination of haplogroups A, C, and D were digested overnight with 1 unit of the respective restriction enzyme, and the results of the digestion (or, in the case of haplogroup B, the length polymorphism) were visualized by polyacrylamide gel electrophoresis (8% T, 3% C) with silver staining.

HVRI of DNAs belonging to haplogroup C were sequenced using the primers described by Handt et al. (1996) and additional primers 16035L (5'-TATTCTCTGT TCTTTCATGGG-3') and 16096H (3'-GTTGTTGGCGATACATAAAA-3' designed by G. F. for this study. The PCR products, purified using silica columns, were sent for sequencing in external services (Macrogen Inc., Seoul, South Korea, and Institut Pasteur, Montevideo, Uruguay).

The DNA from Vaimaca Perú was analyzed first by using the same approach as in ancient specimens, and second, by adding a new approach, where the PCR products were cloned and several clones sequenced (see Sans et al. 2010 for further details). The HVR-I sequence described in this article was assembled from the mutations found to be consistent throughout the

**Table 2.** Fragments and Primers Used in the Sequencing of the Complete mtDNA Genome<sup>a</sup>

<i>Fragment</i>	<i>Forward Primer</i>	<i>Reverse Primer</i>	<i>Fragment Length</i>
MT1	29F [1]	742 [2]	758
MT2	611	1411	841
MT3	1245	2007	803
MT4	1854	2669	856
MT5	2499	3346	888
MT6	3169	3961	833
MT7	3592 [2]	4489*	937
MT8	4217 [2]	4919 [2]	742
MT9	4462 [2]	5229 [2]	807
MT10	5121 [2]	6031	951
MT11	5855	6642	828
MT12	6469	7261 [*]	833
MT13	7148	8095	988
MT14	7937	8797	901
MT15	8216 [2]	9086 [2]	910
MT16	8921 [2]	9397	517
MT17	9230	10127 [2]	938
MT18	9963 [2]	10912 [3]	977
MT19	10814 [3]	11472	699
MT20	11314	12076	803
MT21	11948	12772	865
MT22	12571	13507	977
MT23	13233 [2]	14268	1076
MT24	14000	14998	1039
MT25	14856	15978	1163
MT26	15811	11 [*]	810
MT27	16210 [4]	397 [3]	794

a. Primers are described in Rieder et al. (1998) (not indicated) with the exception of: [1] Vigilant et al. 1989, [2] Martínez-Cruzado et al. (2005), [3] Sans et al. (2011), [4] Handt et al. (1996), and [\*] present study (4489R: 5'-GATGGTAGAGTAGATGACG-3'; 7261R: 5'-GAATGAGCCTACAGATGAT-3'; 11R: 5'-GCTGAGTGGTTAATAGGGTGATAG-3').

clones, and with the sequences from independent PCR replications carried out by our laboratory.

Position 7697, described by Tamm et al. (2007) as characteristic of subclade C1d, was also tested in individuals having mutations 16288C and 16051G, using primers and conditions described in Figueiro et al. (2011).

**Modern Individuals PCR Amplification and mtDNA Typing.** One contemporary individual, part of our study about Basque-descendants in Trinidad, is identified as sample B11 (Sans et al. 2011), was selected for analysis of the whole mtDNA genome. We employed sets of primers previously used by our laboratory (Handt et al. 1996; Martínez-Cruzado et al. 2005; Sans et al. 2011; Vigilant et al. 1989), which were complemented with primers designed by Rieder et al. (1998), and three others designed by us (see Table 2 for details on the primers). The 27 overlapping fragments were purified using silica columns, and sent for sequencing to the Institut Pasteur, Montevideo, Uruguay.

The entire mtDNA control region was also sequenced in two healthy controls from the above-mentioned breast- cancer project, samples KC018 and KC208, that carried 16051G and 16288°C (Figueiro et al. 2011). Additionally, all new coding-region mutations detected in B11, different than those usually found in individuals from sub-haplogroup C1d (Achilli et al. 2008), were verified in these two individuals.

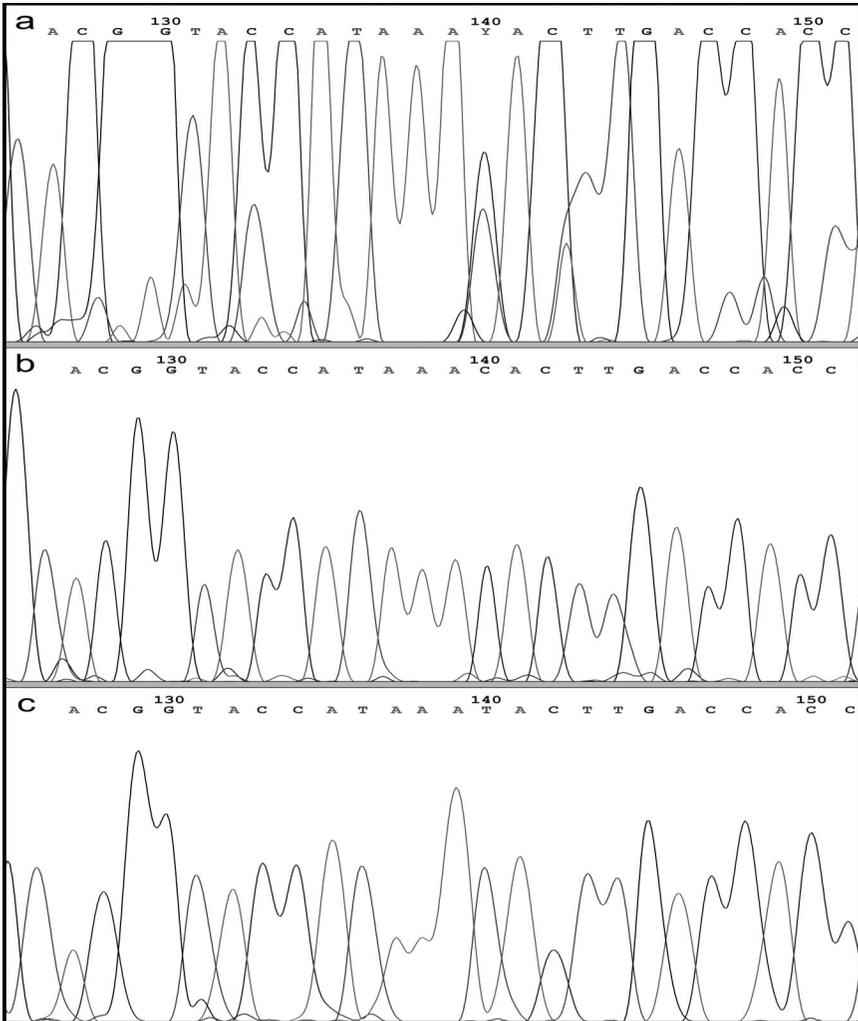
**Sequence and Phylogenetic Analysis.** Sequences were visualized using the Chromas 2.01 software (Technelysium Pty. Ltd.) and aligned using Genedoc software version 2.7.000 (Nicholas and Nicholas 1997). To compare ancient and contemporary mtDNA, we performed analyses using positions 16,024 to 16,385, according to the revised Cambridge Reference Sequence (Andrews et al. 1999). We have generated median joining networks using Network software version 4.6.1.0 ([www.fluxus-engineering.com](http://www.fluxus-engineering.com)) to visualize the mutational steps. We also analyzed incompatible (“anticlique”) characters that tend to produce structures, as triangles, squares, or cubes, in the phylogenetic trees (Bandelt et al. 2000).

We analyzed all the positions that differed from haplogroup C1 in modern Uruguayan individuals. As all sequences with mutation 16288°C also carried 16051G, which defines subclade or subhaplogroup C1d (Achilli et al. 2008; Tamm et al. 2007), we compared our individuals with those published by Perego et al. (2010). For that purpose we performed two different analyses: the first including HVRI alone, and the second with all mutations found in B11. Due to the small sample size, the relatively straightforward relationships between the different sequences were reconstructed by hand.

**Complementary Analysis.** A fragment of a carpal bone of individual 20, buried in the lower level of mound CH2D01-A, was dated with Accelerator Mass Spectrometry (AMS) in the AMS Laboratory of the University of Arizona.

## Results

**MtDNA Hypervariable Regions.** Successful DNA extractions were performed in 13 prehistoric individuals from site CH2D01. The RFLP analysis revealed that five samples carried the 13,259 *HincII*(-) restriction polymorphism characteristic of haplogroup C, three of them being studied previously (Bertoni et al. 2004). Table 1 shows the data obtained in the three laboratories where analyses related to individuals 13 and 20 from mound CH2D01 and to Charrúa Chief Vaimaca Perú were performed (additional information available upon request to the authors). Different analyses confirmed the presence of 16288C, besides the four typical mutations that characterize haplogroup C (16223T, 16298C, 16325C, and 16327T). The three individuals also shared a transition A to G at position 16,051, but because we had only one successful replication of the corresponding fragment in individual 20, the presence of this mutation can be considered doubtful. Individual 13 also has a T to C transition at np 16140. A revision of Vaimaca Perú’s HVRI sequences (initially published without any



**Figure 2.** Three different HVRI sequences that belong to Vaimaca Perú, from positions 16125 to 16151. Position 16,140 is indicated as 140. a) Position 16,140 showing two peaks; b) cloned fragment with a T to C transitional position 16,140; c) cloned fragment carrying the ancestral state (T) in position 16,140. The presence of 16140T in Vaimaca as a result of heteroplasmy or contamination remains unclear.

modification in this position, Sans et al. 2010) showed that two sequences, both performed with primer 16218 reverse, had two peaks, C and T, at position 16140; regrettably, the direct sequences done with primer 16131 forward were unclear. However, five clones done with primer 16055 forward and showing position 16140 were obtained, four without the T to C mutation and one with it (Figure 2). Two alternative explanations can be posed: heteroplasmy or contamination

(either with DNA lacking the mutation as well as with DNA carrying it). These alternatives will be discussed later.

Among the modern individuals (728 individuals of which 81, 11.1%, belonged to haplogroup C), we found 5 with the same six mutations in the HVRI (16051G, 16223T, 16288C, 16298C, 16325C, and 16327T) found in ancient individuals. All these individuals share the transition at position 16140, while the transition at position 16209 is variable (Table 3).

Only the oldest individual (CH2D01-A 20) appears to lack mutation 16140C, while 16209C seems to appear in recent times, being found only in contemporary individuals. Figure 3 shows the mutational steps from the revised Cambridge Reference Sequence (Andrews et al. 1999) to the modern Uruguayans carrying these mutations.

No modern individual carrying 16288C has the 7697A mutation which, together with 16051G, characterizes subhaplogroup C1d according to Tamm et al. (2007) and Achilli et al. (2008). Several attempts of amplifying the segment carrying the 7697 polymorphic site in prehistoric individuals failed. However, based on the results on modern samples, we assume that the historical and archaeological samples carry the ancestral (G) state as well. This should be seen as a hypothesis, and further information will be useful for verifying it.

Modern individuals B11, KC018, and KC208 also share other mutations at the hypervariable regions: 73G, 194T, 249d, 263G, 290–291d, 315.1C, 489C (all typical for haplogroup C), and 16519°C. Individual U90 from Pagano et al. (2005) carries the same HVRII mutations, but position 489 was not analyzed in that paper. B11 and KC018 share a T to C transition at 16422 not shared by KC208, and KC018 adds a C to T transition at 16400 (Figure 4).

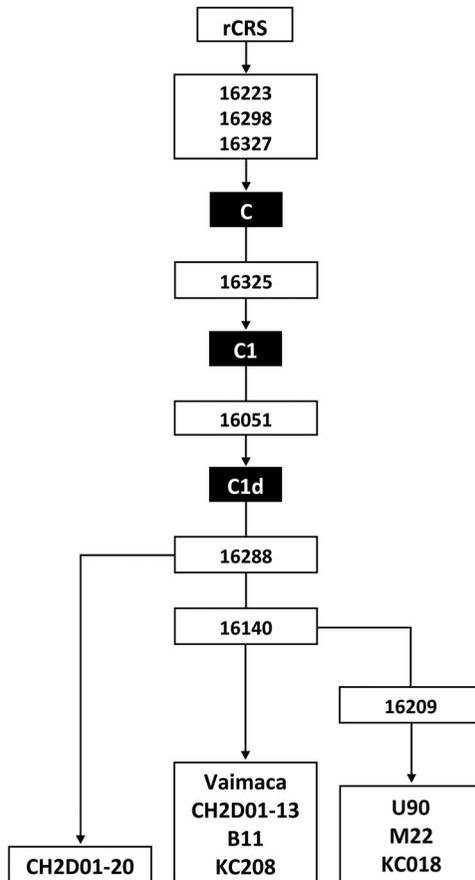
The complete genome of B11 (GenBank accession number JQ701741) presented all the mtDNA mutations mentioned by different authors (Achilli et al. 2008; Malhi et al. 2010; Perego et al. 2010) as leading from haplogroup H to L, and from L to C1, as well as from C1 to C1d. However, the sequence does not present the mutation that characterizes C1d1 (7697A) or any other mutation typical of other branches indicated in the tree published by Perego et al. (2010). Besides, several new mutations were not associated, until present, with haplogroup C. All three individuals (B11, KC018, and KC208) share a C to T transition at position 12378, while only B11 has transitions at 14922 and 15662. KC018 has two transitions (507C and 15313C) not shared by KC208 and B11 (Figure 4). However, one must note that possibly other mutations are present in individuals KC018 and KC208, whose genomes were not fully analyzed. The shared 12378T mutation is a synonymous mutation in the ND5 gene, while the two mutations exclusive for B11 are both non-synonymous mutations found in the cytochrome b gene: 14992C encodes an alanine to valine substitution, and 15662G determines a isoleucine to valine substitution.

When analyzing relationships among the three Uruguayan samples as well as C1d sequences representing the different subtypes of C1d, we found only one square, due to mutation at position 194, pointed out as reversions in the

**Table 3.** MIDNA HVRI (16025–16385) in Prehistoric, Historic, and Modern Individuals Carrying 16288C as well as Typical Haplogroup C Mutations<sup>a</sup>

	<i>Individual/CRS (16000+)</i>	051 A	140T	209T	223C	288T	298T	325T	327C	<i>Reference</i>
Prehistoric	13	G	C	.	T	C	C	C	T	Bertoni et al. 2004 and unpublished
	20	G	.	.	T	C	C	C	T	Bertoni et al. 2004 and unpublished
Historic	Charrúa Chief	G	Y	.	T	C	C	C	T	Sams et al. 2010 and unpublished
Present	M22	G	C	C	T	C	C	C	T	Sams et al. 2006
	B11	G	C	.	T	C	C	C	T	Sams et al. 2011, Figueiro et al. 2011
	U90	G	C	C	T	C	C	C	T	Pagano et al. 2005
	KC018	G	C	C	T	C	C	C	T	Figueiro et al. 2011
	KC208	G	C	.	T	C	C	C	T	Figueiro et al. 2011

a. CRS: Cambridge Reference Sequence (Anderson et al. 1981).



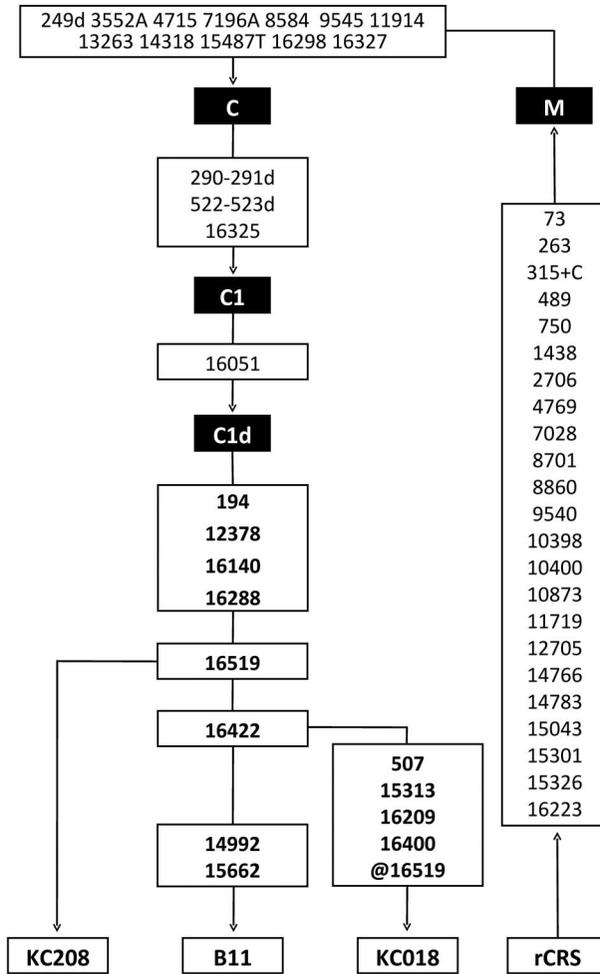
**Figure 3.** Mutational HVRI steps from revised Cambridge Reference sequence (rCRS) (Andrews et al. 1999) to modern C1/C1d Uruguayan lineage. Mutation at position 16,140 is assumed to be present in Vaimaca Perú (see Discussion).

phylogenetic tree proposed by Perego et al. (2010). The mutation at position 16,519 also appears more than once (data not shown).

**Ages.** The oldest individual (a female, sample 20) buried in the deepest level (E) of mound CH2D01-A was dated to  $1,610 \pm 46$  years BP (AMS C14, AA 81800), which currently represents the upper chronological limit of the appearance of the lineage.

## Discussion

This is the first time that a whole mtDNA genome has been sequenced in Uruguay. The data presented show a new lineage corresponding to haplogroup C that originated in prehistoric times and is still found in present-day Uruguay. The



**Figure 4.** Mutations from rCRS (Andrews et al. 1999) present in Uruguayan individuals carrying 16288°C. Mutation at position 16,519 carried by individual KC018 is better explained as a back mutation. Only individual B11 was fully sequenced, consequently, other mutations in the coding region of individuals KC208 and KC018 cannot be ruled out.

lineage is well-characterized by the typical mutations defining sub-haplogroup C1d (according to Perego et al. 2010) and additional mutations 12378T and 16288C. The age of mutation 12378T is not well-determined: it has been detected before, but is uncommon (Howell et al. 2003). Mutations 16051G and 16288C were found in ancient and modern Uruguayan individuals. The latter has been characterized as a “speedy transition” by Bandelt et al. (2002), and occupies the 83rd percentile in variability in the HVRI (Soares et al. 2009); nonetheless, given the restricted geographic distribution and overall variability of the lineage, we assume that it is related to a unique event that occurred at least 1,610 years ago.

The moment of the appearance of 16,051 is definitely older, as it is found in all C1d individuals (Achilli et al. 2008; Perego et al. 2010; Tamm et al. 2007). It is also a speedy transition, figuring in the 91st percentile in variability in the HVRI, but it is assumed to represent a single event in the evolutionary history of C1d. The same can be said about mutation 194T, despite the fact that it was not analyzed in ancient individuals. Moreover, although Perego et al. (2010) place this mutation at the base of the C1d phylogeny and attribute the variability in the site to several back mutations, Figueiro et al. (2011) have discussed this variability as being the product of one mutation that occurred early in the history of the sub-haplogroup. The transition at nucleotide position 194 has been placed as a derived state in the Uruguayan phylogeny (Figure 4) to stress this point.

Other two mutations are related with the analyzed lineage. The first, 16140C, appears in the ancient sample CH2D01–13 but not in the more ancient CH2D01–20, and possibly in Vaimaca Perú whose DNA has 16140C as well as 16140T. Heteroplasmies are relatively frequent in mtDNA: Sigurðardóttir et al. (2000) have estimated an individual rate of 1.1%. However, in the case of Vaimaca Perú, chronology should also be considered. Vaimaca was born around 1780 (Rivet 1930; Sans et al. 2010), that is, 230 years ago, while individual 13 was buried in a level dated in  $1,350 \pm 50$  years ago (Bracco and Ures 1999). It has been argued that the age of skeletons differs from those of archaeological levels (Bracco 2006; Bracco and Ures 1999), as can be seen in the case of individual 20: the skeleton was dated at  $1,610 \pm 46$  years BP, but the archaeological level where she was buried was dated between  $1,835 \pm 120$  (URU002) and  $2,090 \pm 90$  (KR109) (Bracco and Ures 1999). Thus, individual 13, buried around 70 cm above individual 20, is probably younger than 1,350 years, and perhaps, as young as the archeological level immediately above him, dated by conventional C14 between  $340 \pm 115$  (AC1198) and  $400 \pm 50$  years BP (Bet 32192) (Bracco and Ures 1999), that is, not much older than the Charrúa Chief. Then, it is possible to point out that mutation 16140C appears less than 1,350 years ago, and much probably, close to 400 years ago, and was not fixed in the lineage until 200 years ago. However, the more parsimonious explanation is to think about contamination with a DNA not having the mutation. Contamination is a constant possibility when working with aDNA, and in the case of Vaimaca, we have obtained different mutations, some only once, and others (carried by the researcher) on several occasions. If contamination is the fact in the case of Vaimaca Perú, possibly the origin of the mutation at position 16,140 is more ancient than individual 13, since only this lineage is found in present-day populations. This hypothesis seems to be supported by the fact that modern individuals all carry the 16140C mutation. Finally, mutation 16519C appears in two modern individuals (B11 and KC208), while the other individual (KC018) probably underwent a reversion, in parallel with mutations 507C, 15313C, 16209C, and 16400T, which clearly distinguish this individual from the other two. The reversion of 16519C is a reasonable assumption given that this position

has the fastest mutation rate in mtDNA with an unclear evolutionary history (Soares et al. 2009).

Although lacking enough data to carry out a solid calculation of the age of the common ancestor of the lineage, clearly its antiquity is at least 1,564 years, that is, the lower limit of the radiocarbon dating of CH2D01–20 (1,610 + 46). This age is probably an underestimation, considering both the observed diversity of the lineage (comparing the mutations found in KC018 with the ones found in B11 and KC208) and the calculated ages for sub-haplogroup C1d, in the order of 18,000 to 22,000 years (Figueiro et al. 2011; Perego et al. 2010).

Five contemporary individuals living in different parts of Uruguay carry the lineage described in this paper: one in Cerro Largo in the northeast, one in Rocha in the east, one in Trinidad and one in Soriano, both in the west, and one in Montevideo in the south (Figueiro et al. 2011; Pagano et al. 2005; Sans et al. 2006, 2011). Considering that the total sample analyzed was composed by 728 individuals, and that the novel C1d lineage comprised 0.7%, the rough equivalent in the present-day Uruguayan population would amount to 5,500 individuals. This quantity can be small for countries where the Native populations are well-identified, but not in Uruguay, where the widespread perception is that the population was physically—as well as culturally—transplanted from Europe.

Since the decade of 1980, and especially after the end of the dictatorship (1973–1985), alternative perspectives have appeared on this view of the making of the Uruguayan population. While Demasi (1995) alluded to the recreation of the foundational retelling of the genocides, Verdesio (1992) emphasized the deconstruction of the official history through the reanalysis of the colonial period and the attention to minorities. Besides, Aguiar (1992) stressed the fallacy of visualizing an empty country before the European colonization. In this context, the appearance of Native lineage with ancient roots, together with the previous determination that almost one-third of the Uruguayan population has Amerindian mtDNA haplogroups (Sans 2009, 2011), support the view that the genocide could not eliminate Native population, but did so with all or a great part of their culture, being consequently more correctly labeled as an ethnocide because of its consequences.

One last point to mention is that elimination efforts were not directed against all Native groups, but were primarily focused on the Charrúa Indians, which at the time was a term employed for the remnants of all hunter-gatherer groups of the recently independent territory of Uruguay. Guaraní Indians continued entering the territory until 1838, when during the *Campaña del Norte* (Northern campaign), General José F. Rivera brought approximately 8,000 Guaraní from the former Jesuit Missions (1609–1773). However, Guaraní presence in Uruguay is relatively modern (Farías 2005), and clearly not related to the initial phase of burials in mounds, and consequently not related to the lineage described in this paper. However, despite that lack of knowledge, we have found and described a new lineage that shows continuity from mound-builders to the present population, through a representative of the extinct Charrúa Indians.

Some aspects are still somewhat unclear, as the concrete evolutionary relationship of the lineage with other South American lineages, and ultimately, its link to the peopling of America. Almost 30 years after the early study by Wallace et al. (1985), titled “Dramatic Founder Effects in Amerindian Mitochondrial DNAs,” which proposed that America had been peopled by a small quantity of female lineages, the number and especially the variability of founder haplogroups have been constantly growing. At present, the information related to the entry to America, as well as the posterior evolution of the American populations, is much more complex. A recent article (Bodner et al. 2012) underlines the lack of data about the migration into the Americas and the routes taken, and the necessity for uncovering all of the most basal variation in the Native American mtDNA haplogroups to clarify ancient migrations, as has been done here. In our case, the analysis of a peculiar lineage inside a limited region and chronology adds elements to the general perspective of the peopling, as similar processes are probably repeated in the whole continent. It will be important, in this sense, to see how far back we can trace the mutations that characterize modern lineages into prehistoric times; this particular matter is more likely to be approached with precision using ancient DNA, and when possible, complete genomes. Both approaches were performed in this paper, while both together (complete genomes using ancient DNA) could not be done.

*Acknowledgments* This work was made possible thanks to the collaboration of several individuals and organizations from Uruguay that participated in the projects related to this article. We also want to acknowledge N. Artagaveytia, B. Bertoni, C. Bonilla, R. Kittles, I. Barreto, A. Egaña, E. Ackermann (breast-cancer research), and P. Mones (population studies in Artigas). We thank Dennis O’Rourke and Justin Tackney (Department of Anthropology, University of Utah) for providing their lab space, their time, and invaluable support in the replication of the results from CH2D01-A. We are very grateful to the two reviewers and the editor for their comments that helped to improve the manuscript. Substantial parts of this research were funded by Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC), Universidad de la República, Uruguay, and the Susan Komen Foundation for Cancer Research (USA).

*Received 14 March 2012; revision accepted for publication 22 May 2012.*

## Literature Cited

- Achilli, A., U. A. Perego, C. M. Bravi et al. 2008. The phylogeny of the four pan-American MtDNA haplogroups: Implications for evolutionary and disease studies. *PLoS One* 3:e1764.
- Acosta y Lara, E. 1979. *Últimas campañas contra los Charrúas*. Montevideo: Monteverde & Cía.
- Aguiar, C. 1992. Cultura e identidad. Una aproximación sociológica. In *Identidad Uruguaya: ¿Mito, Crisis o Afirmación?* H. Achugar and G. Caetano, eds. Montevideo: Trilce, 167–171.
- Anderson, S., A. T. Bankier, B. G. Barrell et al. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290:457–465.
- Andrews, R. M., I. Kubacka, P. F. Chinnery et al. 1999. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat. Genet.* 23:147.

- Bandelt, H. J., V. Macaulay, and M. Richards. 2000. Median networks: Speedy construction and greedy reduction, one simulation, and two case studies from human mtDNA. *Mol. Phylogenet. Evol.* 16:8–28.
- Bandelt, H. J., L. Quintana-Murci, A. Salas et al. 2002. The fingerprint of phantom mutations in mitochondrial DNA data. *Am. J. Hum. Genet.* 71:1150–1160.
- Basile Becker, I. I. 1984. *El Indio y la colonización: Charrúas y Minuanes*. Pesquisas, Antropología 37. Sao Leopoldo: Instituto Anchieta de Pesquisas.
- Bertoni, B., G. Figueiro, G. Cabana et al. 2004. Primeras secuencias de ADN mitocondrial de indígenas prehistóricos del Uruguay. In *X Congreso Uruguayo de Arqueología: La Arqueología Uruguaya ante los Desafíos del Nuevo Siglo*. L. Beovide, I. Barreto, and C. Curbelo, eds. Montevideo: Asociación Uruguaya de Arqueología.
- Bodner, M., U. A. Perego, G. Huber et al. 2012. Rapid coastal spread of First Americans: Novel insights from South America's Southern Cone mitochondrial genomes. *Genome Res.* 22:811–820.
- Bonilla, C., B. Bertoni, S. González et al. 2004. Substantial Native American ancestry in the population of Tacuarembó, Uruguay, detected using mitochondrial DNA polymorphisms. *Am. J. Hum. Biol.* 16:289–297.
- Boom, R. C., J. A. Sol, M. M. M. Salimans et al. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 28:495–503.
- Bracco, D. 1998. *Guenoas*. Montevideo: Imprenta Nacional.
- Bracco, R. 2006. Montículos de la cuenca de la Laguna Merín: Tiempo, espacio y sociedad. *Latin Am. Antiq.* 17:511–540.
- Bracco, R., L. Cabrera, and J. M. López. 2000. La prehistoria de las tierras bajas de la cuenca de la Laguna Merín. In *Arqueología de las Tierras Bajas*, A. Durán and R. Bracco, eds. Montevideo: Ministerio de Educación y Cultura, 13–38.
- Bracco, R., and C. Ures. 1999. Ritmos y dinámicas constructivas de las estructuras monticulares. Sector sur de la cuenca de la Laguna Merín- Uruguay. In *Arqueología y Bioantropología de las Tierras Bajas*, J. M. López and M. Sans, eds. Montevideo: Facultad de Humanidades/ UdelaR, 3–34.
- Cabrera Pérez, L. 1992. El Indígena y la conquista en la Cuenca de la Laguna Merín. In *Ediciones del Quinto Centenario*. Montevideo, Montevideo: Universidad de la República, 1:97–122.
- Cabrera Pérez, L. 1994. Subsistema Tecnológico y Estrategias Adaptativas en el Río Uruguay Medio. In *Arqueología de Cazadores-Recolectores: Límites, Casos y Aperturas*. J. L. Lanata and L. A. Borrero, eds. Arqueología Contemporánea, 5:41–50 (Edición especial), Buenos Aires.
- Cabrera Pérez, L. 2000. Los niveles de Desarrollo Socio-Cultural Alcanzado por los Grupos Constructores del Este Uruguayo. In *Arqueología de las Tierras Bajas*, A. Durán and R. Bracco, eds. Montevideo: Ministerio de Educación y Cultura, 169–182.
- Castillo, A. 2004. Excavaciones y museo: Profundizando en el conocimiento de los grupos “ceramistas” del litoral (Río Negro, Uruguay). In *X Congreso Uruguayo de Arqueología: La Arqueología Uruguaya ante los Desafíos del Nuevo Siglo*, L. Beovide, I. Barreto, and C. Curbelo, eds. Montevideo: Asociación Uruguaya de Arqueología.
- Cavellini, S. 1987. Síntesis etnohistórica. In *Misión de Rescate Arqueológico Salto Grande*, Montevideo: Ministerio de Educación y Cultura, 1:81–140.
- Curbelo, C., L. Cabrera Pérez, N. Fusco et al. 1990. Sitio CH2D01, Area de San Miguel, Departamento de Rocha, R. O. del Uruguay. Estructura de sitio y zonas de actividad. *Revista do CEPA* (Santa Cruz do Sul, Brazil), 17:333–344.
- Demasi, C. 1995. La dictadura militar: Un tema pendiente. In *Uruguay, Cuentas Pendientes*, A. Rico, ed. Montevideo: Editorial Trilce, 28–40.
- Fariás, M. E. 2005. *El guaraní arqueológico meridional: Entre el axioma y la heterodoxia*. Ph.D. Diss., International Program in Archaeology, Pontificia Universidad Católica, Porto Alegre, Brazil.

- Femenías, J., N. Fusco, and L. Cabrera Pérez. 1992. Excavaciones Arqueológicas en la Sierra de San Miguel. In *Anales de las Primeras Jornadas de Ciencias Antropológicas en el Uruguay*. Montevideo: Dirección Nacional de Impresiones y Publicaciones Oficiales, 95–100.
- Figueiro, G., P. C. Hidalgo, and M. Sans. 2011. Control Region Variability of Haplogroup C1d and the Tempo of the Peopling of the Americas. *PLoS ONE* 6:e20978.
- Handt, O., M. Krings, R. H. Ward et al. 1996. The retrieval of ancient human DNA sequences. *Am. J. Hum. Genet.* 59:368–376.
- Hidalgo, P. C., M. Bengochea, D. Abilleira et al. 2005. Genetic admixture estimate in the Uruguayan population based on the loci LDLR, GYPA, HBG, GC and D7S8. *Int. J. Hum. Genet.* 5:217–222.
- Howell, N., C. B. Smejkal, D. A. Mackey et al. 2003. The pedigree rate of sequence divergence in the human mitochondrial genome: There is a difference between phylogenetic and pedigree rates. *Am. J. Hum. Genet.* 72:659–670.
- INE (Instituto Nacional de Estadística, Uruguay). 2012. *Censos 2011: Contame que te cuento*. <http://www.ine.gub.uy/censos2011/index.html>.
- Iriarte, J., I. Holst, O. Marozzi et al. 2008. Comentario sobre “Montículos de la Cuenca de la Laguna Merín: Tiempo, Espacio, y Sociedad.” *Latin Am. Antiq.* 19:317–324.
- López, J. 1992. Génesis y desarrollo de los cerritos de la zona de San Miguel-Rocha. In *Ediciones Quinto Centenario*, Montevideo: Universidad de la República, 75–96.
- López, J. 2000. Trabajos en Tierra y Complejidad Cultural en las Tierras Bajas del Rincón de los Indios. In *Arqueología de las Tierras Bajas*, A. Durán and R. Bracco, eds. Montevideo: Ministerio de Educación y Cultura, 271–285.
- Mabilde, A. 1983. *Apointamentos dos Índios Salvagem da Nação Coroados dos Matos da Provincia do Rio Grande do Sul 1883–1866*. São Paulo: IBRASA.
- Malhi, R. S., J. S. Cybulski, R. Y. Tito et al. 2010. Brief communication: Mitochondrial haplotype C4c confirmed as a founding genome in the Americas. *Am. J. Phys. Anthropol.* 141:494–497.
- Martínez-Cruzado, J. C., G. Toro-Labrador, J. Viera-Vera et al. 2005. Reconstructing the population history of Puerto Rico by means of mtDNA phylogeographic analysis. *Am. J. Phys. Anthropol.* 128:131–155.
- Nicholas, K. B., and H. B. Nicholas 1997. *GeneDoc: Analysis and visualization of genetic variation*, [www.psc.edu/biomed/genedoc](http://www.psc.edu/biomed/genedoc).
- Pagano, S., M. Sans, V. Pimenoff et al. 2005. Assessment of HV1 and HV2 mtDNA variation for forensic purposes in a Uruguayan population sample. *J. Forensic Sci.* 50:1239–1242.
- Perego, U. A., N. Angerhofer, M. Pala et al. 2010. The initial peopling of the Americas: A growing number of founding mitochondrial genomes from Beringia. *Genome Res.* 20:1174–1179.
- Pi Hugarte, R. 1993. *Los Indios de Uruguay*. Madrid: Mapfre.
- Pintos, S. 2000. Economía húmeda del Este de Uruguay: El manejo de recursos faunísticos. In *Arqueología de las Tierras Bajas*, A. Durán and R. Bracco, eds. Montevideo: Ministerio de Educación y Cultura, 249–270.
- Pintos, S., and R. Bracco. 1999. Modalidades de enterramiento y huellas de origen antrópico en especímenes óseos humanos: Tierras Bajas del Este de Uruguay. In *Arqueología y Bioantropología de las Tierras Bajas*, J. M. López and M. Sans, eds. Montevideo: Facultad de Humanidades/UdelAR, 81–106.
- Ribeiro, D. 1969. *Las Américas y la Civilización*. Buenos Aires: Centro Editor de América Latina.
- Rieder, M. J., S. L. Taylor, V. O. Tobe et al. 1998. Automating the identification of DNA variations using quality-based fluorescence re-sequencing: Analysis of the human mitochondrial genome. *Nucleic Acids Res.* 26:967–973.
- Rivet, P. 1930. Les derniers Charruas. *Rev. Amigos de la Arqueología (Uruguay)*, 4:5–117.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sans, M. 2009. “Raza,” adscripción étnica y genética en Uruguay. *Runa*. 30:163–174.
- Sans, M., and J. Femenías. 2000. *Subsistencia, movilidad y organización social en el sitio monticular CH2D01-A (Rocha, Uruguay): Inferencias a partir de las pautas de enterramiento y los restos*

- esqueletarios*. In *Arqueología de las Tierras Bajas*, A. Durán and R. Bracco, eds. Montevideo: Ministerio de Educación y Cultura, 385–396.
- Sans, M., F. M. Salzano, and R. Chakraborty. 1997. Historical genetics in Uruguay: Estimates of biological origins and their problems. *Hum. Biol.* 69:161–170.
- Sans, M., D. A. Merriwether, P. C. Hidalgo et al. 2006. Population structure and admixture in Cerro Largo, Uruguay, based on blood markers and mitochondrial DNA polymorphisms. *Am. J. Hum. Biol.* 18:513–524.
- Sans, M., G. Figueiro, C. Sanguinetti et al. 2010. The last Charrua Indian (Uruguay): Analysis of the remains of Chief Vaimaca Perú. *Nature Preceedings*, <http://hdl.handle.net/10101/npre.2010.4415.1>.
- Sans, M., G. Figueiro, E. Ackermann et al. 2011. Mitochondrial DNA in Basque descendants from the city of Trinidad, Uruguay: Uruguayan- or Basque-like population? *Hum. Biol.* 83:55–70.
- Schmitz, P., G. Naue, and I. Basile Becker. 1991. Os aterros dos campos do Sul: A tradição Vieira. In *Pre-historia do Rio Grande do Sul*, A. Kern, ed. São Leopoldo: Instituto Anchietao de Pesquisas, 68–107.
- Sigurðardóttir, S., A. Helgason, J. R. Gulcher et al. 2000. The mutation rate in the human mtDNA control region. *Am. J. Hum. Genet.* 66:1599–1609.
- Soares, P., L. Ermin, N. Thomson et al. 2009. Correcting for purifying selection: An improved human mitochondrial molecular clock. *Am. J. Hum. Genet.* 84:740–759.
- Suárez, R., and J. M. López. 2003. Archaeology of the Pleistocene-Holocene transition in Uruguay: An overview. *Quat. Int.* 109-. 110:65–76.
- Tamm, E., T. Kivisild, M. Reidla et al. 2007. Beringian standstill and spread of Native American founders. *PLoS One* 2:e829.
- Verdesio, G. 1992. La República Arabe Unida, el maestro soviético y la identidad nacional. In *Identidad Uruguaya: ¿Mito, Crisis o Afirmación?*, H. Achugar y and G. Caetano, eds. Montevideo: Trilce, 97–107.
- Vigilant, L., R. Pennington, H. Harpending et al. 1989. Mitochondrial DNA sequences in single hairs from a southern African population. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9350–9354.
- Wallace, D. C., and A. Torroni. 1992. American Indian prehistory as written in the mitochondrial DNA: A review. *Hum. Biol.* 64:403–416.
- Wallace, D. C., K. Garrison, and W. C. Knowler. 1984. Dramatic founder effects in Amerindian mitochondrial DNAs. *Am. J. Phys. Anthropol.* 68:149–155.

# CONTINUIDAD TEMPORAL EN LA COMPOSICIÓN GENÉTICA DE LAS POBLACIONES INDÍGENAS DEL URUGUAY

---

GONZALO FIGUEIRO

## INTRODUCCIÓN

El análisis genético poblacional ha sido una herramienta poderosa para generar evidencia independiente sobre la historia de las poblaciones humanas. Uno de los marcadores genéticos más empleados en estos estudios desde hace más de dos décadas es el ADN mitocondrial (ADNmt). El ADNmt humano es una molécula circular de 16.568 pares de bases,<sup>1</sup> de transmisión materna<sup>2</sup> y no recombinante, por lo que las variantes detectadas pueden rastrearse a través de ancestros maternos. El ADNmt tiene además un rápido ritmo evolutivo, lo cual lo ha hecho un marcador muy utilizado en el estudio de una especie relativamente reciente (entre 150.000 y 195.000 años)<sup>3</sup> como es *Homo sapiens*, aportando en forma significativa a la discusión sobre el origen de la especie humana y su dispersión por el planeta.

Los aportes realizados por el ADNmt al estudio de las poblaciones americanas son múltiples. Aportando al debate en torno a la antigüedad, vía de entrada y ritmo de poblamiento del Nuevo Mundo, los trabajos tempranos empleando ADNmt<sup>4</sup> apuntaban a un «cuello de botella» genético sufrido por las poblaciones que migraron desde Asia en el Pleistoceno. Esto habría reducido la variabilidad genética de las poblaciones americanas a cuatro haplogrupos, llamados A, B, C y D, a los que se agregó posteriormente el haplogrupo X, presente únicamente en América del Norte.<sup>5</sup> Trabajos subsiguientes, empleando muestras mayores y mayor resolución de análisis, han contribuido a exponer un panorama detallado, y considerablemente complejo, del ADNmt de las poblaciones de América. Este ha panorama ha sido interpretado a diferentes escalas, desde su significado para la dispersión del hombre en las Américas,<sup>6</sup> hasta la reconstrucción

- 1 Andrews, R. M. *et al.*, «Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA», en *Nature Genetics*, n.º 23, 1999
- 2 Giles, R. E. *et al.*, «Maternal inheritance of human mitochondrial DNA», en *Proceedings of the National Academy of Sciences*, n.º 77(11), 1980.
- 3 Trinkaus, E., «Early Modern Humans», en *Annual Review Of Anthropology*, n.º 34(1), 2005.
- 4 Schurr, T. G. *et al.*, «Amerindian Mitochondrial DNAs have Rare Asian Mutations at High Frequencies, Suggesting They Derived from Four Primary Maternal Lineages», en *American Journal Of Human Genetics*, n.º 46, 1990; Torroni, A. *et al.*, «Native American Mitochondrial DNA Analysis Indicates That the Amerind and the Nadene Populations Were Founded by Two Independent Migrations», en *Genetics*, n.º 130, 1992
- 5 Dornelles, C. L. *et al.*, «Is haplogroup X present in extant South American Indians?», en *American Journal Of Physical Anthropology*, n.º 127(4), 2005; Smith, D. G. *et al.*, «Distribution of mtDNA Haplogroup X Among Native North Americans», en *American Journal Of Physical Anthropology*, n.º 110, 1999.
- 6 E. g. Achilli, A. *et al.*, «The Phylogeny of the Four Pan-American Mtdna Haplogroups: Implications for Evolutionary and Disease Studies», en *PLOS ONE* 3(3), 2008, e1764; Fagundes, N. J. R. *et al.*, «Mitochondrial Population Genomics Supports a Single Pre-Clovis Origin with a Coastal Route for the Peopling of the

de trayectorias evolutivas a nivel regional<sup>7</sup> y los procesos que dieron lugar a las actuales poblaciones mestizadas de América Latina.<sup>8</sup> Este fue, en efecto, el foco de los primeros estudios realizados en el Uruguay empleando ADNmt.<sup>9</sup>

La naturaleza haploide y no recombinante, y la transmisión uniparental del ADN mitocondrial son sus principales desventajas en términos de genética poblacional, puesto que la sensibilidad del ADNmt a fluctuaciones estocásticas y la consiguiente desaparición de variantes (haplogrupos) es mayor en este genoma que en marcadores del ADN nuclear. Debido a ello, la reconstrucción de historias genéticas sobre datos actuales del ADNmt puede resultar complicada, especialmente en las poblaciones americanas, donde el impacto del contacto europeo fue radical (se calcula una reducción de las poblaciones aborígenes de 90 % a 95 % entre 1492 y 1650, según la población inicial que se estime).<sup>10</sup> Debido a ello, una «ventana» directa sobre la composición genética de las poblaciones prehispánicas es un insumo valioso como evidencia adicional en el análisis de la evolución de las poblaciones, las relaciones intergrupales prehistóricas y el impacto del contacto con el europeo. El ADN antiguo —es decir, el análisis de ADN extraído de restos arqueológicos— nos provee con dicha ventana, proporcionando datos directos sobre las características genéticas de la población en el momento cronológico analizado. Por contraste, el ADN extraído de muestras modernas representa el resultado de procesos microevolutivos (flujo génico, mutación, deriva) que pueden haber alterado en forma significativa la composición genética de una población respecto a su situación en el pasado.

Sin embargo, el análisis de ADN antiguo implica ciertos desafíos técnicos: En el proceso que sigue a la muerte del individuo, el ADN es, como las demás moléculas del

---

Americas», en *American Journal Of Human Genetics*, n.º 82(3), 2008; Perego, U. A. *et al.*, «Distinctive Paleo-Indian Migration Routes from Beringia Marked by Two Rare mtDNA Haplogroups», en *Current Biology*, n.º 19(1), 2009; Tamm, E. *et al.*, «Beringian Standstill and Spread of Native American Founders», en *PLOS ONE*, n.º 2(9), 2007.

- 7 Cabana, C. L. *et al.*, «Is the genetic structure of Gran Chaco populations unique? Interregional perspectives on native South American mitochondrial DNA variation», en *American Journal Of Physical Anthropology*, n.º 131(1), 2006; Fuselli, S. *et al.*, «Mitochondrial DNA Diversity in South America and the Genetic History of Andean Highlanders», en *Molecular Biology and Evolution*, n.º 20(10), 2003; García, F. *et al.*, «mtDNA microevolution in Southern Chile's archipelagos», en *American Journal Of Physical Anthropology*, n.º 129(3), 2006; Lewis, C. M. *et al.*, «Land, Language, and Loci: mtDNA in Native Americans and the Genetic History of Peru», en *American Journal Of Physical Anthropology*, n.º 127, 2004.
- 8 E. g. Martínez-Cruzado, J. C. *et al.*, «Reconstructing the population history of Puerto Rico by means of mtDNA phylogeographic analysis», en *American Journal Of Physical Anthropology*, n.º 128(1), 2005; Martínez Marignac, V. L. *et al.*, «Characterization of Admixture in an Urban Sample from Buenos Aires, Argentina. Using Uniparentally and Biparentally Inherited Genetic Markers», en *Human Biology*, n.º 76(4), 2004; Salas, A. *et al.*, «Gender bias in the multiethnic genetic composition of central Argentina», en *Journal of Human Genetics*, n.º 53(7), 2008.
- 9 Bonilla, C. *et al.*, «Substantial native American female contribution to the population of Tacuarembó, Uruguay, reveals past episodes of sex-biased gene flow», en *American Journal Of Human Biology*, n.º 16(3), 2004; Sans, M. *et al.*, «Unequal contributions of male and female gene pools from parental populations in the African descendants of the city of Melo, Uruguay», en *American Journal Of Physical Anthropology*, n.º 118(1), 2002; Sans, M. *et al.*, «Population structure and admixture in Cerro Largo, Uruguay, based on blood markers and mitochondrial DNA polymorphisms», en *American Journal Of Human Biology*, n.º 18, 2006.
- 10 Denevan, W. M., «Native American Populations in 1492: Recent Research and a Revised Hemispheric Estimate», en Denevan, W. M. (ed.), *The Native population of the Americas in 1492*, Madison, The University of Wisconsin Press, 1992, 2.ª ed.

organismo, sujeto a procesos de degradación que culminan en la destrucción del mismo.<sup>11</sup> Por ello, si logra recuperarse ADN de restos óseos,<sup>12</sup> este se hallará en fragmentos pequeños (en el orden de los 100 a 200 pares de bases [pb]),<sup>13</sup> y será extremadamente escaso, por lo que el riesgo de contaminación de este ADN con el proveniente de fuentes modernas —principalmente del mismo investigador que lo manipula— es constante. A causa de esto, es procedimiento estándar realizar la extracción y análisis de ADN antiguo en instalaciones aisladas, donde no se realicen análisis de ADN de individuos modernos, y tomando precauciones que incluyen el uso de vestimenta protectora e instrumental exclusivo, y la esterilización de todo el material de trabajo con radiación ultravioleta e hipoclorito de sodio.<sup>14</sup>

Desde la introducción de procedimientos de laboratorio que permiten trabajar con cantidades de partida extremadamente pequeñas de ADN, los análisis de ADN antiguo han ido en aumento, generando resultados útiles en cuanto a la relación de especies extintas con especies existentes, a los orígenes de la domesticación de distintas especies de plantas y animales, a la reconstrucción dietaria y ambiental a través de coprolitos y muestras sedimentarias, y al estudio de patógenos en restos antiguos, entre otros.<sup>15</sup> Asimismo, la incorporación de técnicas de secuenciación de alto rendimiento ha permitido ampliar el tamaño de las secuencias antiguas analizadas, de los pocos cientos de pares de bases a genomas mitocondriales<sup>16</sup> y genomas nucleares completos.<sup>17</sup>

El trabajo con ADN mitocondrial de poblaciones prehistóricas de América ha estado enfocado en tres grandes líneas de investigación. A escala continental, el ADN antiguo ha efectuado aportes significativos al debate acerca de la antigüedad y las características del poblamiento de América. A este respecto cabe destacar los estudios acerca de la diversidad genética en poblaciones antiguas<sup>18</sup> y de las características del

11 Lindahl, T., «Instability and decay of the primary structure of DNA», en *Nature*, n.º 362(6422), 1993.

12 Las primeras extracciones de ADN antiguo se realizaron sobre tejidos blandos excepcionalmente conservados, como momias o pieles desecadas (Higuchi, R. *et al.*, «DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family», en *Nature*, n.º 312[5991], 1984; Pääbo, S., «Molecular cloning of Ancient Egyptian mummy DNA», en *Nature*, n.º 314[6012], 1985); no obstante, Cooper, A. *et al.*, «Independent origins of New Zealand moas and kiwis», en *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, n.º 89, 1992, observaron una mejor conservación del ADN en hueso; actualmente, el hueso es el material de base típico para extracciones de ADN antiguo.

13 Para ilustrar el grado de fragmentación del ADN antiguo, téngase en cuenta que el ADN del cromosoma más pequeño de los 46 que porta cada célula humana es una cadena continua de 48 millones de pares de bases; por ende, la degradación usual del ADN antiguo equivale a dividir este cromosoma en aproximadamente 300.000 fragmentos.

14 Kemp, B. M. y Smith, D. G., «Use of bleach to eliminate contaminating DNA from the surface of bones and teeth», en *Forensic Science International*, n.º 154(1), 2005; Yang, D. Y. y Watt, K., «Contamination controls when preparing archaeological remains for ancient DNA analysis», en *Journal Of Archaeological Science*, n.º 32, 2005.

15 Pääbo, S. *et al.*, «Genetic Analyses from Ancient DNA», en *Annual Review of Genetics*, n.º 38, 2004.

16 Green, R. E. *et al.*, «A complete Neandertal mitochondrial genome sequence determined by high-throughput sequencing», en *Cell*, n.º 134(3), 2008.

17 Green, R. E. *et al.*, «A Draft Sequence of the Neandertal Genome», en *Science*, n.º 328(5979), 2010; Rasmussen, M. *et al.*, «Ancient human genome sequence of an extinct Palaeo-Eskimo», en *Nature*, n.º 463(7282), 2010; Reich, D. *et al.*, «Genetic history of an archaic hominin group from Denisova Cave in Siberia», en *Nature*, n.º 468(7327), 2010.

18 Kemp, B. M. *et al.*, «Genetic analysis of early holocene skeletal remains from Alaska and its implications for the settlement of the Americas», en *American Journal Of Physical Anthropology*, n.º 132(4), 2007; Malhi, R. S. *et al.*, «Mitochondrial haplogroup M discovered in prehistoric North Americans», en *Journal Of Archaeological Science*, n.º 34(4), 2007.

poblamiento de regiones específicas, como Tierra del Fuego,<sup>19</sup> la región andina<sup>20</sup> y las Antillas.<sup>21</sup> A escala regional, se ha empleado el ADN antiguo para contrastar hipótesis de carácter arqueológico, como las relacionadas con las migraciones prehistóricas en el sudoeste de los Estados Unidos,<sup>22</sup> y para evaluar la interrupción o la continuidad en la estructura genética entre las poblaciones precolombinas y las actuales.<sup>23</sup> En este trabajo se presenta una síntesis de los resultados obtenidos sobre ADN antiguo de muestras del Uruguay, y las implicancias de los mismos para la comprensión del aporte genético indígena a la población actual del Uruguay.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### MUESTRAS ANALIZADAS

Los restos analizados en este trabajo provienen de ocho sitios, ubicados en dos regiones bien definidas del territorio uruguayo (figura 1). Los restos del oeste del país fueron recuperados en el entorno de la desembocadura del Río Negro, en tanto que los restos del este están asociados a estructuras monticulares («cerritos de indios») de la cuenca de la Laguna Merín. En el caso del oeste, con la excepción del sitio Los Cardos, los restos fueron recuperados en condiciones poco sistemáticas, lo cual dificulta la asociación de los restos con los elementos culturales del contexto.<sup>24</sup> Trabajos recientes han logrado sin embargo acotar el marco cronológico, obteniendo fechados radiocarbónicos que se extienden desde dos mil a trescientos años antes del presente (a.A.P.), contándose con un fechado sobre restos óseos humanos, de  $1910 \pm 50$  a.A.P. en el sitio El Cerro.<sup>25</sup>

La totalidad de los restos del este analizados fueron recuperados en condiciones sistemáticas, con contexto y estratigrafía adecuados, por lo que la situación es

- 
- 19 García-Bour, J. *et al.*, «Early Population Differentiation in Extinct Aborigines From Tierra del Fuego-Patagonia: Ancient mtDNA Sequences and Y-Chromosome STR Characterization», en *American Journal Of Physical Anthropology*, n.º 123, 2004; Lalueza, C. *et al.*, «Lack of founding Amerindian mitochondrial DNA lineages in extinct Aborigines from Tierra del Fuego-Patagonia», en *Human Molecular Genetics*, n.º 6(1), 1997.
- 20 Moraga, M. *et al.*, «Análisis de ADN mitocondrial en momias del norte de Chile avala hipótesis de origen amazónico de poblaciones andinas», en *Revista chilena de historia natural*, n.º 74, 2001.
- 21 Lalueza-Fox, C. *et al.*, «Mitochondrial DNA from Pre-Columbian Ciboneys from Cuba and the Prehistoric Colonization of the Caribbean», en *American Journal Of Physical Anthropology*, n.º 121, 2003; Lalueza-Fox, C. *et al.*, «mtDNA from extinct Tainos and the peopling of the Caribbean», en *Annals Of Human Genetics*, n.º 65, 2001.
- 22 Carlyle, S. W. *et al.*, «Context of Maternal Lineages in the Greater Southwest», en *American Journal Of Physical Anthropology*, n.º 113(1), 2000; Kaestle, F. A. y Smith, D. G., «Ancient Mitochondrial DNA Evidence for Prehistoric Population Movement: The Numic Expansion», en *American Journal Of Physical Anthropology*, n.º 115(1), 2001.
- 23 Lewis, C. M. *et al.*, «Ancient DNA and Genetic Continuity in the South Central Andes», en *Latin American Antiquity*, n.º 18(2), 2007; Nores, R. y Demarchi, D. A., «Análisis de haplogrupos mitocondriales en restos humanos de sitios arqueológicos de la provincia de Córdoba», en *Revista Argentina de Antropología Biológica*, n.º 13(1), 2011; O'Rourke, D. H.; Hayes, M. G. y Carlyle, S. W., «Spatial and Temporal Stability of mtDNA Haplogroup Frequencies in Native North America», en *Human Biology*, n.º 72(1), 2000.
- 24 Sans, M., *Las poblaciones prehistóricas del Uruguay*, Montevideo, FHC, Udelar, 1988.
- 25 Castillo, A., «Excavaciones y museo: Profundizando en el conocimiento de los grupos “ceramistas” del litoral (Río Negro, Uruguay)», en Beovide, L.; Barreto, I. y Curbelo, C. (eds.), *X Congreso Uruguayo de Arqueología: La Arqueología Uruguaya ante los desafíos del nuevo siglo*, Montevideo, Asociación Uruguaya de Arqueología, 2004.

radicalmente diferente de la registrada en el oeste. El fenómeno de los «cerritos de indios» ha sido ampliamente estudiado y se caracteriza por un rango temporal que se extiende desde hace aproximadamente 5000 años hasta el siglo XVII.<sup>26</sup> Sin embargo, la asociación de los restos humanos con las estructuras monticulares es menos clara, observándose discrepancias entre las dataciones de los esqueletos y las de las capas de las que fueron recuperados, siendo estas hasta mil años más antiguas.<sup>27</sup> El rango cronológico de los entierros, basados en los 11 fechados radiocarbónicos disponibles sobre restos óseos, es de 1610 ± 46 a.A.P. (AA 81800) a 220 ± 50 a.A.P. (URU 0014), ambos del sitio CH2D01-A.

### EXTRACCIÓN DE ADN

La extracción de ADN fue realizada en las instalaciones del Laboratorio de ADN Antiguo del Departamento de Antropología Biológica de la FHCE, Udelar. Estas instalaciones se encuentran en un área aislada y cuentan con los implementos necesarios para minimizar la probabilidad de contaminación con ADN moderno: inyector de aire con filtro, luz ultravioleta general y localizada e instrumental utilizado exclusivamente para ADN antiguo. Durante el trabajo en el laboratorio se tomaron todas las precauciones prácticas para minimizar la contaminación, incluyendo el uso de mameluco con capucha, cubrezapatos, tapabocas y guantes de látex o nitrilo descartables, y limpieza con hipoclorito de sodio e irradiado UV sistemático de superficies e instrumental antes, durante el transcurso y después de cada sesión de trabajo.

El ADN fue extraído a partir de dientes, falanges o costillas de los individuos analizados siguiendo lineamientos establecidos en la literatura. A fin de eliminar el ADN contaminante proveniente de la manipulación, las piezas fueron lavadas con hipoclorito de sodio al 5 % e irradiadas con radiación ultravioleta. Posteriormente, hasta 0,5 g de fragmentos de hueso (o polvo de dentina, extraída del interior del diente con un torno de manualidades) fueron sometidos a descalcificación con EDTA 0,5M pH 8,0 y proteólisis con 2 mg de proteinasa K. Posteriormente se empleó un protocolo estándar de fenol/cloroformo<sup>28</sup> combinado con el agregado de sílice<sup>29</sup> y precipitación con etanol para el aislamiento y purificación del ADN. Más recientemente, hemos sustituido el protocolo de fenol/cloroformo por un procedimiento basado en tiocianato de guanidinio (GUSCN) y columnas de purificación de sílice.<sup>30</sup>

### ANÁLISIS DEL ADN

*Polimorfismos de restricción:* todas las muestras fueron analizadas por polimorfismos de fragmentos de restricción (RFLP), técnica usualmente utilizada para determinar

26 Para revisiones generales, véase Bracco, R., «Montículos de la Cuenca de la Laguna Merín: Tiempo, Espacio y Sociedad», en *Latin American Antiquity*, n.º 17(4), 2006; López Mazz, J. M., «Las estructuras tumulares (Cerritos) del litoral Atlántico Uruguayo», en *Latin American Antiquity*, n.º 12(3), 2001.

27 Bracco, R., o . cit.

28 Sambrook, J.; Fritsch, E. F. y Maniatis, T., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

29 Boom, R. *et al.*, «Rapid and simple method for purification of nucleic acids», en *Journal of Clinical Microbiology*, n.º 28, 1990.

30 Höss, M. y Pääbo, S., «DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method», en *Nucleic Acids Research*, n.º 21(16), 1993; Yang, D. Y. *et al.*, «Technical note: improved DNA extraction from ancient bones using silica-based spin columns», en *American Journal Of Physical Anthropology*, n.º 105, 1998.

la presencia o ausencia de una mutación específica en una región dada del ADN. Los polimorfismos empleados fueron los definidos originalmente por Torrioni *et al.*,<sup>31</sup> para los haplogrupos indígenas fundadores A, B, C y D (tabla 1). Para ello, en cada muestra se amplificaron por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) los cuatro segmentos de ADN portadores de polimorfismos, empleando los cebadores descritos por Moraga *et al.*<sup>32</sup> para los haplogrupos A, B y D, y los descritos por Handt *et al.*<sup>33</sup> para el haplogrupo C. Las reacciones fueron montadas en el laboratorio de ADN antiguo, empleando las mismas precauciones que en la extracción de ADN.

Las operaciones pos-PCR fueron realizadas fuera del laboratorio de ADN antiguo. El éxito de la reacción de PCR fue verificada mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 %, y los productos de PCR para la determinación de los haplogrupos A, C y D fueron digeridos con la respectiva enzima de restricción. Los resultados de la digestión —y en el caso del haplogrupo B, el polimorfismo de tamaño— fueron visualizados por electroforesis en gel de poliacrilamida al 8 % y tinción con nitrato de plata.

*Secuencias de la región hipervariable I:* dado que el análisis por RFLP proporciona datos de baja resolución, en algunas muestras se efectuó además el análisis de secuencias de la región hipervariable I (HVRI). Esta región, comprendida entre las posiciones 16024 y 16383 del genoma mitocondrial (siguiendo la notación de la secuencia de referencia),<sup>34</sup> forma parte de la región control, un segmento no codificante con una tasa de mutación aproximadamente diez veces mayor que la del resto del ADNmt.<sup>35</sup> Debido a esta alta tasa, la región control tiene una gran variabilidad, que permite subdividir a los haplogrupos definidos por RFLP en variantes de carácter regional o poblacional.<sup>36</sup> La HVRI de las muestras a secuenciar fue amplificada por PCR en cinco segmentos solapantes empleando los cebadores descritos por Handt *et al.*,<sup>37</sup> y los productos enviados para su secuenciación al Institut Pasteur de Montevideo.

## REPLICACIÓN DE RESULTADOS

Debido al interés generado por algunas de las muestras, se procuró replicar los resultados de las mismas en un laboratorio independiente; esto constituye un procedimiento estándar en los análisis de ADN antiguo humano en virtud de su alta degradación y el alto riesgo de contaminación del mismo. La repetición de la extracción de ADN y la obtención de secuencias adicionales fue realizada por el autor en el laboratorio de ADN del Departamento de Antropología de la Universidad de Utah (Salt Lake City, Utah, Estados Unidos), bajo la dirección de D. H. O'Rourke.

31 Torrioni, A. *et al.*, o. cit.

32 Moraga, M. L. *et al.*, «Mitochondrial DNA polymorphisms in Chilean aboriginal populations: implications for the peopling of the southern cone of the continent», en *American Journal Of Physical Anthropology*, n.º 113(1), 2000.

33 Handt, O. *et al.*, «The Retrieval of Ancient Human DNA Sequences», en *American Journal Of Human Genetics*, n.º 59, 1996.

34 Anderson, S. *et al.*, «Sequence and organization of the human mitochondrial genome», en *Nature*, n.º 290, 1981.

35 Soares, P. *et al.*, «Correcting for Purifying Selection: An Improved Human Mitochondrial Molecular Clock», en *American Journal Of Human Genetics*, n.º 84(6), 2009.

36 Forster, P. *et al.*, «Origin and evolution of Native American mtDNA variation: a reappraisal», en *American Journal Of Human Genetics*, n.º 59, 1996.

37 Handt, O. *et al.*, o. cit.

## ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS DATOS

Las frecuencias de haplogrupos mitocondriales de las muestras de Uruguay fueron comparadas con las frecuencias registradas en distintas poblaciones, antiguas y modernas, de la porción meridional de Sudamérica, incluyendo poblaciones actuales de nuestro país (tabla 2). Considerando la baja resolución de los datos, la finalidad fundamental de este análisis es exploratoria, buscando similitudes que puedan apuntar a afinidades poblacionales debidas a ancestría común o flujo génico, que puedan verificarse mediante análisis de mayor resolución.

Para lograr una aproximación visual a las semejanzas y diferencias entre las muestras uruguayas y las sudamericanas, se realizó un análisis de distancias genéticas entre las mismas, empleando el índice  $D_A$  de Nei *et al.*<sup>38</sup> La matriz de distancias resultante fue sometida a un escalamiento multidimensional no métrico,<sup>39</sup> reduciendo las veinte dimensiones correspondientes a la distancia entre cada par de poblaciones a dos dimensiones, representables en un sistema de ejes cartesianos. Los cálculos fueron realizados empleando el paquete MASS 7.3-16<sup>40</sup> en el entorno R versión 2.14.1.<sup>41</sup>

Los datos relativos a secuencias, al constituir una minoría de la muestra, fueron tratados en forma cualitativa, comparándolas con linajes relacionados en otras poblaciones de América.

## RESULTADOS

Los haplogrupos determinados en las muestras analizadas pueden verse en la figura 2A. Debe señalarse que varias muestras presentaron resultados contradictorios, provenientes de probable contaminación «cruzada» entre las mismas. Dichas muestras no se discutirán este trabajo.

Las muestras del este y el oeste presentan algunas diferencias en frecuencias de haplogrupos: Hay mayor frecuencia de los haplogrupos A y C en los individuos del este, y ausencia de haplogrupo D, que sí está presente en el oeste. Sin embargo, el tamaño de la muestra es decididamente pequeño, por lo que sacar conclusiones sobre la base de estas diferencias es prematuro. De hecho, las diferencias no son significativas ( $X^2 = 4,26$ ;  $gl = 3$ ;  $p = 0,234$ ), de modo que se tratará a la muestra prehistórica como una sola, sin tomar en cuenta diferencias regionales.

Al comparar las frecuencias de haplogrupos de la muestra arqueológica con las frecuencias de haplogrupos indígenas presentes en la población actual del Uruguay (figura 2B)<sup>42</sup> se constata que las frecuencias de haplogrupos mitocondriales son muy semejantes, siendo estadísticamente indistinguibles ( $X^2 = 1,40$ ;  $gl = 3$ ;  $p = 0,706$ ).

38 Nei, M.; Tajima, F. y Tateno, Y., «Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data», en *J Mol Evol*, n.º 19(2), 1983.

39 Manly, B. F. J., *Multivariate Statistical Methods: A Primer*, Londres-Nueva York, Chapman & Hall-CRC, 1994, 2.ª ed.

40 Venables, W. N. y Ripley, B. D., *Modern Applied Statistics with S*, Nueva York, Springer, 2002, 4.ª ed.

41 R Development Core Team, *R, A language and environment for statistical computing*, R Foundation for Statistical Computing, Viena, 2011, disponible en <<http://www.R-project.org/>>.

42 Bonilla, C. *et al.*, o. cit.; Gascue, C. *et al.*, «Frequencies of the Four Major Amerindian mtDNA Haplogroups in the Population of Montevideo, Uruguay», en *Human Biology*, n.º 77(6), 2005; Sans, M. *et al.*,

El *stress* del escalamiento multidimensional (o sea, las alteraciones introducidas en la matriz de distancias para reducirla a relaciones bidimensionales) es de 12,2 %, cifra considerable dado que el máximo ideal para un número de dimensiones dado es de 10 %.<sup>43</sup> Sin embargo, se mantuvo este número de ejes a fin de simplificar su análisis en esta instancia. El primer eje del escalamiento está asociado con los haplogrupos A y D, en tanto que los haplogrupos B y C se asocian al segundo eje. La representación gráfica de las poblaciones en estos ejes (figura 3) muestra un agrupamiento central, conteniendo la muestra analizada y las poblaciones modernas de Cerro Largo y Tacuarembó. Este agrupamiento también incluye la población prehispánica de Córdoba. Próximos a este agrupamiento, aunque claramente diferenciados del mismo, se encuentran la población actual de Artigas, los Mapuche de Argentina y los Pilagá del Chaco, y más lejos aún, diversas poblaciones del sur de Chile y la región chaqueña.

De las cinco muestras cuyo haplogrupo fue determinado por secuencia de la HVRI (figura 2), dos (los individuos 12 y 20 del sitio CH2D01-A) merecen especial atención por presentar el motivo 16051G-16223T-16288C-16298C-16325C-16327T. Esta secuencia pertenece al haplogrupo C en virtud de las mutaciones 16223T, 16298C, 16325C y 16327T, y al subhaplogrupo C1d por la presencia de la mutación 16051G. El linaje C1d + 16288C, hallado originalmente en restos antiguos por Bertoni *et al.*<sup>44</sup> y replicada posteriormente en los mismos restos en la Universidad de Utah, caracteriza también al ADN mitocondrial de Vaimaca Perú<sup>45</sup> y ha sido descrita en individuos contemporáneos nacidos en distintas localidades del Uruguay, usualmente con el agregado de las mutaciones 16140C y 16209C.<sup>46</sup>

## DISCUSIÓN

### CONTINUIDAD INDÍGENA

#### DESDE TIEMPOS PREHISPÁNICOS HASTA EL PRESENTE

La mayor parte de la población indígena de lo que actualmente es Uruguay fue llevado a la cuasi extinción en las primeras décadas del siglo XIX<sup>47</sup> en campañas militares que fueron la culminación de un proceso comenzado en el siglo XVI que constituyó, a todos los efectos, un etnocidio. Sin embargo, la contribución indígena femenina al acervo genético uruguayo ha mostrado —a través del ADN mitocondrial— ser sustancial, con porcentajes que van desde 20 % en Montevideo<sup>48</sup> a 62 % en Tacuarembó.<sup>49</sup> En vistas de ello, se plantea la posibilidad de analizar a las poblaciones actuales como «reserva» genética que refleje fenómenos poblacionales antiguos. Así, las característi-

---

«Population structure...», o. cit., y datos sin publicar.

43 Manly, B. F. J., o. cit.

44 Bertoni, B. *et al.*, «Primeras secuencias de ADN mitocondrial de indígenas prehistóricos del Uruguay», en Beovide, L.; Barreto, I. y Curbelo, C. (eds.), o. cit., 2004.

45 Sans, M. *et al.*, «The last Charrua Indian (Uruguay): analysis of the remains of Chief Vaimaca Perú», en *Nature Precedings*, 2010.

46 Figueiro, G.; Hidalgo, P. C. y Sans, M., «Control Region Variability of Haplogroup C1d and the Tempo of the Peopling of the Americas», en *PLOS ONE*, n.º 6(6), 2011.

47 Acosta y Lara, E. F., *La guerra de los Charrúas en la Banda Oriental*, t. 2: «Período patrio», Montevideo, Linardi y Risso, 1989.

48 Gascue, C. *et al.*, o. cit.

49 Bonilla, C. *et al.*, o. cit.

cas genéticas de las poblaciones indígenas del Uruguay, aunque extintas, pueden ser estudiadas por aproximación al ADNmt de la población actual, como se ha propuesto también para la población mayoritariamente «blanca» del Estado de Río Grande del Sur (Brasil) que también presenta un importante aporte amerindio.<sup>50</sup>

Sin embargo, la continuidad temporal registrada entre el acervo genético indígena de las poblaciones prehispanica (aunque algunas muestras se solapan temporalmente con la época colonial) y actual del Uruguay resulta, cuando menos, sorprendente, especialmente en virtud de la extrema sensibilidad teórica del ADNmt a factores estocásticos. En las poblaciones indígenas de Norteamérica, esta continuidad fue observada por O'Rourke *et al.*,<sup>51</sup> pero hasta recientemente no había sido probado para Sudamérica, siendo corroborada en la región andina<sup>52</sup> y aparentemente descartada para la región central de Argentina.<sup>53</sup> El presente estudio parece comprobar en líneas generales dicha continuidad para el territorio que actualmente es Uruguay. La estrecha semejanza (figura 3) de la muestra prehistórica con las poblaciones de Tacuarembó y Cerro Largo, que tienen un alto aporte materno amerindio (62 % y 30 %, respectivamente)<sup>54</sup> contribuyen a reafirmar esta continuidad.

Las secuencias obtenidas corroboran lo sugerido por los datos de las frecuencias. El linaje C1d + 16288C ha estado presente en nuestro territorio desde hace por lo menos 1600 años y ha sido registrada exclusivamente en el Uruguay.<sup>55</sup> Por lo tanto, es razonable suponer que el acervo genético indígena presente en la población uruguaya actual es en gran medida el reflejo del acervo de la población de nuestro territorio durante el Holoceno tardío. Este hecho, además de reforzar el potencial de «reserva genética» de la población actual, contribuye a reafirmar el peso del aporte genético de los grupos presentes al momento de la llegada del europeo, en general ignorados al momento de considerar el legado indígena en el Uruguay a favor del componente Guaraní misionero.<sup>56</sup>

Naturalmente, esta afirmación debe matizarse como mínimo con dos notas precautorias. La primera refiere a la coherencia espacial y temporal de la muestra, que pertenece a dos regiones diferentes del Uruguay y a un intervalo temporal de por lo menos 1400 años, por lo que no constituye la muestra de una población en el sentido biológico. A esto se añaden los estudios morfométricos que diferencian a las poblaciones prehistóricas del este y el oeste<sup>57</sup> y que registran, en los restos esqueléticos del oeste, una heterogeneidad que podría deberse a la presencia de varias poblaciones

50 Marrero, A. R. *et al.*, «Heterogeneity of the genome ancestry of individuals classified as White in the State of Rio Grande do Sul, Brazil», en *American Journal Of Human Biology*, n.º 17(4), 2005.

51 O'Rourke, D. H. *et al.*, o. cit.

52 Lewis, C. M. *et al.*, «Ancient DNA...», o. cit.

53 Nores, R. y Demarchi, D. A., o. cit.

54 Bonilla, C. *et al.*, o. cit.; Sans, M. *et al.*, «Population structure ...», o. cit.

55 Sans, M.; Figueiro, G. e Hidalgo, P. C., «A New Mitochondrial C1 Lineage from the Prehistory of Uruguay: Population Genocide, Ethnocide and Continuity», en *Human Biology*, n.º 84(3), 2012.

56 Sans, M. y Figueiro, G., «Continuidad indígena en la población uruguaya actual: ¿Guaraníes o Charrúas?», en Beovide, L.; Erchini, C. y Figueiro, G. (eds.), *La arqueología como profesión: los primeros 30 años. XI Congreso Nacional de Arqueología Uruguaya*, Montevideo, Asociación Uruguaya de Arqueología, 2009.

57 Bertoni, B.; Portas, M. y Sans, M., «Relaciones Morfológicas de las poblaciones prehistóricas del Uruguay: Análisis de restos esqueléticos humanos», en Durán Coirolo, A. y Bracco Boksar, R., (eds.), *Arqueología de las Tierras Bajas*, Montevideo, Ministerio de Educación y Cultura, 2000.

representadas.<sup>58</sup> La segunda nota refiere al hecho de que los linajes presentes en los haplogrupos de la población actual incluyen, muy probablemente, migrantes del período colonial: en particular, la presencia en el Uruguay de linajes del noroeste de Argentina<sup>59</sup> apuntan a esta posibilidad, si bien no puede descartarse a priori que su presencia en el Uruguay tenga, en algunos casos, origen prehispanico.

## PERSPECTIVAS FUTURAS

Esta primera síntesis de los resultados de ADN mitocondrial en poblaciones prehistóricas del Uruguay plantea una hipótesis concreta respecto a la continuidad genética de las mismas en el Uruguay actual. La investigación futura queda abierta en varias direcciones:

En primer lugar, la muestra debe ampliarse tanto en magnitud como en resolución. La magnitud habrá de ser tanto numérica como espacial, teniendo en cuenta sitios en la región Sur con restos arqueológicos. El aumento de la resolución a nivel numérico permitirá comprobar si las diferencias a nivel morfológico entre las poblaciones prehistóricas de las distintas regiones tienen una base genética. El aumento en resolución se concentrará en la obtención de secuencias de las regiones hipervariables I y II a fin de distinguir tanto los linajes compartidos entre las regiones a nivel prehistórico como los compartidos con las poblaciones actuales.

En segundo lugar, las afinidades interregionales constatadas en el presente estudio merecen un análisis más profundo, que depende en gran medida del aumento en resolución. En el análisis comparativo (figura 3), la muestra prehistórica de Córdoba analizada por Nores y Demarchi<sup>60</sup> se encuentra en la agrupación que vincula a la muestra prehistórica del Uruguay con las poblaciones actuales. Una vinculación biológica basada en ancestría común o flujo génico prehistórico es una hipótesis de trabajo viable, y de particular interés considerando que, morfológicamente, Vaimaca Perú presenta semejanzas, de posible base genética, con las poblaciones prehistóricas de Córdoba.<sup>61</sup> Asimismo, considerando vinculaciones interpoblacionales antiguas observadas a través de las materias primas líticas,<sup>62</sup> la vinculación (una vez más, a nivel de ancestría común o flujo génico) con la región Pampeana argentina debe analizarse, así como con el Sur de Brasil, en virtud de sus semejanzas a nivel del fenómeno arqueológico de los «cerritos de indios».

Por último, es fundamental ampliar la resolución cronológica de la muestra. Las evidencias actuales indican que la antigüedad de los restos óseos humanos en el Uruguay es de no más de 2000 años, por lo que es imposible tener una perspectiva diacrónica más amplia de la estructura genética de las poblaciones prehistóricas. Pero incluso a nivel de este período reciente la información es sesgada, puesto que los fechados radiocarbónicos realizados directamente sobre el material óseo son escasos. En el este, esto contribuye a sobrestimar las edades de muchos restos al basarse únicamente

58 Figueiro, G. y Sans, M., *Determinación de sexo y proporciones sexuales en restos prehistóricos del Uruguay*, Colección Avances de Investigación, Montevideo, FHCE, Udelar, 2011.

59 Figueiro, G.; Hidalgo, P. C. y Sans, M., o. cit.

60 Nores, R. y Demarchi, D. A., o. cit.

61 Sans, M. *et al.*, «The last...», o. cit.

62 Flegenheimer, N. *et al.*, «Long distance tool stone transport in the Argentine Pampas», en *Quaternary International*, n.º 109-110, 2003.

en los fechados del contexto<sup>63</sup> y en el oeste resulta en un vacío de información al carecerse en muchos casos de contexto. El aumento en el número de fechados directos será un insumo invaluable tanto para el estudio genético de las poblaciones prehistóricas como para los estudios arqueológicos en general.

## AGRADECIMENTOS

Este trabajo no podría haber sido realizado sin la generosa contribución de muestras por múltiples investigadores, responsables de varios sitios y colecciones: Roberto Bracco, Leonel Cabrera Pérez, Andrea Castillo, Andrés Gascue, José M. López Mazz y Arturo Toscano. Se agradece profundamente la colaboración en la colecta de muestras de Carina Erchini, Sara Campos, y Federica Moreno y Mónica Portas. Elizabeth Ackermann, Bernardo Bertoni (Facultad de Medicina), Mónica Cappetta (Facultad de Medicina) y Pedro C. Hidalgo contribuyeron con incontables horas de trabajo de laboratorio, consejos y *know-how*. Agradezco a los investigadores de la Universidad de Utah (Salt Lake City, EE.UU.), Dennis H. O'Rourke, Jennifer Raff y Justin Tackney, por su hospitalidad personal y académica y otras incontables horas de laboratorio y asesoría técnica. Este trabajo forma parte de la tesis de doctorado *Estudio de la variación temporal y espacial en el ADN mitocondrial de las poblaciones prehistóricas de la región pampeana* (Doctorado en Ciencias Biológicas, Pedeciba, Udelar), dirigida por Mónica Sans (FHCE, Udelar) y codirigida por Dennis H. O'Rourke (University of Utah). El trabajo de tesis ha sido parcialmente financiado por la Comisión Académica de Posgrado (CAP) de la Udelar, la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) de la Udelar y el Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (Pedeciba) (Udelar, MEC, PNUD).

## BIBLIOGRAFÍA

- ACOSTA Y LARA, E. F., *La guerra de los Charrúas en la Banda Oriental*, t. 2: «Período patrio», Montevideo, Linardi y Risso, 1989.
- ACHILLI, A.; PEREGO, U. A.; BRAVI, C. M.; COBLE, M. D.; KONG, Q. P.; WOODWARD, S. R.; SALAS, A.; TORRONI, A. Y BANDELT, H. J., «The Phylogeny of the Four Pan-American MtdNA Haplogroups: Implications for Evolutionary and Disease Studies», en *PLOS ONE* 3(3), 2008.
- ALTUNA, M. E. Y DEMARCHI, D. A., «Haplogrupos mitocondriales entre los Mbyá-Guaraní de la provincia de Misiones» en *Revista Argentina de Antropología Biológica*, n.º 5 (1), 2003.
- ANDERSON, S.; BANKIER, A. T.; BARRELL, B. G.; DE BRUIJIN, M. H. L.; COULSON, A. R.; DROULIN, J.; EPERON, I. C.; NIERLICH, D. P.; ROSE, B. A. *et al.*, «Sequence and organization of the human mitochondrial genome», en *Nature*, n.º 290, 1981.
- ANDREWS, R. M.; KUBACKA, I.; CHINNERY, P. F.; LIGHTOWLERS, R. N.; TURNBULL, D. M. Y HOWELL, N., «Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA», en *Nature Genetics*, n.º 23, 1999.
- BERTONI, B.; FIGUEIRO, G.; CABANA, G.; McDONOUGH, J. E.; BLUTEAU, C.; MERRIWETHER, D. Y SANS, M., «Primeras secuencias de ADN mitocondrial de indígenas prehistóricos del Uruguay», en Beovide, L.; Barreto, I. y Curbelo, C. (eds.), *X Congreso Uruguayo de Arqueología: La Arqueología Uruguaya ante los desafíos del nuevo siglo*, Montevideo, Asociación Uruguaya de Arqueología, 2004.
- BERTONI, B.; PORTAS, M. Y SANS, M., «Relaciones Morfológicas de las Poblaciones prehistóricas del Uruguay: Análisis de Restos Esqueletarios Humanos», en Durán Coirolo, A. y Bracco Boksar, R., (eds.), *Arqueología de las Tierras Bajas*, Montevideo, Ministerio de Educación y Cultura, 2000.

63 Bracco, R., o. cit.

- BONILLA, C.; BERTONI, B.; GONZÁLEZ, S.; CARDOSO, H.; BRUM-ZORRILLA, N. Y SANS, M., «Substantial native American female contribution to the population of Tacuarembó, Uruguay, reveals past episodes of sex-biased gene flow», en *American Journal Of Human Biology*, n.º 16(3), 2004.
- BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM VAN DILLEN, P. M. E. Y VAN DER NORDAA, J., «Rapid and simple method for purification of nucleic acids», en *Journal of Clinical Microbiology*, n.º 28, 1990.
- BRACCO, R., «Montículos de la Cuenca de la Laguna Merín: Tiempo, Espacio y Sociedad», en *Latin American Antiquity*, n.º 17(4), 2006.
- CABANA, G. S.; MERRIWETHER, D. A.; HUNLEY, K. Y DEMARCHI, D. A., «Is the genetic structure of Gran Chaco populations unique? Interregional perspectives on native South American mitochondrial DNA variation», en *American Journal Of Physical Anthropology*, n.º 131(1), 2006.
- CABRERA PÉREZ, L., «Cerritos de Indios», transformaciones tecnológicas y mecanismos de construcción: Sitio CG14E01, «Isla Larga», en Beovide, L.; Barreto, I. y Curbelo, C. (eds.), *X Congreso Uruguayo de Arqueología: La Arqueología Uruguaya ante los desafíos del nuevo siglo*, Montevideo, Asociación Uruguaya de Arqueología, 2004.
- CARLYLE, S. W.; PARR, R. L.; HAYES, M. G. Y O'ROURKE, D. H., «Context of Maternal Lineages in the Greater Southwest», en *American Journal Of Physical Anthropology*, n.º 113(1), 2000.
- CASTILLO, A., «Excavaciones y museo: Profundizando en el conocimiento de los grupos «ceramistas» del litoral (Río Negro, Uruguay)», en Beovide, L.; Barreto, I. y Curbelo, C. (eds.), *X Congreso Uruguayo de Arqueología: La Arqueología Uruguaya ante los desafíos del nuevo siglo*, Montevideo, Asociación Uruguaya de Arqueología, 2004.
- COOPER, A.; MOURIER-CHAUVIRÉ, C.; CHAMBERS, G. K.; VON HAESELER, A.; WILSON, A. C. Y PÄÄBO, S., «Independent origins of New Zealand moas and kiwis», en *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, n.º 89, 1992.
- DENEVAN, W. M., «Native American Populations in 1492: Recent Research and a Revised Hemispheric Estimate», en Denevan, W. M. (ed.), *The Native population of the Americas in 1492, Madison*, The University of Wisconsin Press, 1992, 2.ª ed.
- DIEZ-REPETTO, A., *Estudio poblacional de comunidades guaraníes de Misiones, mediante marcadores moleculares de ADN mitocondrial y cromosoma Y*, tesis para la Licenciatura en Genética, Universidad Nacional de Misiones, 2004.
- DORNELLES, C. L.; BONATTO, S. L.; DE FREITAS, L. B. Y SALZANO, F. M., «Is haplogroup X present in extant South American Indians?», en *American Journal Of Physical Anthropology*, n.º 127(4), 2005.
- 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. *et al.*, «Mitochondrial Population Genomics Supports a Single Pre-Clovis Origin with a Coastal Route for the Peopling of the Americas», en *American Journal Of Human Genetics*, n.º 82(3), 2008.
- FIGUEIRO, G.; HIDALGO, P. C. Y SANS, M., «Control Region Variability of Haplogroup C1d and the Tempo of the Peopling of the Americas», en *PLOS ONE*, n.º 6(6), 2011.
- FIGUEIRO, G. Y SANS, M., *Determinación de sexo y proporciones sexuales en restos prehistóricos del Uruguay*, Colección Avances de Investigación, Montevideo, Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación, Universidad de la República, 2011.
- FLEGENHEIMER, N.; BAYÓN, C.; VALENTE, M.; BAEZA, J. Y FEMENÍAS, J., «Long distance tool stone transport in the Argentine Pampas», en *Quaternary International*, n.º 109-110, 2003.
- Forster, P.; Harding, R.; Torroni, A. y Bandelt, H. J., «Origin and evolution of Native American mtDNA variation: a reappraisal», en *American Journal Of Human Genetics*, n.º 59, 1996.
- FUSELLI, S.; TARAZONA-SANTOS, E.; DUPANLOUB, I.; SOTO, A.; LUISELLI, D. Y PETTENER, D., «Mitochondrial DNA Diversity in South America and the Genetic History of Andean Highlanders», en *Molecular Biology and Evolution*, n.º 20(10), 2003.
- GARCÍA-BOUR, J.; PÉREZ-PÉREZ, A.; ÁLVAREZ, S.; FERNÁNDEZ, E.; LÓPEZ-PARRA, A. M.; ARROYO-PARDO, E. Y TURBÓN, D., «Early Population Differentiation in Extinct Aborigines From Tierra del Fuego-Patagonia: Ancient mtDNA Sequences and Y-Chromosome STR Characterization», en *American Journal Of Physical Anthropology*, n.º 123, 2004.
- GARCÍA, A. Y DEMARCHI, D. A., «Linajes parentales amerindios en poblaciones del norte de Córdoba», en *Revista Argentina de Antropología Biológica*, n.º 8(1), 2006.
- GARCÍA, F.; MORAGA, M.; VERA, S.; HENRÍQUEZ, H.; LLOP, E.; ASPILLAGA, E. Y ROTHHAMMER, F., «mtDNA microevolution in Southern Chile's archipelagos», en *American Journal Of Physical Anthropology*, n.º 129(3), 2006.

- GASCUE, C.; MIMBACAS, A.; SANS, M.; GALLINO, J. P.; BERTONI, B.; HIDALGO, P. C. Y CARDOSO, H., «Frequencies of the Four Major Amerindian mtDNA Haplogroups in the Population of Montevideo, Uruguay», en *Human Biology*, n.º 77(6), 2005.
- GILES, R. E.; BLANC, H.; CANN, H. M. Y WALLACE, D. C., «Maternal inheritance of human mitochondrial DNA», en *Proceedings of the National Academy of Sciences*, n.º 77(11), 1980.
- GINTHER, C.; CORACH, D.; PENACINO, G. A.; REY, J. A.; CARNESE, F. R.; HUTZ, M. H.; ANDERSON, A.; JUST, J.; SALZANO, F. M. *et al.*, «Genetic variation among the Mapuche Indians from the Patagonian region of Argentina: mitochondrial DNA sequence variation and allele frequencies of several nuclear genes», en *Experientia. Supplementum*, n.º 67, 1993.
- GOICOECHEA, A. S.; CARNESE, F. R.; DEJEAN, C.; AVENA, S. A.; WEIMER, T. A.; FRANCO, M. H. L. P.; CALLEGARI-JACQUES, S. M.; ESTALOTE, A. C.; SIMÕES, M. L. M. S. *et al.*, «Genetic Relationships Between Amerindian Populations of Argentina», en *American Journal Of Physical Anthropology*, n.º 115, 2001.
- GREEN, R. E.; KRAUSE, J.; BRIGGS, A. W.; MARICIC, T.; STENZEL, U.; KIRCHER, M.; PATTERSON, N.; LI, H.; ZHAI, W. *et al.*, «A Draft Sequence of the Neandertal Genome», en *Science*, n.º 328(5979), 2010.
- GREEN, R. E.; MALASPINA, A.-S.; KRAUSE, J.; BRIGGS, A. W.; JOHNSON, P. L. F.; UHLER, C.; MEYER, M.; GOOD, J. M.; MARICIC, T. *et al.*, «A complete Neandertal mitochondrial genome sequence determined by high-throughput sequencing», en *Cell*, n.º 134(3), 2008.
- HANDT, O.; KRINGS, M.; WARD, R. H. Y PÄÄBO, S., «The Retrieval of Ancient Human DNA Sequences», en *American Journal Of Human Genetics*, n.º 59, 1996.
- HIGUCHI, R.; BOWMAN, B.; FREIBERGER, M.; RYDER, O. A. Y WILSON, A. C., «DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family», en *Nature*, n.º 312(5991), 1984.
- HÖSS, M. Y PÄÄBO, S., «DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method», en *Nucleic Acids Research*, n.º 21(16), 1993.
- KAESTLE, F. A. Y SMITH, D. G., «Ancient Mitochondrial DNA Evidence for Prehistoric Population Movement: The Numic Expansion», en *American Journal Of Physical Anthropology*, n.º 115(1), 2001.
- 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. *et al.*, «Genetic analysis of early holocene skeletal remains from Alaska and its implications for the settlement of the Americas», en *American Journal Of Physical Anthropology*, n.º 132(4), 2007.
- KEMP, B. M. Y SMITH, D. G., «Use of bleach to eliminate contaminating DNA from the surface of bones and teeth», en *Forensic Science International*, n.º 154(1), 2005.
- LALUEZA-FOX, C.; GILBERT, M. T. P.; MARTÍNEZ-FUENTES, A. J.; CALAFELL, F. Y BERTRANPETIT, J., «Mitochondrial DNA from Pre-Columbian Ciboneys from Cuba and the Prehistoric Colonization of the Caribbean», en *American Journal Of Physical Anthropology*, n.º 121, 2003.
- LALUEZA-FOX, C.; LUNA-CALDERÓN, F.; CALAFELL, F.; MORERA, B. Y BERTRANPETIT, J., «mtDNA from extinct Tainos and the peopling of the Caribbean», en *Annals Of Human Genetics*, n.º 65, 2001.
- LALUEZA, C.; PÉREZ-PÉREZ, A.; PRATS, E.; CORNUDELLA, L. Y TURBÓN, D.; «Lack of founding Amerindian mitochondrial DNA lineages in extinct Aborigines from Tierra del Fuego-Patagonia», en *Human Molecular Genetics*, n.º 6(1), 1997.
- LEWIS, C. M.; BUIKSTRA, J. E. Y STONE, A. C., «Ancient DNA and Genetic Continuity in the South Central Andes», en *Latin American Antiquity*, n.º 18(2), 2007.
- LEWIS, C. M.; TITO, R. Y.; LIZÁRRAGA, B. Y STONE, A. C., «Land, Language, and Loci: mtDNA in Native Americans and the Genetic History of Peru», en *American Journal Of Physical Anthropology*, n.º 127, 2004.
- LINDAHL, T., «Instability and decay of the primary structure of DNA», en *Nature*, n.º 362(6422), 1993.
- LÓPEZ MAZZ, J. M., «Las estructuras tumulares (Cerritos) del litoral Atlántico Uruguayo», en *Latin American Antiquity*, n.º 12(3), 2001.
- MALHI, R. S.; KEMP, B. M.; ESHLEMAN, J. A.; CYBULSKI, J.; SMITH, D. G.; COUSINS, S. Y HARRY, H., «Mitochondrial haplogroup M discovered in prehistoric North Americans», en *Journal Of Archaeological Science*, n.º 34(4), 2007.
- MANLY, B. F. J., *Multivariate Statistical Methods: A Primer*, Londres-Nueva York, Chapman & Hall-CRC, 1994. 2ª ed.

- 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. *et al.*, «Pre- and Post-Columbian Gene and Cultural Continuity: The Case of the Gaucho from Southern Brazil», en *Human Heredity*, n.º 64(3), 2007.
- MARRERO, A. R.; PEREIRA DAS NEVES LEITE, F.; DE ALMEIDA CARVALHO, B.; MARTINS PERES, L.; KOMMERS, T. C.; MÁNICA DA CRUZ, I.; SALZANO, F. M.; RUIZ-LINARES, A.; ARAÚJO DA SILVA JÚNIOR, W. *et al.*, «Heterogeneity of the genome ancestry of individuals classified as White in the State of Rio Grande do Sul, Brazil», en *American Journal Of Human Biology*, n.º 17(4), 2005.
- MARTÍNEZ-CRUZADO, J. C.; TORO-LABRADOR, G.; VIERA-VERA, J.; RIVERA-VEGA, M. Y.; STARTEK, J.; LATORRE-ESTEVEZ, M.; ROMÁN-COLÓN, A.; RIVERA-TORRES, R.; NAVARRO-MILLÁN, I. Y. *et al.*, «Reconstructing the population history of Puerto Rico by means of mtDNA phylogeographic analysis», en *American Journal Of Physical Anthropology*, n.º 128(1), 2005.
- MARTÍNEZ MARIGNAC, V. L.; BERTONI, B.; PARRA, E. J. Y BIANCHI, N. O., «Characterization of Admixture in an Urban Sample from Buenos Aires, Argentina, Using Uniparentally and Biparentally Inherited Genetic Markers», en *Human Biology*, n.º 76(4), 2004.
- MERRIWETHER, D. A.; ROTHHAMMER, F. Y FERRELL, R. E., «Distribution of the four founding lineage haplotypes in native Americans suggests a single wave of migration for the New World», en *American Journal Of Physical Anthropology*, n.º 98, 1995.
- MORAGA, M.; ASPILLAGA, E.; SANTORO, C.; STANDEN, V.; CARVALLO, P. Y ROTHHAMMER, F., «Análisis de ADN mitocondrial en momias del norte de Chile avala hipótesis de origen amazónico de poblaciones andinas», en *Revista chilena de historia natural*, n.º 74, 2001.
- MORAGA, M. L.; ROCCO, P.; MIQUEL, J. F.; NERVI, F.; LLOP, E.; CHAKRABORTY, R.; ROTHHAMMER, F. Y CARVALLO, P., «Mitochondrial DNA polymorphisms in Chilean aboriginal populations: implications for the peopling of the southern cone of the continent», en *American Journal Of Physical Anthropology*, n.º 113(1), 2000.
- NEI, M.; TAJIMA, F. Y TATENO, Y., «Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data», en *J Mol Evol*, n.º 19(2), 1983.
- NORES, R. Y DEMARCHI, D. A., «Análisis de haplogrupos mitocondriales en restos humanos de sitios arqueológicos de la provincia de Córdoba», en *Revista Argentina de Antropología Biológica*, n.º 13(1), 2011.
- O'ROURKE, D. H.; HAYES, M. G. Y CARLYLE, S. W., «Spatial and Temporal Stability of mtDNA Haplogroup Frequencies in Native North America», en *Human Biology*, n.º 72(1), 2000.
- PÄÄBO, S., «Molecular cloning of Ancient Egyptian mummy DNA», en *Nature*, n.º 314(6012), 1985.
- , POINAR, H.; SERRE, D.; JAENICKE-DESPRÉS, V.; HEBLER, J.; ROHLAND, N.; KUCH, M.; KRAUSE, J.; VIGILANT, L. *et al.*, «Genetic Analyses from Ancient DNA», *Annual Review of Genetics*, n.º 38, 2004.
- PEREGO, U. A.; ACHILLI, A.; ANGERHOFER, N.; ACCETTURO, M.; PALA, M.; OLIVIERI, A.; KASHANI, B. H.; RITCHIE, K. H.; SCOZZARI, R. *et al.*, «Distinctive Paleo-Indian Migration Routes from Beringia Marked by Two Rare mtDNA Haplogroups», en *Current Biology*, n.º 19(1), 2009.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM, *R: A language and environment for statistical computing*, R Foundation for Statistical Computing, Viena, 2011, disponible en <<http://www.R-project.org/>>.
- RASMUSSEN, M.; LI, Y.; LINDGREEN, S.; PEDERSEN, J. S.; ALBRECHTSEN, A.; MOLTKE, I.; METSPALU, M.; METSPALU, E.; KIVISILD, T. *et al.*, «Ancient human genome sequence of an extinct Palaeo-Eskimo», en *Nature*, n.º 463(7282), 2010.
- REICH, D.; GREEN, R. E.; KIRCHER, M.; KRAUSE, J.; PATTERSON, N.; DURAND, E. Y.; VIOLA, B.; BRIGGS, A.W.; STENZEL, U. *et al.*, «Genetic history of an archaic hominin group from Denisova Cave in Siberia», en *Nature*, n.º 468(7327), 2010.
- SALAS, A.; JAIME, J. C.; ÁLVAREZ-IGLESIAS, V. Y CARRACEDO, A., «Gender bias in the multiethnic genetic composition of central Argentina», en *Journal of Human Genetics*, n.º 53(7), 2008.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F. Y MANIATIS, T., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SANS, M., *Las poblaciones prehistóricas del Uruguay*, Montevideo, Facultad de Humanidades y Ciencias, Universidad de la República, 1988.
- Y FIGUEIRO, G., «Continuidad indígena en la población uruguaya actual: ¿Guaraníes o Charrúas?», en, Beovide, L.; Erchini, C. y Figueiro, G. (eds.), *La arqueología como*

- profesión: los primeros 30 años. XI Congreso Nacional de Arqueología Uruguaya*, Montevideo, Asociación Uruguaya de Arqueología, 2009.
- SANS, M.; FIGUEIRO, G. E HIDALGO, P. C., «A New Mitochondrial C1 Lineage from the Prehistory of Uruguay: Population Genocide, Ethnocide and Continuity», en *Human Biology*, n.º 84(3), 2012.
- SANS, M.; FIGUEIRO, G.; SANGUINETTI, C.; ECHARTE-RAFAELLI, L.; PORTELA, C.; TARANTO, L.; PIZZAROSSA, C.; OLIVER, R.; MANIKOWSKI, R. *et al.*, «The last Charrua Indian (Uruguay): analysis of the remains of Chief Vaimaca Perú», en *Nature Precedings*, 2010.
- SANS, M.; MERRIWETHER, D. A.; HIDALGO, P. C.; BENTANCOR, N.; WEIMER, T. A.; FRANCO, M. H.; ÁLVAREZ, I.; KEMP, B. M. Y SALZANO, F. M., «Population structure and admixture in Cerro Largo, Uruguay, based on blood markers and mitochondrial DNA polymorphisms», en *American Journal Of Human Biology*, n.º 18, 2006.
- SANS, M.; WEIMER, T. A.; FRANCO, M. H. L. P.; SALZANO, F. M.; BENTANCOR, N.; ÁLVAREZ, I.; BIANCHI, N. O. Y CHAKRABORTY, R., «Unequal contributions of male and female gene pools from parental populations in the African descendants of the city of Melo, Uruguay», en *American Journal Of Physical Anthropology*, n.º 118(1), 2002.
- SCHURR, T. G.; BALLINGER, S. W.; GAN, Y.-Y.; HODGE, J. A.; MERRIWETHER, D. A.; LAWRENCE, D. N.; KNOWLER, W. C.; WEISS, K. M. Y WALLACE, D. C., «Amerindian Mitochondrial DNAs have Rare Asian Mutations at High Frequencies, Suggesting They Derived from Four Primary Maternal Lineages», en *American Journal Of Human Genetics*, n.º 46, 1990.
- SMITH, D. G.; MALHI, R. S.; ESHLEMAN, J.; LORENZ, J. G. Y KAESTLE, F. A., «Distribution of mtDNA Haplogroup X Among Native North Americans», en *American Journal Of Physical Anthropology*, n.º 110, 1999.
- SOARES, P.; ERMINI, L.; THOMSON, N.; MORMINA, M.; RITO, T.; RÖHL, A.; SALAS, A.; OPPENHEIMER, S.; MACAULAY, V. *et al.*, «Correcting for Purifying Selection: An Improved Human Mitochondrial Molecular Clock», en *American Journal Of Human Genetics*, n.º 84(6), 2009.
- TAMM, E.; KIVISILD, T.; REIDL, M.; METSPALU, M.; SMITH, D. G.; MULLIGAN, C. J.; BRAVI, C. M.; RICKARDS, O.; MARTINEZ-LABARGA, C. *et al.*, «Beringian Standstill and Spread of Native American Founders», en *PLOS ONE*, n.º 2(9), 2007.
- 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. *et al.*, «Native American Mitochondrial DNA Analysis Indicates That the Amerind and the Nadene Populations Were Founded by Two Independent Migrations», en *Genetics*, n.º 130, 1992.
- TRINKAUS, E., «Early Modern Humans», en *Annual Review Of Anthropology*, n.º 34(1), 2005.
- VENABLES, W. N. Y RIPLEY, B. D., *Modern Applied Statistics with S*, Nueva York, Springer, 2002, 2.ª ed.
- YANG, D. Y.; ENG, B.; WAYE, J. S.; DUDAR, J. C. Y SAUNDERS, S. R., «Technical note: improved DNA extraction from ancient bones using silica-based spin columns», en *American Journal Of Physical Anthropology*, n.º 105, 1998.
- YANG, D. Y. Y WATT, K., «Contamination controls when preparing archaeological remains for ancient DNA analysis», en *Journal Of Archaeological Science*, n.º 32, 2005.

## TABLAS

Tabla 1: Polimorfismos de sitios de restricción correspondientes a los cuatro haplogrupos mitocondriales mayoritarios. El haplogrupo B no es definido por un polimorfismo de restricción, sino por una deleción de 9 pares de bases.

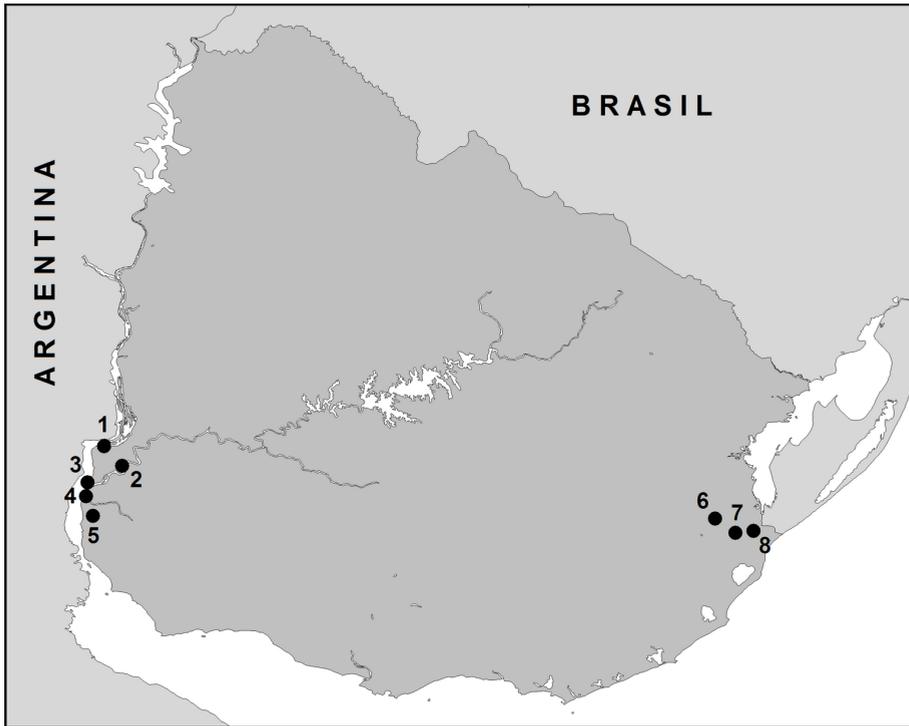
Haplogrupo	Sitio de restricción			
	HaeIII 663	Deleción 9 pb	HincII 13259	AluI 5176
A	+	-	+	+
B	-	+	+	+
C	-	-	-	+
D	-	-	+	-

Tabla 2: Poblaciones antiguas y modernas empleadas en el análisis comparativo de la muestra de ADN antiguo del Uruguay.

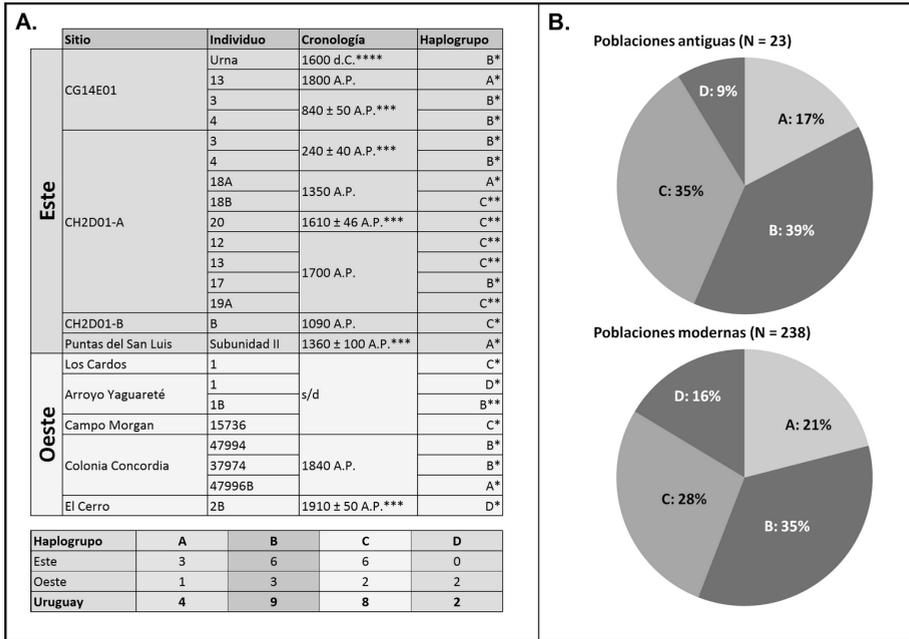
País / Región	Etnia	N	A	B	C	D	Fuente
Bolivia	Aymara	172	6 %	68 %	12 %	14 %	[1]
Chile	Huilliche	80	4 %	29 %	19 %	48 %	[1]
Chile	Atacameño	50	12 %	72 %	10 %	6 %	[1]
Chaco	Pilagá	38	11 %	32 %	29 %	29 %	[2]
Chaco	Toba	67	18 %	43 %	4 %	34 %	[2]
Chaco	Wichí (Chaco)	32	31 %	25 %	0 %	44 %	[2]
Chaco	Wichí (Formosa)	67	9 %	57 %	19 %	15 %	[2]
Argentina	Mapuche	129	14 %	37 %	22 %	26 %	[3],[4]
Argentina	Tehuelche	29	0 %	21 %	24 %	55 %	[3]
Sur Chile	Mapuche	111	0 %	7 %	44 %	49 %	[5]
Sur Chile	Pehuenche	105	3 %	11 %	41 %	46 %	[5]
Argentina	Guaraní	106	45 %	23 %	5 %	27 %	[6],[7]
Brasil	Guaraní	176	89 %	0 %	10 %	1 %	[8]
Brasil	Kaingang	78	47 %	4 %	49 %	0 %	[8]
Córdoba (prehist)		35	23 %	26 %	34 %	17 %	[9]
Tierra del fuego		68	0 %	0 %	49 %	51 %	[10],[11]
Córdoba (actual)		214	17 %	10 %	45 %	28 %	[12]
Cerro Largo		49	24 %	38 %	32 %	6 %	[13]
Artigas		39	18 %	41 %	23 %	18 %	[14]
Tacuarembó		62	21 %	34 %	32 %	13 %	[15]

Fuentes: [1] Merriwether *et al.* (1995); [2] Cabana *et al.* (2006); [3] Goicoechea *et al.* (2001); [4] Ginther *et al.* (1993); [5] Moraga *et al.* (2000); [6] Diez-Repetto (2004); [7] Altuna y Demarchi (2003); [8] Marrero *et al.* (2007); [9] Nores y Demarchi (2011); [10] Lalueza *et al.* (1997); [11] García-Bour *et al.* (2004); [12] García y Demarchi (2006); [13] Sans *et al.* (2006); [14] Datos inéditos; [15] Bonilla *et al.* (2004).

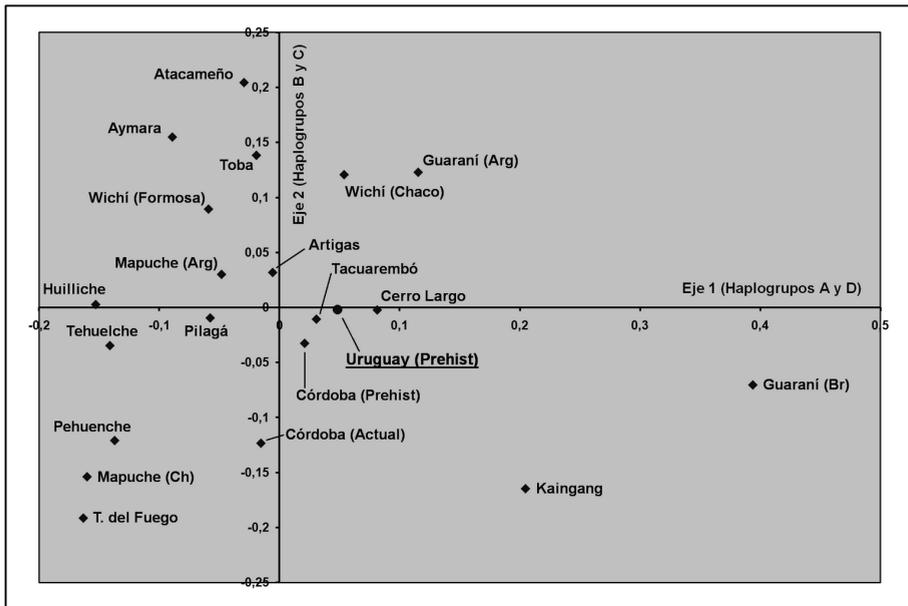
## FIGURAS



**Figura 1.** Mapa de los sitios de origen de las muestras analizadas en este trabajo. 1: Arroyo Yaguareté. 2: El Cerro. 3: Campo Morgan. 4: Los Cardos. 5: Colonia Concordia. 6: Puntas del San Luis. 7: CG14Eo1 «Isla Larga». 8: CH2Do1.



**Figura 2.** Síntesis de los resultados del análisis de ADN mitocondrial en muestras antiguas. A: Detalle de los haplogrupos de los individuos analizados y frecuencias de haplogrupos por región. Los datos cronológicos se basan en Bertoni *et al.* (2004), Bracco (2006), Cabrera Pérez (2004), Castillo (2004) y datos inéditos. Las cronologías son *post quem* salvo que se indique lo contrario. (\*) Haplogrupo determinado por RFLP. (\*\*) Haplogrupo determinado por secuencia de HVRI. (\*\*\*) Cronología determinada por datación directa del esqueleto. (\*\*\*\*) Cronología determinada por asociación con artefactos de origen europeo. B: Comparación de las frecuencias de haplogrupos A, B, C y D presentes en poblaciones uruguayas antiguas (arriba) y modernas (abajo).



**Figura 3.** Representación gráfica del escalamiento multidimensional de las distancias entre la muestra analizada y otras poblaciones de América del Sur.

