



PROGRAMA DE DESARROLLO DE LAS CIENCIAS BÁSICAS (PEDECIBA)

Área biología – Subárea genética

Tesis para la obtención del grado de Magister en Ciencias Biológicas

Lic. Fiorella Silveira

Aproximación a la variabilidad genética en poblaciones prehistóricas del sur y este de Uruguay

Orientador:

Dr. Gonzalo Figueiro

**DEPARTAMENTO DE ANTROPOLOGÍA BIOLÓGICA, FHCE – UNIVERSIDAD DE LA
REPÚBLICA**

Tribunal:

Dr. Julio Da Luz, Dr. Rodrigo Nores y Dra. Valentina Colistro

Montevideo, octubre 2024

Índice de contenido

Resumen.....	6
Agradecimientos.....	8
1- Introducción.....	9
2- Antecedentes.....	11
2.1 El poblamiento de América.....	11
2.2 Composición y aplicaciones del ADN mitocondrial.....	12
2.3 Aportes del ADN mitocondrial en el poblamiento americano.....	15
2.4 Propuestas alternativas a partir del ADN mitocondrial.....	19
2.5 ADN antiguo: ventajas y complicaciones.....	21
2.6 Aplicaciones del ADNmt antiguo a nivel regional.....	23
2.7 Aplicaciones del ADNmt en Uruguay.....	25
3- Objetivo e hipótesis.....	30
3.1 Objetivo general.....	30
3.2 Objetivos específicos.....	30
3.3 Preguntas que se plantea responder esta investigación.....	30
3.4 Hipótesis.....	31
4- Materiales y métodos.....	32
4.1 Descripción de los sitios.....	32
4.1.1 La cuenca del Arroyo Maldonado.....	33
4.1.2 El sitio arqueológico “La Viuda”	34
4.1.3 El sitio Arazatí.....	35
4.2 Descripción de las muestras.....	36
4.3 Metodología de laboratorio.....	39
4.3.1 Preparación de las muestras.....	41

4.3.2 Extracción de ADN.....	41
4.3.3 Amplificación del ADN.....	43
4.4 Análisis de las secuencias.....	46
4.4.1 Depuración y haplotipado de las muestras	46
4.4.2 Recopilación de secuencias de Sudamérica y comparaciones filogenéticas.....	46
4.4.3 Análisis del éxito de amplificación mediante regresión logística.....	48
5- Resultados.....	50
5.1 Extracción y amplificación de ADN.....	50
5.2 Asignación de linajes indígenas.....	50
5.3 Análisis filogenético.....	55
5.4 Análisis de regresión logística.....	60
6- Discusión.....	62
6.1 Éxito de las extracciones.....	62
6.2 El dato arqueológico y el dato genético.....	64
6.2.1 Estimación del número mínimo de individuos (NMI).....	64
6.2.2 Inferencias sobre modalidades de entierro.....	67
6.3 Contactos poblacionales.....	69
6.3.1 Afinidades regionales a corta distancia.....	70
6.3.2 Afinidades regionales a larga distancia.....	71
7- Conclusiones y perspectivas futuras.....	76
7.1 Perspectivas futuras.....	78
8- Referencias bibliográficas.....	81
9- Apéndices.....	92

Índice de figuras

1- Ubicación aproximada de las HVR de la región control en el ADNmt.....	14
2- Frecuencias y orígenes de los haplogrupos correspondientes al ADNmt de indígenas americanos.....	16
3- Esquema del flujo génico dentro y fuera de Beringia.....	18
4- Ubicación de los tres sitios de donde provienen las muestras.....	32
5- Restos craneales de la colección Seijo.....	37
6- Restos poscraneales de la colección Seijo.....	38
7- Esquema de la ubicación de los fragmentos correspondientes a las HVRI y II del ADNmt.....	45
8- Países de origen de las secuencias para el análisis comparativo.....	47
9- Red de haplotipos para el linaje C1.....	57
10- Red de haplotipos para el linaje C1d.....	58
11- Red de haplotipos para el linaje D1.....	58
12- Red de haplotipos para el linaje D4h3a.....	59
13- Gráfica de la función de regresión.....	61
14- Imágenes actual y antigua de un individuo infantil de Punta del Este.....	65
15- Resumen de los vínculos regionales y locales detectados entre las muestras estudiadas.....	69
16- Comparación de las campanas zoomorfas de Uruguay y Argentina.....	72

Índice de tablas

1- Elementos óseos analizados, localidad y antigüedad.....	40
2- Composición del <i>mix</i> para PCR.....	43
3- Cebadores utilizados para la amplificación de la HVRI.....	44
4- Cebadores utilizados para la ampliación de la HVRII.....	44
5- Éxito de amplificación para los fragmentos correspondientes a la HVRI.....	51
6- Éxito de amplificación para fragmentos correspondientes a la HVRII.....	52
7- Polimorfismos presentes en las muestras y linajes mitocondriales asignados.....	53
8- Regresión logística usando como variables independientes la antigüedad y el largo del fragmento.....	60
9- Regresión logística usando como variable independiente el largo del fragmento...	60

Resumen

El análisis de ADN antiguo proporciona una perspectiva diacrónica de la variación genética de las poblaciones, permitiendo inferir con mayor detalle procesos microevolutivos pasados. En Uruguay, las investigaciones efectuadas sobre el ADN mitocondrial (ADNmt) antiguo han arrojado resultados que sugieren cierto grado de continuidad con el componente indígena del Uruguay actual, pero en su mayoría corresponden a poblaciones del este del país. El objetivo del presente trabajo es estudiar la variabilidad genética de las poblaciones prehispánicas del sur de Uruguay a través del análisis de ADNmt de restos óseos humanos provenientes de sitios de costas del Río de la Plata y el Océano Atlántico, ampliando además la muestra del este. Se secuenciaron las regiones hipervariables (HVR) I y II del ADNmt de individuos provenientes de La Viuda (Rocha), Punta del Este (Maldonado) y Arazatí (San José). El ADN se extrajo en instalaciones exclusivas para el análisis de ADN antiguo; posteriormente se amplificó la HVR en nueve fragmentos solapantes para su secuenciación por método Sanger. Una vez obtenidas las secuencias se asignaron a haplogrupos y se compararon las secuencias de las tres regiones entre sí, así como con las secuencias obtenidas en otras regiones de Sudamérica, a fin de inferir procesos microevolutivos regionales y locales.

Los resultados obtenidos mostraron una alta tasa de éxito de amplificación y secuenciación, logrando asignar el haplogrupo correspondiente en 10 muestras de un total de 17 (59%). El linaje mitocondrial más frecuente fue C1, presente en 7 de las 10 muestras. A su vez, de estas siete, tres corresponden al subhaplogrupo C1d y de estos, una al subhaplogrupo C1d3. Le sigue en frecuencia el subhaplogrupo D4h3a, presente en dos secuencias (que se concluyó corresponden a un mismo individuo) y, por último, un único caso del haplogrupo D1. Estos resultados estarían indicando posibles contactos entre las poblaciones antiguas del Uruguay: por ejemplo, hasta el momento se había registrado el haplogrupo C1d3 en individuos provenientes de estructuras monticulares de Rocha; sin embargo, en este trabajo se encontró el mismo linaje en un individuo de Punta del Este. Este dato es relevante ya que, si bien hay evidencia de economías distintas para estos grupos, genéticamente pueden tratarse de una misma población. Respecto a los vínculos regionales, se observó una mayor aproximación a las poblaciones de Argentina, y en segundo lugar a Brasil. Se destaca la presencia de D4h3a ya que hasta el momento no se había registrado ningún individuo antiguo o

moderno con este haplogrupo en Uruguay. Este hecho podría estar indicando un contacto con poblaciones del norte argentino.

Futuros estudios de mitogenomas completos (que, considerando el relativo éxito en la amplificación y secuenciación de las muestras, es una perspectiva probable) podrán aportar mayor cantidad de datos y especificidad a los resultados para reconstruir la dinámica de las poblaciones antiguas de Uruguay.

Agradecimientos

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a todas las personas que hicieron posible la realización de este trabajo. En primer lugar, quiero agradecer a Andrés Azpiroz y Ernesto Beretta, del Museo Histórico Nacional, por permitirme acceder a la colección Seijo en múltiples ocasiones y por su constante disposición. Su apoyo fue fundamental para el desarrollo de esta tesis. Agradezco sinceramente a la Mag. Lucía Anza por su invaluable trabajo en el laboratorio y especialmente por el diseño de los cebadores en el correr de su trabajo de tesis, que me facilitaron enormemente la tarea. Mi gratitud también va dirigida a mi tutor de tesis, Dr. Gonzalo Figueiro, por su dedicación y sus enseñanzas. Su orientación y conocimiento fueron cruciales para llevar a buen término este proyecto.

Agradezco al tribunal, Dr. Julio Da Luz, Dr. Rodrigo Nores y Dra. Valentina Colistro, por tomarse el tiempo de leer esta tesis y por sus valiosos aportes, que contribuyeron a mejorarla significativamente.

Finalmente, quiero agradecer a mi familia: mis padres, mi hermana y Felipe. Gracias por todo su apoyo durante este proceso y por no dejar que me desanime en los momentos difíciles. Su confianza y aliento fueron mi motor para seguir adelante.

1.Introducción

Dentro de un marco antropológico, los análisis genéticos han demostrado ser útiles a la hora de esclarecer procesos migratorios hacia las principales regiones continentales. Uno de estos procesos es el poblamiento de América, temática que ha sido ampliamente discutida, donde los datos genéticos han aportado un gran cúmulo de información enriqueciendo la discusión en torno a las rutas y fechas de entrada de los primeros americanos. Datos obtenidos a partir de poblaciones nativas actuales de América y Siberia han sido utilizados para responder incertidumbres respecto al poblamiento del Nuevo Mundo, tales como ¿cuándo llegaron los primeros pobladores?, ¿cuántas olas migratorias estuvieron involucradas en el proceso de expansión a través del continente?, y ¿de qué parte de Eurasia provenían estos grupos? Tanto el ADN mitocondrial (ADNmt) como el cromosoma Y son marcadores genéticos que ayudan a identificar diversos linajes maternos y paternos respectivamente. A través del análisis de las variaciones en las secuencias de ADN, se puede conocer no solo los linajes presentes, sino también la manera en que estas poblaciones se dispersaron a lo largo del continente. Adicionalmente, midiendo la variación acumulada en las secuencias, se puede estimar una antigüedad de los linajes en ciertas regiones (Schurr y Sherry, 2004).

A menor escala, los análisis de ADNmt, así como de cromosoma Y, pueden aplicarse a nivel local permitiendo inferir procesos microevolutivos en regiones puntuales y en períodos de tiempo más acotados. Este es precisamente el enfoque que tomará el presente trabajo.

A lo largo de las diversas secciones se tratará de analizar la variabilidad genética de individuos prehistóricos provenientes de distintos sitios arqueológicos del este, sur y oeste del Uruguay con el fin de conocer las dinámicas poblacionales entre los grupos prehistóricos del país, así como con otras poblaciones a nivel regional. Para esto, se inicia esta tesis presentando brevemente las aplicaciones que se han hecho con el análisis del ADNmt a nivel continental, poniendo énfasis en el estudio del poblamiento de América como principal antecedente a esta escala, exponiendo los datos que se han obtenido, así como también las diferentes posturas que se han planteado respecto al tema. A continuación, se expone el trabajo con ADNmt en general, detallando los aspectos biológicos del mismo (composición, función, ventajas de su aplicación en los análisis paleogenéticos) y las dificultades que implica trabajar con moléculas de ADNmt antiguas. Asimismo, se enumeran los cuidados que hay que tener, tanto en la

manipulación de esta molécula como en las instalaciones donde se trabaje, para minimizar los riesgos de contaminación.

En la siguiente sección se presentan los principales antecedentes de los análisis mitocondriales realizados en el Cono Sur, finalizando esta sección con el foco en Uruguay y los datos obtenidos hasta el momento.

El tercer capítulo de esta tesis estará dedicado a detallar en primera instancia, las muestras analizadas y los sitios de los cuales provienen, y en segunda instancia, la metodología empleada. En este último punto se explican por un lado los diversos pasos involucrados en la extracción y amplificación de las secuencias, y por otro, el análisis de las secuencias obtenidas. Conjuntamente, se expone el trabajo realizado para la recolección de datos a nivel regional y los estudios comparativos elaborados con ellos.

Las siguientes dos secciones del trabajo se enfocan en presentar y discutir los resultados obtenidos. Para esto se tuvo en cuenta el éxito conseguido en las extracciones, la cantidad de secuencias a las que se les logró asignar el haplogrupo correspondiente, afinidades entre individuos y con otros grupos de la región, y la coherencia entre datos arqueológicos y datos genéticos.

Como último paso de esta tesis, se presentan las consideraciones finales del trabajo, así como las perspectivas a futuro de nuevos análisis que sigan contribuyendo al conocimiento de las poblaciones prehistóricas del Uruguay.

2. Antecedentes

2.1 El poblamiento de América

Uno de los temas de gran importancia para la arqueología americana es la discusión en torno al poblamiento de América, poniendo énfasis en las posibles rutas y fechas de ingreso. El aislamiento geográfico del continente americano causó un retraso en su poblamiento hasta fines del Pleistoceno; sin embargo, a pesar de esta fecha relativamente reciente, el lugar exacto de ingreso, la fecha y las rutas, siguen siendo discutidos (Llamas *et al.*, 2016). Hasta hace poco se estimaba que hace 13.500 años los primeros americanos se dispersaron rápidamente desde Beringia (puente terrestre que sirvió como unión entre Eurasia y América al quedar expuesto debido a los bajos niveles del mar durante el Último Máximo Glacial [UMG]) hasta Tierra del Fuego en unos pocos siglos, utilizando como vía un corredor libre de hielo por el oeste del actual Canadá. Estas poblaciones darían lugar a la cultura Clovis quienes cazarían hasta la extinción a la megafauna del Nuevo Mundo (Goebel *et al.*, 2008). Hoy en día, gracias a nuevos estudios arqueológicos y moleculares, se plantea que el poblamiento americano fue un proceso mucho más complejo.

Las hipótesis presentadas para el poblamiento americano pueden ser resumidas en tres modelos. El primero de ellos propone que los primeros seres humanos llegaron al norte del continente poco antes de 13.000 años AP, y al sur un poco antes de los 12.900 años AP. Los que defienden esta hipótesis proponen al “complejo Clovis” como la primera cultura arqueológica dispersa por Norteamérica (Prates *et al.*, 2020). La cultura Clovis es la tradición arqueológica con mayor distribución en Norteamérica, cuyo elemento lítico distintivo son las puntas de proyectil bifaciales con acanaladura. Debido a que originalmente se encontraron instrumentos Clovis en asociación a restos de mamut, la tradición fue considerada como correspondiente a grupos de alta movilidad especializados en la caza de megafauna, quienes habrían poblado América mientras seguían a estos animales durante el UMG. Geográficamente se puede ubicar a la cultura Clovis en Norteamérica, especialmente en el Este donde se encuentra la mayor densidad de sitios, pero también se la ha registrado en varios sitios de Centroamérica. Hoy en día se sabe que las puntas Clovis eran solo uno de los distintos tipos utilizados por los primeros pobladores americanos, y que aprovecharon varios recursos más allá de la caza de megafauna (O’Rourke y Raff, 2010). A partir del año 1965 empezaron a surgir las primeras cronologías, donde seis sitios Clovis de

Norteamérica (Lehner, Dent, Clovis, Naco, Domebo y Ventana Cave) fueron datados en entre 11.500 y 11.000 años AP (Meltzer, 2003). Sin embargo, después de 1965 varios sitios, tanto de Norte como de Sudamérica, presentaron fechas anteriores a las de la cultura Clovis, indicando que los portadores de esta cultura no fueron los primeros en llegar al continente. De esta forma surge el segundo modelo (“Clovis Segundo”) el cual propone una antigüedad intermedia para el poblamiento de América, con una entrada pre-Clovis, pero posterior al UMG (entre 18.500 y 13.000 años AP) con un ingreso a Sudamérica un poco más tardío (Prates *et al.*, 2020). Esto dio origen a otros modelos para explicar el poblamiento americano. Los que planteaban un origen pre-Clovis proponían la presencia de forrajeros oportunistas quienes todavía no tendrían puntas con acanaladura, sino un conjunto lítico más simple que les permitiría aprovechar una amplia gama de alimentos. Por último, el tercer modelo plantea una entrada previa o durante el UMG, con un ingreso hacia el sur del continente previo a 18.000 años AP (Prates *et al.*, 2020).

En las últimas tres décadas, gracias al recalibrado de los sitios y a los estudios genéticos, se ha reforzado la hipótesis de un poblamiento pre-Clovis, con un ingreso a América desde Beringia hace entre 19.500 y 14.000 años, y a América del Sur hace entre 18.500 y 15.000 años. Las diferencias en la variabilidad genética observadas en muestras de individuos actuales y antiguos estarían indicando que la migración inicial habría ocurrido de forma rápida siguiendo principalmente la costa del Pacífico (Prates *et al.*, 2020).

2.2 Composición y aplicaciones del ADNmt

Desde la década de 1990, un gran número de estudios genéticos relacionados con el poblamiento de América se hicieron en base a la variación observada en el genoma mitocondrial, ya que por sus características ha demostrado ser de gran utilidad en los análisis moleculares antropológicos y filogenéticos (Kemp y Schurr, 2010). Las mitocondrias son organelos celulares encargadas de la fosforilación oxidativa, es decir, de la respiración celular a través de la producción de energía en forma de ATP. El número de mitocondrias por célula es variable, pasando de unos pocos cientos en el espermatozoide a unos 200.000 en el óvulo, pero en la mayor parte de los tejidos se encuentran entre 1000 y 10.000 copias por célula, con 2 a 10 moléculas de ADN por mitocondria (Novo Villaverde, 2007).

El ADNmt humano es una molécula circular que codifica para 37 genes los cuales se encuentran ubicados uno a continuación del otro, prácticamente sin intrones ni regiones no codificantes entre ellos. A diferencia del ADN nuclear, donde las regiones no codificantes ocupan la mayor parte de la molécula, en el genoma mitocondrial solo ocupan un 3%. Este genoma está formado por dos cadenas complementarias, una denominada cadena “pesada” o H en donde se encuentra 28 genes, y otra conocida como “liviana” o L con los nueve genes restantes (Novo Villaverde, 2007).

Debido a que la mitocondria se encuentra en el citoplasma celular, este ADN es heredado únicamente por vía materna. Este hecho se debe a que, al formarse el gameto, el citoplasma va a permanecer solo en el gameto femenino (óvulo), mientras que en el gameto masculino (espermatozoide) el citoplasma es parte de la cola la cual se pierde al ingresar al gameto femenino durante la fecundación. Como consecuencia, todos los hijos de una misma madre van a recibir su ADNmt, pero solo las hijas serán capaces de transmitirlos a su descendencia. Esta particularidad significa que las mutaciones ocurridas estarían reflejando la historia femenina. A su vez, su tamaño relativamente pequeño, con 16.569 pares de bases doble cadena, en comparación con el ADN nuclear con un total de 3.000.000.000 pares de bases, ha permitido que se lo utilice en varios estudios para determinar el origen geográfico de determinadas variantes (Figueiro *et al.*, 2021).

En el ADNmt todos los cambios observados provienen exclusivamente de mutaciones ya que no recombina durante la meiosis; esto es una ventaja especialmente útil para poder conocer las relaciones maternas de ascendencia-descendencia. Conjuntamente, comparado con el ADN nuclear, el mitocondrial tiene una mayor tasa de mutación (según la región, ya que el área que codifica para proteínas es más estable). En particular, hay dos regiones de interés para los análisis filogenéticos, las regiones hipervariables I y II (HVRI y HVRII respectivamente). Ambos segmentos se ubican en la porción no codificante del ADNmt, conocida como “región control” y acumulan una alta tasa de mutaciones debido a su carácter no codificante y a la ausencia de mecanismos de reparación del ADN en la mitocondria. En consecuencia, estos segmentos evolucionan a un ritmo acelerado, lo cual resulta útil para estudiar eventos evolutivos recientes (O’Rourke *et al.*, 2000).

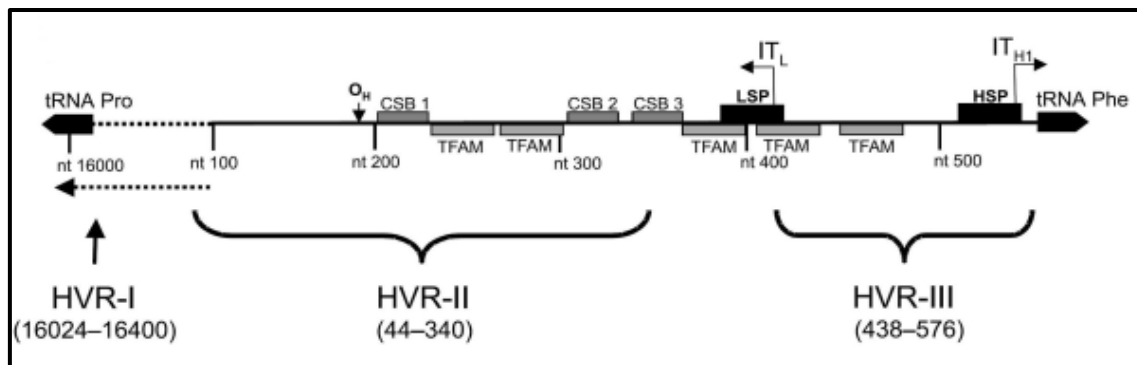


Figura 1. Ubicación aproximada de las HVR de la región control en el ADNmt. Tomado de Chinnery (2006).

El número de mutaciones generadas en estas regiones serán suficientes como para lograr diferenciar entre los distintos haplogrupos en poblaciones que hayan divergido recientemente, como es el caso de América (Kemp y Schurr, 2010). Los términos *haplogrupo*, *haplotipo* y *linaje* son de uso frecuente al trabajar con ADNmt. El primero hace referencia a un conjunto de mutaciones que se heredan todas juntas (“en bloque”) de una generación a la siguiente, siendo los únicos cambios presentes, las mutaciones nuevas que puedan ocurrir (Figueiro *et al.*, 2021). A su vez, estos nuevos cambios van a identificar a distintos *haplotipos* dentro de un haplogrupo. Finalmente, *linaje* indica la presencia de variantes adicionales más allá de aquellas que definen a un haplotipo (Raff *et al.*, 2011). Mediante el rastreo de haplogrupos, subhaplogrupos y haplotipos, el ADNmt ha sido especialmente útil para reconstruir las vías migratorias de las poblaciones humanas y estimar la antigüedad de las variantes que han surgido. Estas estimaciones se realizan en base a la tasa de mutación: se estima que la región codificante muta una vez cada 3533 años, aunque el margen de error es considerable (Soares *et al.*, 2009).

Otra particularidad relevante de este genoma es que el ADNmt no está sometido a grandes presiones selectivas, por lo tanto, las variaciones observadas van a reflejar la historia poblacional y no una historia natural (por ejemplo, una presión selectiva para adaptarse a un determinado tipo de ambiente). Un último rasgo que es necesario mencionar es que el ADNmt se presenta en miles de copias por célula, a diferencia del nuclear el cual solo contiene dos copias. En estudios de ADN antiguo, esto es de especial ventaja debido a la susceptibilidad del ADN a degradarse (O’Rourke *et al.*, 2000), como se verá más adelante.

2.3 Aportes del ADN mitocondrial en el poblamiento americano

El ADNmt ha sido el marcador genético más utilizado al momento de comprender procesos poblacionales como el del continente americano. Esto se debe, en parte, a su capacidad de permitir detectar afinidades genéticas entre poblaciones humanas. A su vez, su alta tasa de mutación resulta en numerosas diferencias las cuales sirven para distinguir entre individuos y grupos que estén vinculados por línea materna.

Uno de los primeros trabajos que analizan el ADNmt de las poblaciones americanas, es el de Schurr y colegas (1990). Los autores emplearon enzimas de restricción para estudiar ADNmt correspondientes a poblaciones de Norte, Centro y Sudamérica. Como resultado, observaron que el ADNmt de los primeros americanos derivaría de cuatro linajes maternos de Asia (Schurr *et al.*, 1990), los cuales posteriormente fueron designados con las letras A, B, C y D (Torroni *et al.*, 1992), agregando posteriormente un nuevo haplogrupo denominado X (Schurr y Sherry, 2004). Esto se interpretó como el ingreso a América de distintas olas migratorias (Torroni *et al.*, 1993). Cada uno de estos haplogrupos se definió posteriormente por una combinación única de polimorfismos en la región hipervariable I y en las regiones codificantes. Trabajos posteriores mencionan la presencia de una gran ola migratoria inicial, proveniente desde el noreste de Siberia entre 20.000 y 25.000 años AP, la cual daría origen a las poblaciones amerindias. Junto con estos primeros pobladores habrían ingresado los ancestros de los haplogrupos A1 (el cual sería a su vez ancestro de A2), B, C, D1 y X (Forster *et al.*, 1996). El patrón de variación genética observado en las poblaciones indígenas actuales de América es el mismo que el encontrado en las poblaciones ancestrales. Esta particularidad ha llevado a concluir que los cinco haplogrupos mencionados estarían presentes en los primeros pobladores de América (Schurr y Sherry, 2004). La posterior dispersión de estas primeras poblaciones hacia el sur del continente habría ocurrido hace por lo menos 13.000 años AP según dataciones por reloj molecular realizadas respecto al *cluster* D1 específico de Sudamérica (Forster *et al.*, 1996).

Los datos presentados en trabajos posteriores han sugerido que los pueblos originarios que viven hoy en día en América presentan los cinco haplogrupos mencionados (posteriormente denominados A2, B2, C1 y D1 y X2) y sus derivados (A2, A2a, A2b, C1b, C1c, C1d, C1d1), así como también seis linajes menores (C4c, D2a, D3, D4h3a, X2g y X2a) (Tamm *et al.*, 2007; Achilli *et al.*, 2008; Perego *et al.*, 2010). (Figura 2).

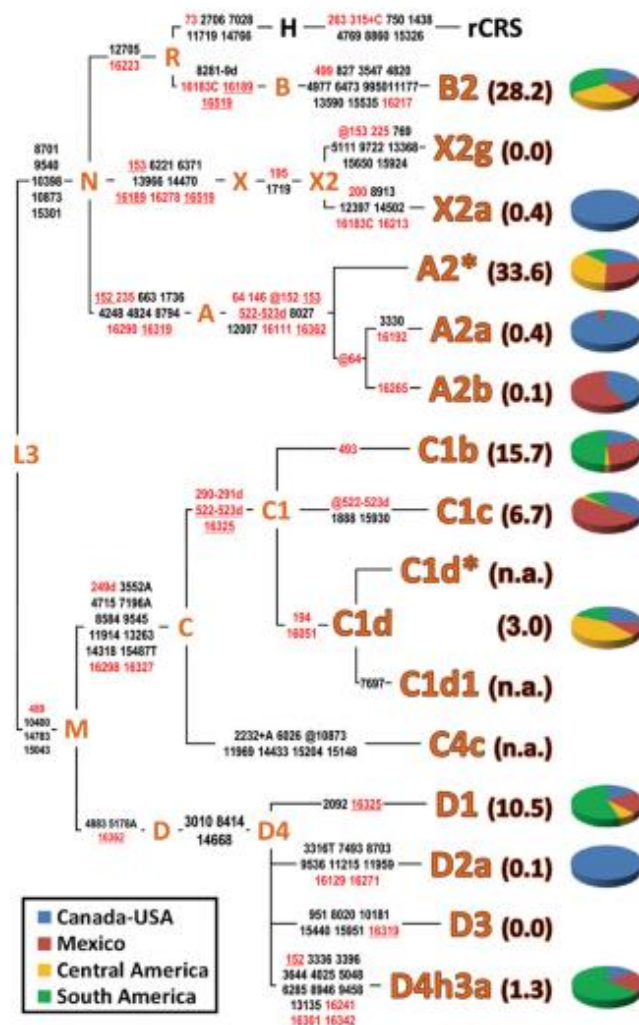


Figura 2. Frecuencias y orígenes de los haplogrupos correspondientes al ADNmt de indígenas americanos. (Imagen tomada de Perego *et al.*, 2010).

Estos trabajos se basan en genomas mitocondriales enteros, siendo uno de los primeros el realizado por Tamm y colegas (2007). Partiendo de datos arqueológicos (específicamente, que hay registro de una presencia humana en el noreste de Siberia hace 30.000 años, y en Sudamérica hace 15.000 años), los autores proponen dos escenarios posibles para el poblamiento de América. El primero plantea que los ancestros de las poblaciones americanas llegaron a Beringia antes del UMG y permanecieron allí, quedando aislados probablemente por barreras geográficas antes de poder ingresar a América cerca de hace 15.000 años AP. Este modelo recibe el nombre de Modelo de Incubación en Beringia (BIM por su sigla en inglés). El segundo escenario propone que los ancestros de los primeros americanos llegaron a Beringia recién hace 15.000 años AP y continuaron moviéndose hacia América. Este escenario de poblamiento no implica un período de aislamiento, y recibe el nombre de Modelo de Colonización Directa (DCM por su sigla en inglés). Este último modelo implicaría que los

haplotipos mitocondriales fundadores estarían presentes tanto en Asia como en América, ya que asume un movimiento continuo por parte de los pobladores que llegaron a Beringia. Por el contrario, el modelo BIM predice una amplia distribución de los haplotipos fundadores específicos de América, y ausentes en Asia. Los primeros pobladores habrían estado aislados en Beringia antes de entrar a América, permitiendo el surgimiento de nuevas mutaciones y por lo tanto de los haplotipos fundadores en Beringia. La variación del ADNmt en América podría indicar la velocidad a la cual los primeros pobladores se dispersaron por todo el continente. Si esta distribución fue rápida, se esperaría una distribución homogénea de los haplotipos fundadores a lo largo del continente. Sin embargo, si el movimiento fue gradual se deberían encontrar conjuntos de variaciones localizados en puntos específicos del continente (Tamm *et al.*, 2007). Como resultado de sus análisis, Tamm y colegas (2007) encontraron evidencia de la presencia de los cinco macrohaplogrupos fundadores (A-D y X) en las poblaciones indígenas americanas, las cuales habrían sido introducidas por nueve linajes fundadores. Debido a que ocho de estos linajes fueron encontrados distribuidos por América, se consideró más plausible la idea de una dispersión rápida por el continente. Por otro lado, se observó que los haplotipos americanos poseían unas pocas mutaciones que los diferenciaban de sus linajes originarios de Asia. El hecho de no encontrar estas mutaciones de los indígenas en Asia sería consistente con la hipótesis de que los primeros pobladores permanecieron aislados en Beringia en donde acumularon variaciones, como lo plantea el modelo BIM. Un dato interesante que proponen los autores es que, durante el período de aislamiento en Beringia, se habría originado el subhaplogrupo C1a el cual, al momento de la migración hacia América, retrocedió de vuelta a Asia. Posteriormente se produjeron migraciones tanto a América como a Siberia. Tras la migración inicial a América, en Beringia habría ocurrido una diversificación del haplogrupo D2, y en forma paralela el subhaplogrupo A2a habría migrado hacia Siberia, lo cual explicaría su presencia exclusiva en ese lugar (Tamm *et al.*, 2007).

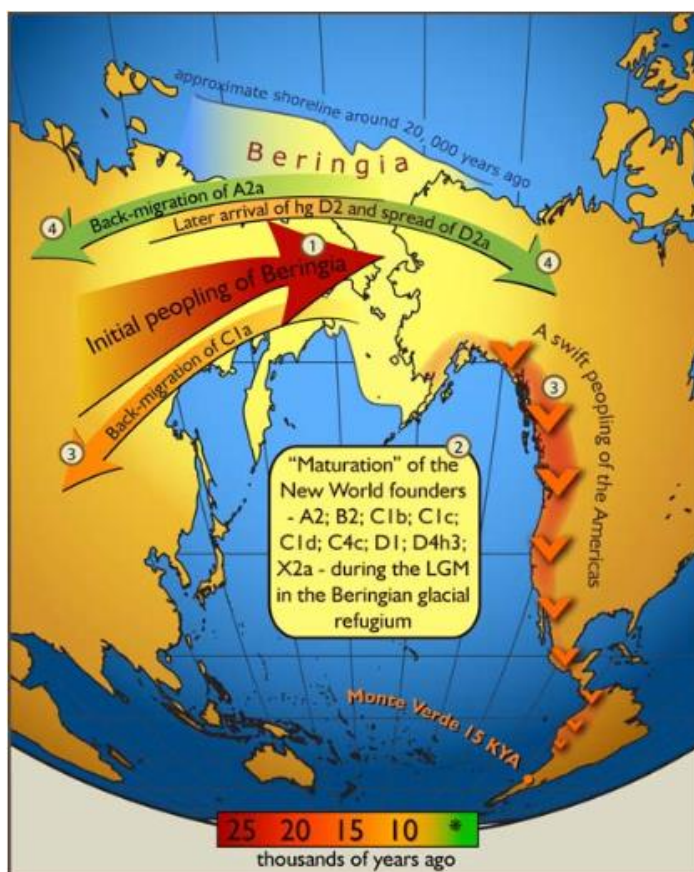


Figura 3. Esquema del flujo génico dentro y fuera de Beringia. (Imagen tomada de Tamm *et al.*, 2007).

Posteriormente al trabajo de Tamm y colaboradores (2007), surgieron otros cuyos datos brindaban apoyo el modelo BIM o a un origen único para los primeros americanos. Uno de estos trabajos es el realizado por Kitchen y colaboradores (2008), quienes a través de métodos bayesianos presentaron evidencias de que los primeros americanos estuvieron aislados de las poblaciones de Asia Central hace entre 30.000 y 17000 años AP, probablemente en Beringia. Durante ese período habrían experimentado un reducido o nulo crecimiento poblacional, y también habrían surgido nuevas mutaciones que los diferenciarían de las demás poblaciones de Asia. Seguidamente habrían sufrido un proceso de cuello de botella cuando ingresaron a América hace 17.000-16.000 años aproximadamente, lo cual fue continuado por una gran expansión en el continente alentados por la presencia de megafauna y ausencia de otros humanos (Kitchen *et al.*, 2008). Otro de los aportes al modelo BIM es presentado por Fagundes y colegas (2008). A través del análisis de secuencias de ADNmt de Norte y Sudamérica, observaron la presencia de mutaciones exclusivas de los indígenas las cuales los diferenciaban de los haplogrupos similares de Asia. Nuevamente estos hallazgos parecen ser consistentes con el modelo BIM. A partir de la

tasa de mutación observada, los autores estimaron que el período de aislamiento habría durado por lo menos 5000 años. Al igual que Kitchen y colegas (2008), los autores emplearon el método bayesiano para estimar que los pobladores habrían llegado a América alrededor de 18.000-15.000 años AP (Fagundes *et al.*, 2008). Un trabajo reciente realizado por Castro e Silva y colaboradores (2022), también destaca el modelo BIM como el más probable para el poblamiento del continente basado en la evidencia de los linajes tanto materno (ADNmt) como paterno (cromosoma Y). El período de aislamiento en Beringia habría durado entre 4600 y 15.000 años (Graf y Buvit, 2007 en Castro e Silva *et al.*, 2022). Si bien no hay un consenso de por qué ocurrió este evento de aislamiento, se ha propuesto que haya sido el resultado de la existencia de barreras ecológicas, o que Beringia haya funcionado como un refugio durante el UMG. Estos autores también apoyan la hipótesis de una dispersión desde el norte del continente hasta el sur, relativamente rápida usando el istmo de Panamá como punto de entrada y siguiendo las costas Pacífica y Atlántica (Castro e Silva *et al.*, 2022).

Los resultados de los trabajos mencionados son consistentes con el modelo de incubación en Beringia, así como también con la idea de que América fue poblada a partir de una única oleada, oponiéndose al modelo de múltiples oleadas. Un hecho a destacar es que los estudios de genomas mitocondriales completos difieren en las fechas que cada uno propone para el poblamiento, así como en las edades estimadas para los haplogrupos fundadores de América. Sin embargo, las fechas manejadas actualmente (entre 20.000 y 15.000 años AP) son más coherentes con los datos arqueológicos que las consideradas por los primeros estudios genéticos, las cuales iban de un rango de los 40.000 a los 20.000 años AP. Si bien el uso de las secuencias para datar eventos en la prehistoria humana puede ser una práctica cuestionable, su utilidad mejora cuando se considera que la tasa de mutación molecular observada puede no ser constante en el tiempo y con el uso de puntos de calibración adecuados (Kemp y Schurr, 2010).

2.4 Propuestas alternativas a partir del ADNmt

Una revisión de la literatura científica evidencia que, si bien el modelo tradicional de poblamiento americano implica una única y rápida migración conteniendo todos los haplogrupos fundadores a través del puente terrestre de Beringia, hay autores con posturas distintas. Un ejemplo de esto es el trabajo planteado por Schurr y Sherry

(2004), quienes propusieron una entrada por la costa pacífica desde Siberia y hacia Sudamérica hace entre 20.000 y 15.000 años AP. En esta migración estarían contenidos los haplogrupos A-D. Seguido a esta primera entrada, y una vez que apareció el corredor libre de hielo, se habría dado una segunda migración la cual introduciría al haplogrupo X en Norteamérica (Schurr y Sherry, 2004). Más recientemente surgió otra propuesta que intenta explicar la distribución del haplogrupo X2a, realizada por Oppenheimer y colegas (2014). Su modelo discute el punto de entrada del mencionado haplogrupo al continente americano, proponiendo que no habría sido por Siberia, sino por el suroeste de Europa. Esta idea, denominada *Hipótesis Solutrense*, utiliza datos arqueológicos y genéticos, planteando que son consistentes con una ruta atlántica. Centrándonos en los aportes de la genética, los autores se van a basar en la distribución del haplogrupo X2a para plantear que sería más parsimonioso considerar una entrada por el oeste de Eurasia durante el Pleistoceno por parte de pobladores con una industria Solutrense. Los autores van a basar su hipótesis en dos principales hechos. Por un lado, plantean que el linaje ancestral de X2a no ha sido hallado en Siberia, como sí ocurre para los demás haplogrupos de América. En segundo lugar, la distribución filogeográfica de X2a en Norteamérica indica que los puntos de ancestría más antiguos se ubican en el noreste de Canadá, siendo consistente con un ingreso transatlántico al continente americano, lo cual también es sugerido por la evidencia arqueológica (Oppenheimer *et al.*, 2014). Este modelo de la hipótesis Solutrense recibió numerosas críticas, siendo una de las más recientes la correspondiente a Raff y Bolnick (2015). En su trabajo se propone que el hecho de no haber hallado ancestros del haplogrupo X2a en Siberia, no es evidencia suficiente para sugerir que la hipótesis Solutrense es la explicación más plausible para la presencia del mencionado haplogrupo en la región de los Grandes Lagos. Si bien el ancestro de X2a pudo haber surgido y evolucionado en el oeste de Eurasia, caracterizarlo como un haplogrupo del oeste euroasiático no sería adecuado ya que X2a es hallado únicamente en individuos con una ancestría indígena norteamericana (Raff & Bolnick, 2015). Por otro lado, los autores también discuten que el punto de ancestría más antiguo para X2a se encuentre en Canadá. Para esto mencionan los hallazgos realizados por Rasmussen y colegas (2015), quienes ubican al punto de mayor antigüedad para X2a en el noroeste del Pacífico, descartando un origen Solutrense (Raff & Bolnick, 2015).

Más allá de las diversas hipótesis de ingreso al continente, está claro que una vez en América, los pobladores experimentaron un proceso de adaptación a la amplia diversidad ambiental del nuevo territorio. Posteriormente, en el Holoceno tardío, nuevas

prácticas como la agricultura intensiva, el sedentarismo y eventos como el cambio climático, causaron grandes cambios en las diversidades genéticas y culturales a lo largo de todo el continente. Finalmente, a fines del siglo XV la colonización europea terminó de modificar estos rasgos a través de procesos como las matanzas de indígenas y con mestizajes entre ambas poblaciones (Castro e Silva *et al.*, 2022). A esto se le debe sumar el ingreso a la región de personas esclavizadas provenientes de poblaciones africanas para trabajar principalmente en la producción agrícola (Sans y Avena, 2019), generando procesos adicionales de mestizaje. Estos eventos derivaron en las características genéticas observadas en la actualidad, propias de una población trihíbrida.

2.5 ADN antiguo: ventajas y complicaciones

Los análisis genéticos han contribuido notoriamente a la comprensión de los procesos evolutivos en general, y al desarrollo de nuestra propia especie en particular, así como a las afinidades poblacionales (Yang y Watt, 2005). Dentro de un marco bioantropológico, los estudios de ADN han ampliado las posibilidades de investigación interdisciplinaria, integrando datos genéticos con contextos arqueológicos y antropológicos para reconstruir narrativas más completas sobre las dinámicas poblacionales a lo largo del tiempo. Un aporte fundamental de los análisis de ADN antiguo es que permiten a los investigadores estudiar las relaciones genéticas entre organismos extintos y sus contemporáneos, a diferencia de los análisis con ADN moderno los cuales únicamente proveen una evidencia indirecta de los procesos evolutivos que se han dado a lo largo del tiempo (Hofreiter *et al.*, 2001). En particular, los trabajos con ADNmt antiguo se han venido usando cada vez con mayor frecuencia debido a sus extensas aplicaciones, abarcando desde análisis de rutas migratorias (por ejemplo, el poblamiento de América), hasta estudios más concretos a nivel intrasitio, aportando datos respecto a las dinámicas culturales de un determinado grupo (ver, por ejemplo, Figueiro *et al.* 2017). Conjuntamente, se deben mencionar las aplicaciones del ADNmt antiguo como complemento de los análisis bioarqueológicos en aquellos casos donde los restos óseos se encuentran mezclados. En estas situaciones, las similitudes a nivel de secuencias pueden funcionar como herramienta para ayudar a determinar el número mínimo de individuos (NMI) presentes en la muestra de estudio.

Sin embargo, al trabajar con ADN antiguo, ya sea nuclear o mitocondrial, hay dos principales obstáculos a superar: la degradación de la molécula la cual limita la cantidad de material disponible para amplificar, y la contaminación presente que puede incluir

inhibidores orgánicos de la técnica de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La degradación de los ácidos nucleicos ocurre de forma gradual a lo largo del tiempo como consecuencia de procesos tales como la hidrólisis y oxidación. La primera produce la fragmentación del enlace entre la azúcar y la base nitrogenada en presencia del agua, mientras que la segunda genera la modificación de las bases o de la hélice por la presencia de un grupo OH. Este segundo proceso es el que más afecta a las mitocondrias ya que estos organelos son los encargados del metabolismo del oxígeno. Se estima que las pirimidinas (T y C) oxidadas son las que van a causar el principal daño al ADN, ya que su presencia se correlaciona negativamente con el éxito en la extracción y amplificación debido a que, probablemente, bloqueen la etapa de extensión de la molécula durante la PCR (O'Rourke *et al.*, 2000). Si bien estos eventos ocurren en vida, son controlados por procesos de reparación, pero una vez fallecido el organismo, estos y otros procesos degradativos se continúan acumulando. Es decir que, al trabajar con fragmentos de ADN antiguo, generalmente se cuenta con un bajo número de moléculas endógenas, de pequeño tamaño y químicamente alteradas. Estas características las hace muy propensas a la contaminación de distintas fuentes, ya sea de ADN provenientes del sedimento donde se encontraba la muestra, o ADN humano moderno por parte de los investigadores, especialmente si se la manipuló sin considerar la realización de futuros análisis genéticos, algo común en muestras alojadas en museos (Knapp *et al.*, 2012). Este alto riesgo de contaminación genera que sea muy fácil la obtención de falsos positivos en tareas de extracción y amplificación. Por esta razón, las medidas de precaución se deben tomar desde el momento de recolección y preparación de la muestra.

La alta degradación química y física del ADN mencionada previamente, genera que haya muy bajas cantidades de esta molécula, preservada en malas condiciones, lo cual dificulta los análisis que se puedan realizar. La técnica de la PCR es especialmente útil para estos casos ya que, teóricamente, una única molécula de ADN antiguo es suficiente para generar miles de copias. Sin embargo, la alta sensibilidad de esta herramienta, la hace propensa a que amplifique ADN contaminante si hay bajas cantidades del ADN antiguo, generando un falso positivo. Si bien este riesgo está presente al amplificar tanto ADN antiguo como moderno, en el último caso, la cantidad de moléculas a amplificar suelen superar en número a las moléculas de ADN contaminante, por lo tanto, la contaminación tiene un muy bajo impacto en los análisis modernos. Sin embargo, en el caso de trabajar con ADN antiguo, el número de estas moléculas suele ser extremadamente bajo frente a las contaminantes si no se tomaron las precauciones adecuadas. Es necesario aclarar que cuando se habla de *ADN*

contaminante, se está haciendo mención del ADN que es idéntico o similar al ADN antiguo que se quiere analizar, y, por lo tanto, es amplificado por la PCR. Por ende, no se considera contaminantes genomas provenientes de bacterias u hongos, por ejemplo, pero sí lo es el proveniente de los investigadores que manipulan la muestra (Knapp *et al.*, 2012; Pilli *et al.*, 2013).

Dentro del laboratorio las medidas de cuidado deben ser extremas debido a la manipulación de diversas muestras. Si bien, este tipo de riesgo no es considerable ya que, como se mencionó, el número de moléculas de ADN antiguo es muy reducido, igualmente conviene tomar estrictas medidas de precaución. Una de las formas es evitar que la posible contaminación que se encuentre en la superficie de la pieza a analizar pase a otra pieza de la muestra. Sin embargo, el principal riesgo de contaminación proviene de los productos de PCR de amplificaciones previas. La prevención de este tipo de riesgo implica tener un laboratorio de uso exclusivo para análisis con ADN antiguo donde las tareas se realicen cuidadosamente (Knapp *et al.*, 2012; Yang y Watt, 2004). Idealmente estos laboratorios deberían cumplir ciertos requisitos tales como:

- ✓ Realizar los procesos de extracción y amplificación en habitaciones separadas.
- ✓ Contar con presión positiva y filtros de aire.
- ✓ Irradiación con luz UV de todos los equipos e instalaciones para destruir posibles residuos de ADN que queden en las superficies.
- ✓ Uso de trajes protectores, guantes y mascarar faciales por parte de los investigadores.

La contaminación solo puede ser descartada cuando las secuencias obtenidas son lo suficientemente distintas a las del ADN moderno. En este sentido, la región hipervariable I del ADNmt es de gran ventaja ya que permite discriminar entre contaminantes por su alta variabilidad (Pilli *et al.*, 2013).

2.6 Aplicaciones del ADNmt antiguo a nivel regional

Hasta este punto se ha demostrado como los análisis de ADNmt ayudan a reconstruir procesos de poblamiento a nivel continental, como es el caso del poblamiento de América. Sin embargo, los estudios del ADNmt también son de gran utilidad a la hora de distinguir procesos microevolutivos a nivel regional e incluso local. En el caso de Sudamérica, las regiones que más se han estudiado son el sur de Brasil, Andes centrales, la Patagonia, noroeste y centro de Argentina. De estos estudios se

desprende que los procesos evolutivos mayormente involucrados en la estructuración genética son la deriva y el flujo génico (De la Fuente y Figueiro, 2024). A continuación, se presenta un resumen de los estudios realizados en cada una de estas regiones, con especial énfasis en el Cono Sur sudamericano.

Una de las regiones que más se han estudiado son los Andes centrales ya que han sido el área de origen de diversas manifestaciones culturales previas a la llegada de los españoles, tales como el imperio Inca. La mayoría de las investigaciones se han realizado sobre individuos provenientes del actual Perú. Una de ellas es la realizada por Nakatsuka *et al.* (2020), señalando que en los acervos genéticos locales se han registrado todos los haplogrupos comunes a Sudamérica (A2, B2a, B2b, C1b, C1c, D1 y D4h3a), indicando un probable gran tamaño de las poblaciones de los Andes centrales a lo largo del tiempo (Nakatsuka *et al.*, 2020).

Por su lado, la costa atlántica de Brasil empezó a ser estudiada recientemente, destacándose el trabajo realizado por Ferraz y colegas (2023). Los autores se enfocaron en las poblaciones sambaquí (constructores de concheros) del sur de este país para conocer la composición genética de estos grupos y sus vínculos con otras poblaciones del interior, y con las poblaciones actuales de Brasil. Los resultados obtenidos mostraron una mayor variación genética entre los individuos sambaquíes que al compararlos con otros individuos del Holoceno temprano de Sudamérica. Adicionalmente, dentro de estas poblaciones se registraron diferencias entre los grupos costeros del sur y sudeste. Este último punto difiere con las similitudes a nivel cultural registradas entre ambos grupos, lo cual podría interpretarse como contactos e intercambio, pero con un flujo génico reducido (Ferraz *et al.*, 2023).

Argentina ha sido una de las que ha generado mayor densidad de datos respecto a ADN mitocondrial. Los diversos trabajos realizados para el noroeste del país han señalado una alta tasa de flujo génico con otras poblaciones cercanas del centro-sur de los Andes, así como con el Chaco. En consecuencia, se observa que las poblaciones actuales y antiguas presentan una composición genética distinta, derivado de las migraciones generadas por el imperio Inca (Russo *et al.*, 2018). El centro de Argentina también presenta cambios en la frecuencia de haplogrupos a lo largo del tiempo, así como una diferenciación en la estructura poblacional entre las sierras y las llanuras. Sin embargo, en un trabajo más reciente, si bien se confirmaron las diferencias geográficas, no se observaron los cambios a lo largo del tiempo (Nores *et al.*, 2022). En otro estudio actual de García y colegas (2021), se constató la presencia de algunos linajes antiguos en poblaciones modernas, mientras que otros habrían desaparecido con el ingreso de nuevos linajes.

Hacia el sur del continente se encuentran la Pampa argentina y en el extremo más austral, la Patagonia, la cual fue la última región en ser habitada debido a su clima inhóspito y su lejanía geográfica (De la Fuente y Figueiro, 2024). En el caso de la Pampa, ha sido recientemente incluida en los estudios mitocondriales con el trabajo de Roco-Rada y colegas (2021), quienes observan una similitud en la variación mitogenómica con el centro de Argentina y diferencias notorias con la Patagonia y Tierra del Fuego. Posteriormente, Motti *et al.*, (2023) confirman estas similitudes con el centro del país, así como las diferencias con la Patagonia, noreste de Argentina y Uruguay. Estas diferencias a nivel genético contrastan con las similitudes arqueológicas observadas. Conjuntamente, los autores hallaron evidencias de una continuidad genética en la región desde el Holoceno medio (Motti *et al.*, 2023). Por otro lado, los análisis mitocondriales para la Patagonia han mostrado una reducida variabilidad genética (ausencia de los haplogrupos fundadores A y B) al compararla con otras regiones de Sudamérica, lo cual es coherente con la baja densidad poblacional de la Patagonia. A nivel genómico, los análisis de los genomas más antiguos (6600-4700 años AP) estarían indicando una continuidad genética (Moreno-Mayar *et al.*, 2018), así como una diferenciación genética entre grupos costeros y del interior del continente desde hace al menos 4700 años AP. A su vez, la evidencia estaría señalando un flujo génico con grupos cercanos, destacando a los de Tierra del Fuego (Nakatsuka *et al.*, 2020).

2.7 Aplicaciones del ADNmt en Uruguay

El trabajo con ADN mitocondrial en el Uruguay no puede separarse de los estudios sobre la magnitud y continuidad del aporte genético indígena en la población uruguaya. Uno de los primeros trabajos corresponde a Sans y colegas (1986) el cual evidenció un gran aporte poblacional de origen no europeo. Este resultado impulsó en la década de los 90 varios análisis interesados en la composición genética de la población uruguaya, especialmente en el aporte indígena (Sans y Avena, 2017). Por ejemplo, en 1997, Sans y colegas realizaron el primer estudio cuantitativo del mestizaje en dos poblaciones de Uruguay (Montevideo y Tacuarembó) a través del análisis de marcadores clásicos polimórficos (Sans *et al.*, 1997).

Los análisis posteriores, con un enfoque poblacional, han sido fundamentales para reconstruir la historia de los primeros grupos que habitaron en el país y derribar

mitos sobre la población uruguaya. Tradicionalmente, se ha considerado a Uruguay como de ascendencia europea con bajos aportes de poblaciones africanas. Esto responde a que los grupos nativos que se encontraban en el territorio al momento de la conquista española habrían desaparecido con los genocidios realizados hasta el siglo XIX (Sans *et al.*, 2012). Sin embargo, los estudios genéticos desmienten esta creencia al evidenciar que en la población actual se encuentra un alto aporte de grupos indígenas, incluso superior al aporte de grupos africanos. Esto se ha comprobado en varios estudios donde se trabajan con muestras actuales de los departamentos de Tacuarembó (Bonilla *et al.*, 2004), Montevideo (Gascue *et al.*, 2005), Cerro Largo (Sans *et al.*, 2006) y Flores (Sans *et al.*, 2011), observando un aporte a nivel mitocondrial de poblaciones africanas (7,6%), indígena (36,7%) y europea (55,7%) (Bonilla *et al.*, 2015).

Un trabajo reciente de Figueiro *et al.* (2022), se propuso analizar por secuenciación masiva 32 mitogenomas completos de habitantes actuales de Uruguay. Previamente, se determinó que estos individuos se correspondan con los cuatro haplogrupos fundadores de América. Como resultado de los análisis realizados, los autores pudieron identificar siete nuevos subhaplogrupos para la región: A2be, A2bf, B2an, C1d1h, C1b30, C1b31 y D1x. Estos linajes se suman a los ya observados para el territorio uruguayo, C1d3 (Sans *et al.*, 2015) y C1b15 (Figueiro *et al.*, 2017). Estos nuevos datos son fundamentales ya que los subhaplogrupos regionales o locales permiten estimar con mayor precisión el lugar de origen de los haplogrupos así como también recrear las rutas migratorias realizadas durante el poblamiento americano (Figueiro *et al.*, 2022). De los siete haplogrupos mencionados, cuatro de ellos están bien definidos por mutaciones puntuales, presentes en al menos tres individuos. Se trata de A2be, representado por secuencias del norte de Argentina y Uruguay, datado en 7532 años; B2an, presente en Uruguay, Brasil y Argentina, con una edad estimada de 9.699 años; C1b30, registrado en Uruguay, Paraguay y Argentina, con un posible origen en el Holoceno temprano, hace 10.610 años; y, por último, D1x con una dispersión por Brasil, Uruguay y Paraguay, con una datación estimada de 4.554 años (Figueiro *et al.*, 2022).

Varias de las secuencias analizadas parecerían estar sugiriendo la presencia de poblaciones restringidas al territorio uruguayo con baja movilidad. Evidencia de esto sería la antigüedad de los subhaplogrupos, donde algunos incluso superan los 10.000 años (Figueiro *et al.*, 2022). Esta baja movilidad también parece estar indicada por la presencia de otro subhaplogrupo, C1d3, el cual se ha registrado en individuos tanto antiguos como modernos de Uruguay (Sans *et al.*, 2010, 2012 y 2015).

El estudio de Bertoni y colegas (2004) fue el primero en analizar las poblaciones antiguas de Uruguay a partir de fragmentos cortos de la región hipervariable I del ADN

mitocondrial de cinco individuos provenientes de estructuras monticulares (“cerritos de indios”). Como resultado obtuvieron que tres de ellos pertenecían al haplogrupo C, uno al haplogrupo B y uno no pudo ser determinado. Adicionalmente se observó que dos individuos con el haplogrupo C compartían una transición en la posición nucleotídica 16288C (Bertoni *et al.*, 2004). Si bien inicialmente esta mutación no fue considerada relevante, cobró importancia cuando en trabajos posteriores se demostró que uno de los últimos caciques charrúas, Vaimaca Perú, también poseía dicha mutación vinculada al haplogrupo C1 (Sans *et al.*, 2010). Observando en detalle la composición de este haplogrupo, se pudo registrar, además de las típicas mutaciones características del haplogrupo C (16223T, 16298C, 16325C y 16327T) en la HVRI, otra mutación que define al subhaplogrupo C1d (16051G) y la 16288C. Esta última mutación, junto con las otras cinco, también fueron registradas en dos individuos prehistóricos provenientes de los cerritos del Este, con una datación de 1610 ±90 años AP. Conjuntamente, se las observaron en individuos contemporáneos de Uruguay (Sans *et al.*, 2010). A partir del estudio de los genomas completos de individuos uruguayos modernos, por un lado, y la HVRI de individuos prehistóricos (incluyendo al cacique Vaimaca Perú), históricos y contemporáneos por otro, se observó un nuevo linaje perteneciente al haplogrupo C, definido como C1d3, el cual se habría originado en tiempos prehistóricos y se mantendría hasta la actualidad. Se estima que el ancestro común más reciente para este subhaplogrupo tendría una edad de 8.974 años (Sans *et al.*, 2012, 2015). Un dato para destacar es que, con una excepción puntual (García *et al.*, 2018), ninguna de las mutaciones que definen a este linaje se han encontrado afuera de Uruguay, sugiriendo que la evolución de C1d3 habría ocurrido en el país. Por lo tanto, si bien se ha creído que hasta los 7000 años AP los habitantes del territorio uruguayo correspondían a grupos con una alta movilidad, la aparente restricción del subhaplogrupo C1d3 estaría indicando lo contrario (Sans *et al.*, 2015). En este sentido, la evidencia arqueológica, ha sugerido que para fines del Holoceno la movilidad de los grupos del este del territorio estaría disminuyendo. Incluso se ha propuesto que los cerritos de esa zona podrían funcionar como marcadores territoriales (López Mazz, 2001).

Como es de esperar, no todos los linajes prehistóricos presentan continuidad en la población actual. Figueiro y colegas (2017) analizaron los mitogenomas de dos individuos femeninos enterrados en el sitio Isla Larga en Rocha, Uruguay. Los resultados mostraron que ambos sujetos poseían el haplogrupo C1b, compartiendo las mutaciones 185A, 3116T, 3203T, 14397G y 14502C. Es especialmente interesante la presencia de la mutación 185A ya que estaría indicando la presencia de un nuevo linaje dentro del haplogrupo C1b, denominado C1b15, designado como un linaje separado a partir de las

otras cuatro mutaciones mencionadas de la región codificante (Figueiro *et al.*, 2017). Considerando la hipótesis del uso de estos montículos como marcadores territoriales, los datos genéticos permiten discutir la idea de que se trate de lugares para inhumaciones de individuos con un vínculo sanguíneo por vía materna, considerando la corta distancia temporal entre ambos individuos (200 años aproximadamente) (Figueiro *et al.*, 2017).

La mayor parte de los análisis de ADN antiguo en Uruguay tuvieron como objetivo el estudio de restos óseos provenientes del este del país. Recientemente, en un trabajo realizado por Anza (2023) se analizaron 17 muestras provenientes del sitio arqueológico Colonia Concordia, y una de Campo Morgan, ambos sitios ubicados en el oeste del país. Debido al estado de baja preservación del material genético, únicamente se lograron extraer e identificar dos secuencias. A través de las amplificaciones de las regiones hipervariables I y II del genoma mitocondrial, se logró adjudicar una secuencia al haplogrupo A2 y otra al subhaplogrupo C1d; a esto se agregan dos mitogenomas secuenciados en Copenhague, pertenecientes subhaplogrupo C1b. A partir de estudios comparativos con la región, se destacan dos puntos. En primer lugar, se observó una similitud de estos individuos con secuencias provenientes únicamente de Argentina, descartando similitudes con Brasil. En segundo lugar, las secuencias analizadas representan linajes propios que no se han hallado en otras poblaciones antiguas o modernas.

En resumen, se destaca la gran cantidad de trabajos enfocados en el análisis de muestras provenientes del este de Uruguay, particularmente de los montículos de tierra, y muy pocos concentrados en el oeste. Esta asimetría puede responder, en parte, a los contextos de recuperación existentes para ambas regiones. En el oeste, la mayoría de los restos proceden de recuperaciones poco sistemáticas, limitando las asociaciones que se puedan hacer con elementos del contexto (Figueiro, 2013). La situación es muy distinta para el este, donde los trabajos de excavación fueron realizados de forma sistemática, con un contexto y estratigrafía adecuados. Si bien los estudios comparativos han mostrado algunas diferencias en frecuencias de haplogrupos, generalmente los tamaños muestrales son muy pequeños para realizar inferencias a nivel poblacionales (Figueiro, 2013). En general, se puede sugerir que tanto en el este como en el oeste del país hay una continuidad poblacional con el componente indígena

de Uruguay. Incluso se ha observado una diferenciación entre las poblaciones de ambas regiones en los últimos 2500 años (Anza, 2023; Figueiro, 2013).

Una región poco abordada a nivel de ADNmt antiguo es el sur del país, concretamente, las costas del Río de la Plata. La inclusión de esta región permitiría obtener un panorama más completo de las poblaciones prehistóricas a nivel nacional. En la presente tesis se plantea incluir en los análisis mitocondriales a individuos provenientes de sitios arqueológicos costeros del sur del país, a modo de contribuir a cubrir la falta de datos para el área comprendida entre el litoral atlántico y el litoral del Río Uruguay. Para esto se trabajó con muestras provenientes de los departamentos de Rocha, Maldonado y San José. A su vez, los estudios implicaron el análisis de las regiones hipervariables I y II. De esta forma se espera aumentar la resolución para distinguir entre linajes compartidos entre las regiones en épocas prehistóricas (Figueiro, 2013).

3. Objetivo e hipótesis

3.1 Objetivo general

Aportar datos para conocer la composición genética de las poblaciones antiguas del Uruguay y sus interacciones a través del análisis del ADN mitocondrial de restos óseos humanos provenientes de sitios de costas del Río de la Plata y el litoral Atlántico.

3.2 Objetivos específicos

- 1) Obtener secuencias de las regiones hipervariables I y II del ADN mitocondrial de individuos prehispánicos provenientes de sitios de las costas del Río de la Plata y el litoral Atlántico.
- 2) Determinar los haplogrupos y haplotipos presentes en estas regiones, y su comparación entre sí y con otras poblaciones de América del Sur.
- 3) Comparar los datos genéticos generados con los datos arqueológicos y contrastar propuestas de dinámicas poblacionales planteadas a partir del registro arqueológico.
- 4) A partir de los haplotipos obtenidos en las muestras de cada sitio, determinar el número mínimo de individuos representado.

3.3 Preguntas que se plantea responder esta investigación

¿Existió algún nivel de contacto entre las poblaciones prehistóricas de Uruguay?

¿Se pueden estimar vínculos de parentesco por línea materna entre individuos de un mismo sitio o entre sitios?

¿Los datos genéticos serían sugerentes de contactos con otras poblaciones prehistóricas de la región?

¿Qué información brinda el dato genético con respecto a número de individuos presentes?

3.4 Hipótesis

Se plantea como hipótesis de trabajo que se hallará principalmente el haplogrupo fundador indígena C1 en las muestras aquí estudiadas, ya que este ha demostrado tener predominancia entre las poblaciones prehistóricas del Uruguay. Por otro lado, debido a la proximidad geográfica (y, por lo tanto, mayor probabilidad de flujo génico), se espera encontrar variantes en común con el este de Argentina y el sur de Brasil.

4. Materiales y métodos

4.1 Descripción de los sitios

En este trabajo se analizaron restos óseos humanos provenientes de tres sitios arqueológicos ubicados en las costas del Río de la Plata y el bañado de India Muerta. Los sitios se localizan en Maldonado (Punta del Este), Rocha (La Viuda) y San José (Arazatí) (Figura 4).

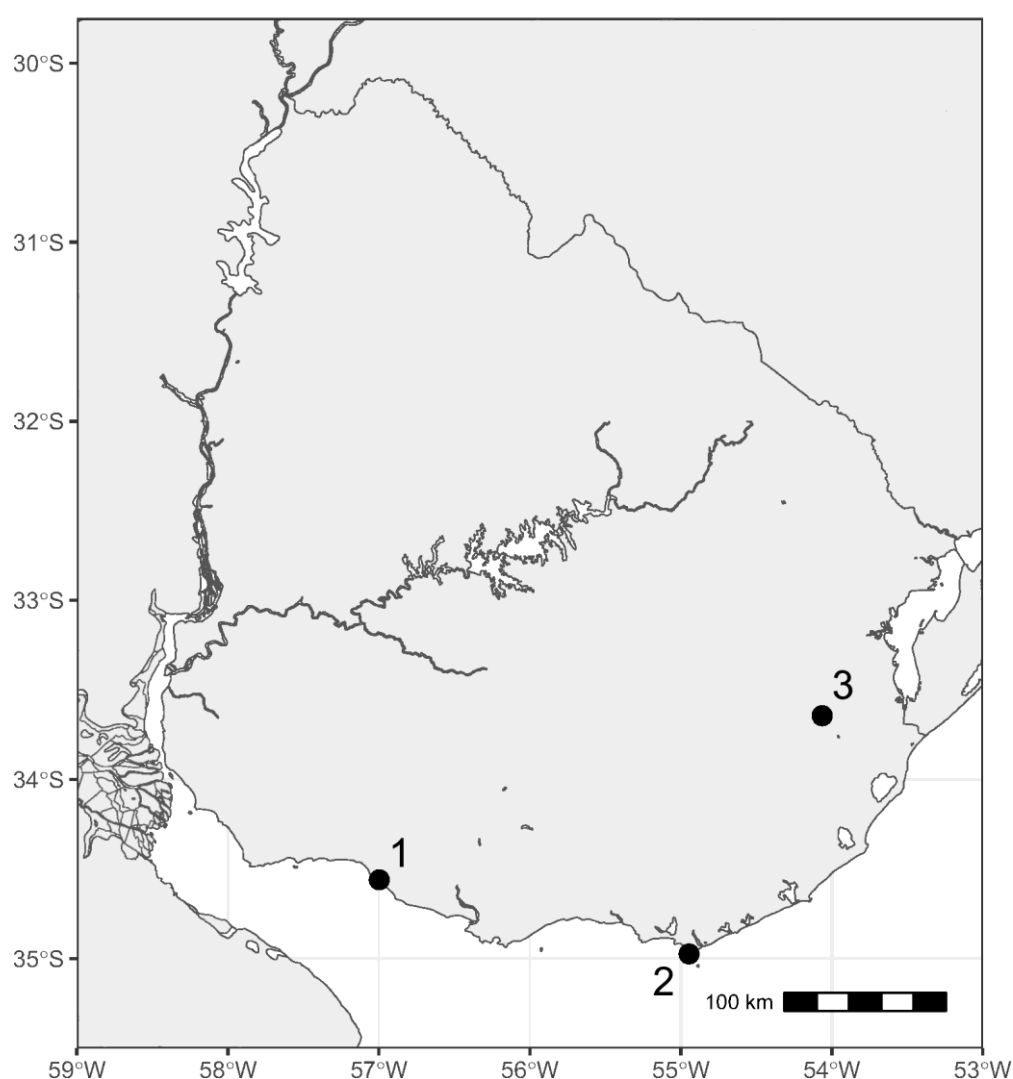


Figura 4. Ubicación de los tres sitios de donde provienen las muestras. 1: San José (sitio Arazatí), 2: Maldonado (Punta del Este), 3: Rocha (sitio La Viuda).

Actualmente las muestras forman parte de los acervos del Museo Histórico Nacional, y de la Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación. En el primer caso se tuvo que enfrentar ciertos problemas propios del trabajo con colecciones, ya que la falta de contexto es recurrente, lo que implica un desconocimiento de los ambientes depositacionales en los cuales se hallaron los restos (Gordón, 2009). También son escasos los datos correspondientes a las características de las inhumaciones, incluyendo a veces el número de individuos recuperados. A eso se le debe agregar las recuperaciones parciales, ya que se privilegiaban los cráneos y se dejaban de lado muchos elementos correspondientes al poscráneo; también se consideraba que los restos de subadultos no aportaban información, limitándose su recuperación (Mazza, 2015). Por otro lado, se debe tener presente las prácticas de almacenamiento de las muestras. Al momento que las colecciones ingresaban a una institución, los cráneos eran desasociados de los poscráneos, y a su vez, los restos poscraneales se desasociaban entre sí haciendo casi imposible la reconstrucción posterior de los esqueletos (Mazza, 2015). A pesar de todas las limitaciones mencionadas, es posible obtener datos sobre las características de los individuos presentes. Una ventaja que presentan las colecciones museísticas es su carácter dinámico y su rol constante a lo largo del tiempo, ya que a medida que se generan nuevas técnicas, como fechados radiocarbónicos, análisis isotópicos, análisis genéticos o análisis morfométricos, éstas se pueden aplicar a las muestras para obtener nuevos datos (Del Papa, 2010).

4.1.1 La cuenca del Arroyo Maldonado

Los trabajos en el área costera de la cuenca del Arroyo Maldonado, al sureste de Uruguay, comenzaron con el aporte de aficionados a la arqueología quienes generaron grandes colecciones de materiales arqueológicos, las cuales actualmente forman parte del acervo de los museos nacionales y departamentales. En este período, previo al desarrollo de la arqueología científica en Uruguay, la selección del material a recolectar dependía de características estilísticas y exóticas (Caporale y Baeza, 2014).

El registro bioarqueológico para la región incluyen varios restos óseos humanos, recuperados a inicios del siglo XX a través de excavaciones asistemáticas. Proviene, principalmente, de contextos arenosos formados por dunas. Según la descripción realizada por el autor que excavó los sitios, los esqueletos se encontraban desarticulados e incompletos, incluyendo enterramientos de huesos aislados (Seijo, 1923, 1930). Los ajueres funerarios serían escasos, formados por restos de fauna

marina y elementos líticos (Maeso, 1977), destacándose el caso de un cráneo infantil acompañado de un collar hecho de valvas de molusco (Seijo, 1930).

Actualmente el registro bioarqueológico para Maldonado está formado por restos craneales y algunos huesos largos de miembros superiores e inferiores, en estado de preservación variado, pudiendo estar enteros, fragmentados (en algunos casos pegados con yeso o masilla) o incompletos. Se destaca una total ausencia de elementos correspondientes al esqueleto axial, coxales y huesos de pies y manos, con un notado subregistro de individuos femeninos y subadultos. Dos de los cráneos, uno correspondientes a un individuo adulto y otro a un juvenil, pudieron ser recientemente datados (G. Figueiro, com. pers.).

Parte de estos elementos fueron analizados por Sans (1988). En su trabajo “Las Poblaciones Prehistóricas del Uruguay”, estudia cuatro cráneos, incluyendo el perteneciente al niño citado por Seijo (1930). Constata una serie de diferencias biológicas (presencia de patologías orales tales como caries, abrasión dental y agenesia del tercer molar) entre la muestra de Punta del Este y del resto de las poblaciones estudiadas, lo cual explica como coherente con otras diferencias arqueológicas de la misma (Sans, 1988).

Otros autores que también trabajan con el registro bioarqueológico de la colección Seijo son Bracco y colegas, (2000). Empleando isótopos estables, plantean para las poblaciones del este una dieta a base de recursos abundantes en ambientes continentales con muy baja incidencia del maíz, pero los individuos de Punta del Este tendrían un consumo de recursos marinos (Bracco, *et al.*, 2000).

4.1.2 El sitio arqueológico “La Viuda”

Este sitio se ubica geográficamente en el Bañado de India Muerta, en el departamento de Rocha. Se caracteriza por estar formado por tres montículos de tierra, siendo uno de ellos (denominado montículo A) el de mayor tamaño y antigüedad de las tierras bajas del sudeste de Uruguay (López Mazz *et al.*, 2022). Los montículos de tierra son una manifestación antrópica recurrente a lo largo del continente americano, con dimensiones, morfología y funcionalidades variadas (López Mazz *et al.*, 2004). Tanto en la mitad Este de Uruguay como en Río Grande del Sur (Brasil), los túmulos aparecen asociados a tierras bajas inundables. Estos ambientes contienen una amplia disponibilidad de recursos vegetales y animales, lo cual ofreció varias alternativas de consumo a los pobladores de la región (Gianotti, 2015). Los montículos parecen evidenciar procesos socioculturales complejos desde hace más de 5.000 años AP hasta el siglo XVII. En general, tienen una dimensión de entre 30 y 40 metros de diámetro, con

una altura variable llegando a los 7 metros, y se pueden presentar de forma aislada o en conjunto. Según el registro arqueológico, las poblaciones relacionadas a los túmulos se corresponderían a grupos cazadores-recolectores-pescadores con presencia de horticultura. La función de los montículos ha sido ampliamente discutida, proponiendo funciones de habitación, ritual o monumental (López Mazz *et al*, 2004). En su interior es frecuente encontrar enterramientos humanos de ambos sexos, diversos grupos etarios y en modalidades variadas que incluyen enterramientos primarios, secundarios, “en paquete” o parciales.

Los montículos que forman la localidad arqueológica de La Viuda han sido analizados a través de estudios exploratorios, con recolección superficial de restos óseos humanos y muestras sedimentarias que han permitido datar el sitio entre 5420 y 2700 años radiocarbónicos AP. El montículo A sobresale entre los otros dos debido a su altura de 7,32m y su datación de 5400 años AP, siendo el más alto y antiguo de los tres. Este fechado ha llevado a plantear la hipótesis de que La Viuda esté asociado a los pueblos que iniciaron la tradición cultural de construcción de cerritos. La estratigrafía de la base del montículo A indica un período de ocupación doméstica entre 3600 y 3800 años AP. Esta ocupación habría sido intensa, derivando en una amplia y rápida acumulación de sedimentos y material arqueológico. El proceso de crecimiento del montículo parece consistente con una mecánica mixta de ocupación y abandono del sitio. Debido a que se trata de zonas bajas mal drenadas, los momentos de abandono pueden estar vinculados a inundaciones estacionales (López Mazz *et al.*, 2022).

4.1.3 El sitio Arazatí

El sitio arqueológico Arazatí se encuentra ubicado en el departamento de San José, a orillas del Río de la Plata. Esta localidad fue abordada por primera vez a mediados del siglo XX por Raúl Penino, quien observó un conjunto de enterramientos. Uno de ellos se correspondía a un enterramiento múltiple de dos niños cubiertos con “ocre” y asociados a un ajuar funerario hecho con valvas de molusco (Beovide *et al.*, 2019). Estos restos fueron preservados en un recipiente de vidrio junto al ajuar y al sedimento que los cubría, pasando a formar parte del acervo del Departamento de Antropología Biológica de la Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación. Recién en el año 2010 se realizó una primera investigación sistemática del área de Arazatí que incluyó un abordaje del enterramiento múltiple. Como resultado se observó que los niños tendrían una edad de entre 4 y 6 años, y que la composición “ocre” del sedimento estaría compuesto mayoritariamente por hematita. Estos sedimentos fueron asociados a formaciones geológicas ubicadas a más de 200 km de distancia de los enterramientos.

Respecto al área de Arazatí, se estima que hubo tres momentos de ocupación los cuales fueron datados por carbono-14 entre ca. 4500 y 4000 años AP, ca. 2000 y 1000 años AP, y entre ca. 900 y 400 años AP. Uno de los niños del enterramiento múltiple fue datado por la misma técnica y arrojó un fechado 476 ± 30 años AP, calibrado en 512-533 años AP, lo cual lo estaría ubicando con el período más tardío de ocupación del sitio (Beovide *et al.*, 2019). Los adornos hechos en molusco también se asocian a este período vinculado a sociedades horticultoras, pescadoras y ceramistas. Estas piezas fueron objeto de estudio en diversos trabajos realizados por Beovide y colegas para determinar la especie de molusco utilizado, así como las técnicas empleadas para su elaboración. Los autores encontraron un uso mayoritario de la especie *Urosalpinx haneti*, un gasterópodo marino. Debido a que esta especie de gasterópodo se encuentra a más de 200km de Arazatí, se propone que los grupos los podrían haber adquirido por traslado o por intercambio (Beovide *et al.*, 2021).

4.2 Descripción de las muestras

Los tres conjuntos analizados en este trabajo presentaron limitaciones respecto a datos contextuales ya que sus recuperaciones fueron realizadas de forma asistemática, pasando a formar parte de diversos acervos institucionales.

Considerando que la preservación de ADN endógeno en restos prehistóricos suele ser menor al 1% (Margaryan *et al.*, 2018), la selección de las piezas a analizar se hizo en base al tipo de hueso con mayor potencial de conservar este tipo de material, priorizando petrosos y dientes. La parte petrosa del hueso temporal es una excelente fuente de material genómico, principalmente la región de la cápsula ótica alrededor del oído interno, ya que es el hueso más fuerte del esqueleto. Junto al petroso, cuando están bien preservados, los dientes también presentan un alto contenido de ADN endógeno en la capa de cemento alrededor de las raíces (Hansen *et al.*, 2017; Margaryan *et al.*, 2018). Incluso se ha observado una mayor proporción de ADN mitocondrial en dientes que en petrosos debido a que la capa de cemento es más activa metabólicamente que el tejido óseo del petroso (Hansen *et al.*, 2017).

La muestra de Punta del Este está compuesta por un total de 61 elementos óseos de cráneo y poscráneo, ubicada actualmente en el acervo del Museo Histórico Nacional (casa de Ximénez), en Montevideo. Los restos se encuentran organizados en cajas, cada una identificada con un número. Es frecuente encontrar al interior de cada

caja piezas mezcladas, pertenecientes a más de un individuo. En el total de la muestra se contaron seis cráneos, todos incompletos o fragmentados, incluyendo un cráneo correspondiente a un individuo subadulto. También están presentes cinco mandíbulas y dos maxilares, cuyas asociaciones con los cráneos no están claras. En lo que refiere a los huesos largos, se cuenta con huesos largos completos e incompletos incluyendo radios, húmeros, fémures, tibias, clavículas, peroné, y cúbitos (Silveira y Figueiro, 2020). Recientemente, se obtuvieron dos dataciones radiocarbónicas: una de 2270 ± 30 años AP y otra de 800 ± 30 años AP. Por similitudes en aspecto macroscópico y contexto de recuperación, se asignaron los demás individuos de la muestra a una de estas cronologías (Tabla 1).

Del total de las piezas que conforman esta colección, se seleccionaron ocho para los análisis de extracción y amplificación de ADNmt: cinco piezas correspondientes a individuos adultos y tres a subadultos. El primer caso incluye dos molares, dos temporales y una calota, mientras que los restos infantiles corresponden a un cráneo, un fragmento de fémur y un isquion (Figuras 5 y 6).



Figura 5. Del lado izquierdo se observa el cráneo y temporal de uno de los subadultos de la colección Seijo (Maldonado). En rojo se señala la pieza analizada en este trabajo, correspondiente a la muestra 42C28B. En el lado derecho se muestra uno de los cráneos adultos de la colección Seijo, indicando en rojo el molar analizado (muestra 42A2).



Figura 6. Huesos del poscráneo de subadulto de la colección Seijo. En la figura se muestra, en la parte superior ilion e isquion, y en la parte inferior fémures derecho e izquierdo, y tibias derecha e izquierda. En rojo se indican el fémur (42C23) e isquion (42C28) que fueron analizados en este trabajo.

La muestra proveniente del sitio arqueológico Arazatí está compuesta por restos óseos correspondientes a dos o tres individuos subadultos, uno de ellos representado por un cráneo completo (individuo 1) y el otro por restos de neurocráneo y un fragmento de mandíbula (individuo 2). Conjuntamente se encuentran restos poscraneales cuya asociación con alguno de los dos individuos no es segura (Beovide *et al.*, 2014). En un trabajo llevado a cabo por Beovide *et al.* (2014), se observó el grado de erupción dental correspondiente a la dentición decidua para estimar la edad de los individuos, dando como resultado una edad de entre cuatro y seis años aproximadamente para el individuo 1, y de entre tres y cuatro años para el individuo 2. Por otro lado, la estimación de edad de los restos poscraneales fue realizada por osteometría, obteniendo una edad de tres años aproximadamente, lo cual sugiere la vinculación de estos restos con los correspondientes al individuo 2. Recientemente se ha logrado obtener dataciones para ambos individuos (Tabla 1), observando un solapamiento entre las edades de ambos individuos, indicando que fallecieron casi al mismo tiempo y fueron enterrados simultáneamente (G. Figueiro, comunicación personal).

Para los análisis genéticos realizados en este trabajo, se seleccionaron tres piezas del total de la muestra, correspondientes a dos huesos temporales de cráneo (uno de cada individuo) y un fragmento de húmero.

Los restos óseos del sitio La Viuda fueron analizados por Cáceres (2022). La muestra está formada por un mínimo de seis individuos, de los cuales tres posiblemente se correspondan a individuos femeninos, y por lo menos uno sería un adulto joven, con posible presencia de subadultos. Los estudios paleopatológicos evidenciaron presencia de engrosamientos a nivel de entesis, osteofitos, desgaste dental con patrón plano en la superficie oclusal y presencia de caries. En uno de los cráneos se destaca la presencia de treponematosis, siendo el primer caso de esta patología registrado en Uruguay. Por otro lado, en la muestra se observan casos de modificaciones antrópicas, tales como perforaciones sin evidencia de cicatrización, indicando su carácter *peri* o *postmortem*, y posibles marcas de corte producidas por herramientas de piedra en zonas localizadas de inserción de músculos y ligamentos (Cáceres, 2022).

Al igual que la muestra de Arazatí, los restos correspondientes a La Viuda se encuentran al cuidado del Departamento de Antropología Biológica de la Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación (Universidad de la República). Se seleccionaron un total de seis piezas con el objetivo de realizar los análisis genéticos, las cuales fueron recientemente datadas (G. Figueiro, comunicación personal). (Tabla 1).

4.3 Metodología de laboratorio

En las tareas de laboratorio se siguieron los protocolos y precauciones anticontaminación correspondientes a muestras de ADN altamente degradadas (Knapp *et al.*, 2012; Yang y Watt 2005). Para estas etapas de trabajo se utilizaron las instalaciones del laboratorio de Antropología Biológica de la Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación, el cual cuenta con los requisitos necesarios para realizar tareas vinculadas a la manipulación de ADN antiguo. Estos requisitos implican (Knapp *et al.*, 2012):

- ✓ Una habitación destinada exclusivamente al trabajo con ADN antiguo, físicamente separada del lugar de trabajo con ADN moderno.
- ✓ Un sistema de aire de presión positiva para evitar el ingreso de material contaminante desde el exterior.

Tabla 1. Dataciones radiocarbónicas correspondientes a varias de las piezas analizadas. En el caso de las piezas sin datación radiocarbónica, se estimó una cronología similar a las piezas que por morfología y/o contexto puedan estar asociadas.

Pieza	Elemento óseo	Sitio	Datación ¹⁴ C	Datación cal.
42A2	Molar	Punta del Este	-	2300AP
42C23	Fémur izquierdo	Punta del Este	800 ± 30 AP	1220-1292 D. C
42E4C	Temporal derecho	Punta del Este	-	800AP
42B3	Temporal derecho	Punta del Este	-	800AP
42E2	Temporal izquierdo	Punta del Este	-	800AP
42C28B	Temporal izquierdo	Punta del Este	-	800AP
42B10	Diente aislado	Punta del Este	-	800AP
42C28	Isquion derecho	Punta del Este	-	800AP
AR-A	Temporal izquierdo	Arazatí	410 ± 30 AP	1451-1627 DC
AR-B	Temporal derecho	Arazatí	400 ± 30 AP	1455-1628 DC
AR-H	Húmero	Arazatí	-	400 AP
LV-TC	Temporal izquierdo	La Viuda	1176 ± 26 AP	882-992 DC
LV-2-40	Temporal derecho	La Viuda	593 ± 21AP	1324-1429 DC
LV 2-41	Temporal izquierdo	La Viuda	1078 ± 23 AP	973-1041 DC
LV 2-43	Temporal derecho	La Viuda	1131 ± 21 AP	895-1019 DC
LV 1-163	Temporal izquierdo	La Viuda	1063 ± 22 AP	990-1132 DC
LV 1-138	Temporal derecho	La Viuda	959 ± 29 AP	1032-1206 DC

- ✓ Utilización de luz UV para la irradiación de cualquier partícula de ADN presente en las superficies de los equipos y material consumible.
- ✓ Un área destinada para que los investigadores se coloquen ropa limpia de uso exclusivo para el laboratorio (túnicas, mamelucos, gorra, doble par de guantes, tapabocas y cubrezapatos).
- ✓ Equipos destinados a la descontaminación de muestras y materiales consumibles. En este caso el laboratorio cuenta con un *crosslinker* el cual consiste en un dispositivo compacto que utiliza luz ultravioleta para la

esterilización, permitiendo una desinfección rápida sin el uso de productos químicos.

Además de estos requisitos, los investigadores deben emplear medidas que disminuyan al máximo el riesgo de contaminación. Algunas de ellas son el uso de sustancias como hipoclorito de sodio, para limpiar todas las superficies de trabajo antes y después de realizadas las tareas, y el cambio de guantes al manipular diferentes muestras con el fin de evitar la contaminación cruzada.

4.3.1 Preparación de las muestras

Antes de la extracción de ADN fue necesario realizar una limpieza profunda de cada uno de los elementos óseos con el fin de eliminar cualquier ADN contaminante presente en la superficie ósea. Para esto se utilizó una solución de hipoclorito de sodio al 10%. A continuación, se realizaron dos enjuagues con agua ultrapura en cantidad suficiente hasta eliminar todo el hipoclorito. Finalmente, se aplicó papel absorbente para eliminar el exceso de líquido y se dejaron reposar al interior del *crosslinker* durante la noche. De esta forma, las piezas no solo se secan por completo, sino que, adicionalmente, la irradiación con luz UV termina de eliminar cualquier fragmento de ADN contaminante que haya quedado en la superficie.

4.3.2 Extracción de ADN

Se perforaron los elementos óseos con un torno para obtener el hueso que está por debajo de la superficie, en forma de polvo. En el caso de huesos temporales, la perforación se hizo a la altura del petroso, y en el caso de piezas dentales, se procuró obtener la dentina debajo del esmalte. El polvo obtenido fue transferido a tubos de 15 mL utilizando un tubo rotulado por muestra y uno a modo de “blanco de extracción”. Estos últimos fueron sometidos a los mismos procesos y reactivos que las muestras para corroborar que no hubo contaminación durante el proceso. A cada tubo se le agregó 3 mL de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0,5M (pH 8,0) el cual actúa como un agente quelante uniéndose a los iones de metal que son cofactores de varias enzimas que degradarían el ADN (Cadavid y Gómez, 2018). Conjuntamente se agregaron 30 µL de proteinasa K (20 mg/mL, New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), una enzima proteolítica que descompone las proteínas óseas, facilitando la posterior purificación del material genético. Los tubos fueron incubados en rotación a no más de 60°C por 24 horas. Pasado este tiempo, se agregó 20 µL más de proteinasa K a cada tubo y se los

dejó incubar por 24 horas adicionales. Una vez que finalizó el período de incubación, todos los digeridos fueron centrifugados a 5.000 revoluciones por minuto (rpm) por tres minutos y se transfirió el sobrenadante a nuevos tubos de 15 mL con membranas Amicon Ultra-4 (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania). Los nuevos tubos fueron centrifugados a 4.000 rpm durante 30 minutos, concentrando el ADN hasta alcanzar un volumen aproximado de 250 μ L. Estos concentrados fueron transferidos a nuevos tubos. Para la obtención y purificación del material genético a partir de los concentrados, se utilizaron columnas de sílice y soluciones que forman parte de un *kit* comercial de purificación de productos de PCR basados en columnas de sílice (QIAquick® PCR purification kit, QIAGEN, Hilden, Alemania). La utilización de este *kit* tiene como principal ventaja la disminución del riesgo de contaminación y agilización del proceso, ya que, al traer las soluciones ya preparadas, se eliminan varias etapas de manipulación de las muestras. Una de estas soluciones es el *buffer* de captura (*buffer* PB), el cual se agregó en una proporción de 5 volúmenes respecto a la cantidad de concentrado obtenido para cada muestra. A continuación, se agregaron 20 μ L de acetato de sodio 3M (pH 5,2) para asegurar el ambiente ácido necesario para que el ADN se adhiriera a las paredes de las columnas de sílice. Esta mezcla fue transferida en tandas de 700 μ L a los tubos con columnas donde se dejaron incubar por cinco minutos, y posteriormente fueron centrifugadas a máxima velocidad (13.000 g) por un minuto. Este paso fue repetido las veces necesarias hasta finalizar toda la mezcla de *buffer*, EDTA y concentrado de ADN. Una vez finalizada esta etapa se realizaron dos lavados con el *buffer* de lavado con etanol (*buffer* PE), el cual permite eliminar todo el material que no quedó adherido a las columnas. Se centrifugó a máxima velocidad por un minuto, descartando el eluido resultante. Como último paso, para eluir el ADN unido a las columnas, se agregan 30 μ L del *buffer* de elución (*buffer* EB) a cada tubo y fueron incubados a 37°C por 10 minutos para luego ser centrifugados a máxima velocidad por un minuto. Este último paso se realizó dos veces, obteniendo un producto con un volumen final de 60 μ L.

A lo largo del proceso se incluyeron los blancos de extracción para corroborar la ausencia de ADN, y, en consecuencia, la ausencia de contaminación durante el proceso. Como una medida preventiva adicional, antes de iniciar los trabajos de extracción, se determinaron los haplogrupos mitocondriales de los investigadores para descartar posibles contaminaciones humanas.

Debido a limitaciones del material disponible, se realizó una sola extracción de cada una de las muestras. La única excepción fue Arazatí para la cual ya había realizada una extracción de los individuos Ar-A y Ar-B; en este trabajo se lo repitió, obteniéndose duplicados de extracción para estas muestras.

4.3.3 Amplificación del ADN

En las muestras de ADN obtenidas se amplificaron la región hipervariable I (HVRI) y la región hipervariable II (HVRII), informativas para los objetivos de este trabajo, a través de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las amplificaciones de las HVRI y II se hicieron en cinco y cuatro fragmentos solapantes respectivamente, utilizando los cebadores correspondientes (Figura 7). Se utilizó el *mastermix Immomix*TM (BioLine Reagents, Londres, Reino Unido) el cual contiene todos los reactivos necesarios para la reacción de PCR. En la tabla 2 se muestran las condiciones bases en las cuales se realizaron la PCR, las cuales se ajustaron según la cantidad de muestras a amplificar.

Tabla 2. Cantidades bases aplicadas a cada reacción de PCR.

Mix	1 tubo
Agua	11,7µL
<i>Immomix</i>	15 µL
Cebador <i>Forward</i>	0,16 µL
Cebador <i>Reverse</i>	0,16 µL
ADN	3 µL
Total	30 µL

Cada fragmento fue sometido a 45 ciclos de PCR, consistiendo en 10 minutos de desnaturalización inicial a 95°C, seguido de otros 30 segundos de desnaturalización a 95°C, 30 segundos de temperatura de *annealing*, y 30 segundos de extensión a 72°C, finalizando con cinco minutos de extensión final también a 72°C.

Los cebadores utilizados para la amplificación de la HVRI fueron diseñados por Lucía Anza (2023) (Tabla 3), y son específicos para ampliar regiones pequeñas de entre 125-130 pb, mientras que, para la HVRII, se emplearon los cebadores diseñados por el Dr. Gonzalo Figueiro. (Tabla 4).

Tabla 3. Cebadores utilizados para la ampliación de la HVRI. Los “F” amplifican la hebra ligera (L) del ADNmt, mientras que los “R” amplifican la hebra pesada (H).

0				
	Posición de 5' a 3'	Secuencia	Tamaño del amplicón	Referencia
LAHV1F	16023 – 16043	GTTCTTTTCATGGGGAAGCAGA	128	Anza (2023)
LAHV1R	16151 – 16128	GGTGGTCAAGTATTTATGGTACCG		
LAHV2F	16098 – 16117	ACATTACTGCCAGCCACCAT	128	
LAHV2R	16225 – 16204	GAGGGTTGATTGCTGTACTTGC		
LAHV3F	16156 – 16179	GTACATAAAAACCCAATCCACATC	141	
LAHV3R	16283 – 16263	TGTTGGTATCCTAGTGGGTGA		
LAHV4F	16240 – 16259	AACTGCAACTCCAAAGCCAC	125	
LAHV4R	16365 – 16345	GGGACGAGAAGGGATTTGACT		
LAHV5F	16322 – 16341	ATTTACCGTACATAGCACAT	128	
LAHV5R	16450 – 16433	CGAGGAGAGTAGCACTCT		

Tabla 4. Cebadores utilizados para la ampliación de la HVRII. Los “for” extienden la hebra ligera (L) del ADNmt, mientras que los “rev” extienden la hebra pesada (H).

	Posición 5'- 3'	Secuencia	Tamaño del amplicón	Referencia
29for	8 -29	GGTCTATCACCCCTATTAACCAC	144	Diseñados por el Dr. Gonzalo Figueiro.
133rev	152 – 132	AGGATGGGGCAGGAATCAAAG		
123for	103-123	GCCGGAGCACCCCTATGTCTGCA	124	
201rev	224-201	AAGCATTAATTAATTAACACACTT		
152for	132 – 152	CTTTGATTCTGCCCCATCCT	164	
273rev	296 – 273	GGAAATTTTTTGTATGATGTCTG		
260for	242 – 260	CAATTGAATGTCTGCACAG	140	
362rev	382 – 362	CATACCGCCAAAAGATAAAAT		

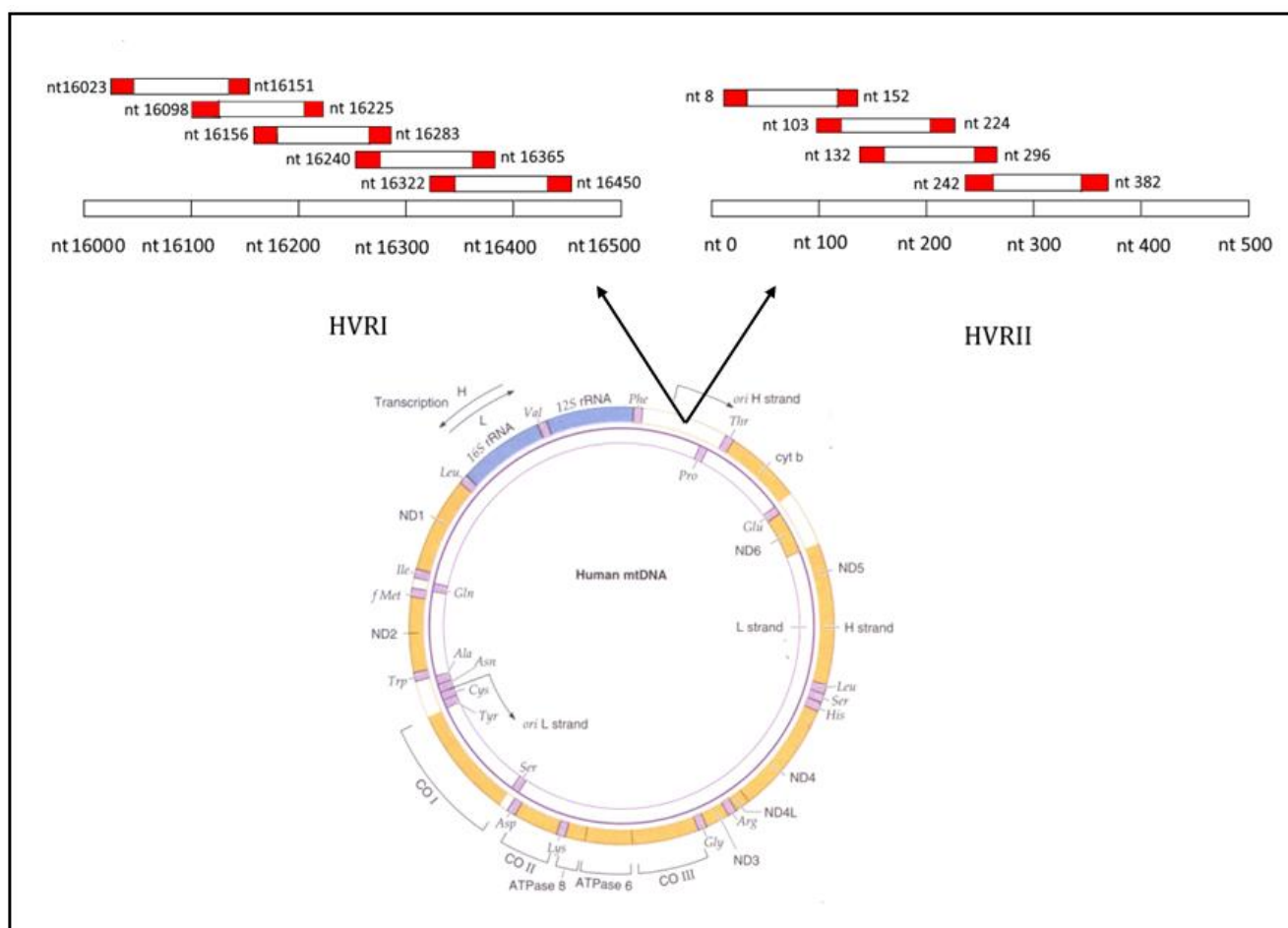


Figura 7. Esquema de la ubicación de los fragmentos solapantes correspondientes a las HVRI y HVRII. En rojo se indica la ubicación de los cebadores; "nt" hace referencia a los nucleótidos. La ampliación de las regiones hipervariables se presenta en sentido 5'-3' de la hebra L.

Los productos de PCR fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 2%. En caso de constatare amplificación, y previo a la secuenciación de las muestras, se las purificó para eliminar fragmentos de cebadores y dNTP. En el caso de los restos de cebadores, se empleó exonucleasa I cuya función es romper el ADN de cadena simple; los dNTP se degradaron a través de fosfatasa alcalina, enzima que corta los grupos fosfato.

4.4 Análisis de las secuencias

4.4.1 Depuración y haplotipado de las muestras

La secuenciación de las muestras de ADN amplificadas fue realizada por la técnica de secuenciación Sanger en la empresa MacroGen en Corea del Sur, y en el Institut Pasteur de Montevideo. Una vez obtenidas las secuencias, se las visualizaron utilizando el programa *Chromas* (<https://technelysium.com.au/wp/chromas/>), con el cual también se realizó una revisión manual para eliminar las bases de baja calidad y agregar aquellas que no fueron detectadas por el programa. En total, un 12% de las bases fueron estimadas a mano. Este programa genera un archivo *fasta* el cual posteriormente se utilizó para alinear las secuencias con la referencia de Cambridge (rCRS) (Andrews *et al.*, 1999). Este paso se hizo en línea con *Clustal Omega* (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>). Con la alineación generada se registraron las mutaciones de forma manual a través del programa *BioEdit Sequence Alignment Editor*, (<https://bioedit.software.informer.com/>), y con el programa *Haplogrep* versión 2.4.0, se obtuvo el haplogrupo correspondiente a la secuencia según las mutaciones presentes.

Debido a que se contaba con una sola extracción de ADN por individuo (a excepción de Arazatí), una vez obtenidos los haplotipos se amplificaron y resecuenciaron algunos fragmentos a fin de corroborar mutaciones diagnósticas y confirmar los haplotipos.

4.4.2 Recopilación de secuencias de Sudamérica y comparaciones filogenéticas

Con el objetivo de realizar análisis comparativos, se registraron secuencias antiguas y modernas correspondientes al continente americano, limitando la búsqueda a Sudamérica y a aquellos haplogrupos o subhaplogrupos presentes en las muestras aquí estudiadas. Para ello se acudió a la bibliografía (Avila *et al.*, 2012; Bobillo *et al.*, 2010, Catelli *et al.*, 2011, Cardena *et al.*, 2013, García *et al.*, 2018, 2021, Gómez Carballa *et al.*, 2012, Sala & Corach, 2014, Sala *et al.*, 2019, Taboada Echalar *et al.*, 2013, Xavier *et al.*, 2015) y la base de datos *on line* de GenBank filtrada por haplogrupo a través de Mitomap (https://www.mitomap.org/cgi-bin/haplo_group). Con esta información se generaron dos tablas, una con los datos de la bibliografía y otra con los datos de GenBank, especificando la localidad y país de procedencia de la secuencia, la referencia y la secuencia correspondiente a las HVRI y II con sus polimorfismos. Como se muestra en la figura 8, se logró recopilar secuencias de Argentina, Brasil, Chile, Bolivia, Perú, Paraguay, Ecuador,

Venezuela y Colombia. Los datos de ambas tablas combinadas se pueden observar en el Apéndice 1.



Figura 8. Identificación de los países de los cuales se pudieron coleccionar secuencias para el análisis comparativo.

A partir de la información recopilada se realizaron los análisis filogenéticos y afinidades poblacionales utilizando el programa Network versión 10.2.0.0 (Bandelt *et al.*, 1999). Este programa permite la recreación de filogenias basándose en el método de máxima parsimonia mediante el algoritmo *Median-Joining*. Con el fin de obtener los árboles más cortos, se optó por la opción post-procesamiento *MP calculation* al calcular la red más parsimoniosa. A su vez, siguiendo las pautas de Soares *et al.* (2009), a cada sitio polimórfico se le otorgó un valor de ponderación filogenética para la construcción de las redes, dándole prioridad a aquellas mutaciones poco frecuentes y, en consecuencia, más informativas. Para cada red generada se estableció un nodo central, correspondiente a una secuencia que presente únicamente las mutaciones diagnósticas para el haplogrupo estudiado. El criterio para la elección del árbol o red de haplotipo fue por máxima parsimonia, es decir, aquel que tenía menos pasos mutacionales entre el nodal y las muestras de interés, ignorando las ramas laterales para facilitar la visualización. Debido a la amplitud de los datos recopilados, las redes de haplotipos

obtenidas fueron recortadas para centrarse en los vínculos de las muestras aquí estudiadas con las demás poblaciones, dejando de lado las afinidades de las restantes secuencias y linajes de Sudamérica.

La razón para incluir ambas regiones hipervariables en las redes de haplotipos se debe a la posibilidad de contar con un mayor número de polimorfismos, permitiendo obtener asociaciones filogenéticas más específicas. Sin embargo, y considerando la abundancia de secuencias disponibles de la región hipervariable I, se efectuó una búsqueda de variantes comunes únicamente en esta región, con la finalidad de ampliar el rango de posibles afinidades.

4.4.3 Análisis del éxito de amplificación mediante regresión logística

Considerando que los trabajos con ADN son destructivos, es conveniente contar *a priori* con un valor de probabilidad del éxito de la amplificación. En Uruguay, estas probabilidades son bajas (Anza, 2023), incluso trabajando con secuenciación masiva, la calidad de los resultados es reducida (Lindo *et al.*, 2022). Teniendo en cuenta que las muestras analizadas en esta tesis tienen una gran amplitud cronológica (desde 2300 AP hasta 400 AP), es una oportunidad para modelar la probabilidad de éxito a partir de las amplificaciones y secuencias exitosas. Por este motivo, como parte de los análisis realizados, se incluyó una regresión logística con el fin de predecir algunos factores del éxito o no de la amplificación de secuencias genéticas antiguas en muestras de Uruguay.

Los modelos de regresión son especialmente útiles cuando se pretende conocer la relación entre una variable de interés (variable dependiente) respecto a otro conjunto de variables independientes. Cuando esta variable de interés es dicotómica, (es decir, toma por ejemplo valores de sí/no) se aplica la regresión logística (Peláez, 2016). Este modelo permite determinar cuáles de las variables independientes tienen más peso en la probabilidad de que un cierto evento ocurra (variable dependiente) (Chitarroni, 2002). Según el objetivo planteado, se puede realizar un análisis de regresión para evaluar cómo afecta un cambio en alguna de las variables independientes a la dependiente, conocido como *modelo explicativo*; o también puede aplicarse para estimar el valor de una característica (variable dependiente) en función de los valores que tomen un conjunto de otras características (variables independientes), conocido como *modelo predictivo*. Al realizar el modelo de regresión logística, se aplica una función basada en el cálculo de la probabilidad de que la variable dependiente adopte el valor de un evento de interés definido previamente, expresado de la siguiente manera:

$$y = \ln\left(\frac{p(\text{éxito})}{1-p}\right) = b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_nx_n + a$$

y = variable dependiente

p = probabilidad de que ocurra el evento de interés

b = coeficiente o peso de cada variable independiente; puede ser positivo o negativo (cuando x varía en una unidad, el logaritmo de la razón de probabilidades aumenta o disminuye en b unidades)

x = variable independiente

a = intersección (el valor de la variable dependiente cuando la variable independiente es 0)

De esta forma, con el modelo de regresión logística se logran realizar estimaciones para la variable dependiente sobre la función de probabilidad asociada a ella (Peláez, 2016).

En este trabajo se aplicó el modelo de regresión logística para conocer la probabilidad de que una secuencia de ADN antigua amplificara (variable dependiente), en función de dos condiciones: el largo del fragmento amplificado y la antigüedad (variables independientes). La probabilidad de éxito se define como el cociente entre las amplificaciones exitosas y la cantidad de intentos de amplificaciones exitosas. Las exitosas fueron únicamente aquellas que condujeron a secuencias endógenas auténticas.

Los datos fueron procesados con el entorno estadístico R 4.1.2 (R Core Team, 2021) para obtener los factores estadísticamente significativos y su peso en el éxito de amplificación. Con este estudio se pretendió conocer cuál de las dos condiciones tienen mayor peso en el éxito de la amplificación, con el fin de generar valores de referencia para futuros trabajos que involucren análisis de ADN de restos antiguos del Uruguay.

5. Resultados

5.1 Extracción y amplificación de ADN

De un total de 17 muestras, se intentaron amplificar 153 fragmentos de ADN correspondientes a las HVRI y HVRII. De ese total, se lograron obtener 107 secuencias (70%). La amplificación completa de las regiones hipervariables se logró en 6 (35%) muestras para la HVRI y 6 (35%) para la HVRII. En estos casos se logró hacer una asignación del linaje mitocondrial correspondiente. Estos datos se encuentran resumidos en las tablas 5 y 6. En el caso de las muestras 42E2, 42E4C, 42B3, 42C23, 42C28, LV-TC y LV 2-43 se realizó una segunda tanda de amplificación y secuenciación para confirmar la presencia de ciertas mutaciones de interés; estas reamplificaciones fueron exitosas en todas las muestras a excepción de LV 2-43 y 42B3.

5.2 Asignación de linajes indígenas

De las 17 muestras, se descartaron siete (42C28-B, 42A2, 42B10, LV-2-40, LV-2-41, LV-1-138 y LV-1-163) debido a motivos que se detallan más abajo. En 10 de ellas (42E4C, 42E2, 42C23, 42C28, 42B3, Ar-A, Ar-B, Ar-H, LV-TC y LV-2-43), es decir, en un 59%, se obtuvieron mutaciones diagnósticas que permitieron asignarlas a linajes indígenas (Tabla 7).

Tabla 5. Detalle de éxito de amplificación de las muestras estudiadas para cada uno de los 5 fragmentos correspondientes a la HVRI. “SI(F)” y “SI(R)” indican que sólo se obtuvo secuencia de la hebra *forward* o la hebra *reverse*, respectivamente. Cada uno de los cinco fragmentos solapantes en los cuales se dividió la HVRI fueron denominados LAHV1, 2, 3, 4 y 5.

Individuo	Cronología	LAHV1	LAHV2	LAHV3	LAHV4	LAHV5
42E4C	800 AP	SI	SI (F)	SI (R)	SI	SI
42B3	800 AP	SI	SI	SI	SI	SI (R)
42E2	800 AP	SI	SI	SI	SI	SI (R)
42C28B	800 AP	NO	NO	SI	SI	SI (R)
42A2	2300 AP	NO	SI	NO	SI	NO
42B10	800 AP	SI	SI	SI	SI	NO
42C23	800±30 AP	SI (R)	NO	NO	SI (F)	SI (F)
42C28	800 AP	SI	SI	NO	SI	SI
Ar-A	410±30 AP	SI	SI	SI	SI	SI
Ar-B	400±30 AP	SI	SI (F)	SI (R)	SI	SI
Ar-H	400 AP	SI	SI (F)	SI	SI	SI
LV-TC	1176±26 AP	NO	SI	SI	SI	SI
LV2-40	593±21 AP	NO	NO	NO	NO	NO
LV2-41	1078±23 AP	SI	SI	SI (R)	SI	NO
LV2-43	1131±21 AP	SI (R)	NO	SI	SI	SI
LV1-163	1063±22 AP	NO	NO	SI	SI (F)	SI
LV1-138	959±29 AP	NO	NO	NO	NO	NO

Tabla 6. Detalle de éxito de amplificación de las muestras estudiadas para cada uno de los 4 fragmentos correspondientes a la HVRII. "SI(F)" y "SI(R)" indican que sólo se obtuvo secuencia de la hebra *forward* o la hebra *reverse*, respectivamente. Cada uno de los cuatro fragmentos en los cuales se dividió la HVRII fueron denominados HV2A, B, C y D.

Individuo	Cronología	HV2A	HV2B	HV2C	HV2D
42E4C	800 AP	SI (R)	SI (F)	SI	SI
42B3	800 AP	NO	SI (F)	SI	SI
42E2	800 AP	SI (R)	SI (F)	SI	SI (R)
42C28B	800 AP	SI (R)	SI	SI	SI (R)
42A2	2300 AP	SI (R)	NO	NO	NO
42B10	800 AP	NO	SI	SI	NO
42C23	800±30 AP	SI	SI	SI	SI
42C28	800 AP	Si	SI (R)	SI (F)	NO
Ar-A	410±30 AP	SI (R)	SI	SI	SI
Ar-B	400±30 AP	SI (R)	SI	SI (R)	NO
Ar-H	400 AP	SI (R)	SI	SI	SI
LV-TC	1176±26 AP	SI	SI	NO	SI
LV2-40	593±21 AP	NO	NO	NO	NO
LV2-41	1078±23 AP	SI	NO	SI	SI
LV2-43	1131±21 AP	SI	SI	NO	SI (R)
LV1-163	1063±22 AP	NO	NO	NO	NO
LV1-138	959±29 AP	NO	NO	NO	NO

Tabla 7. Mutaciones presentes en cada una de las muestras, linajes mitocondriales asignados y rangos amplificados. En negrita se indican las mutaciones adicionales del individuo; el @ indica reversiones en sitios diagnósticos; con subrayado se indican las mutaciones que fueron confirmadas con la segunda amplificación. Las secuencias de Arazatí fueron repetidas en su totalidad.

Muestra	Mutaciones respecto a la rCRS	Haplogrupo inferido	Rango amplificado	Rango amplificado
			HVI	HVII
42E4C	16189C 16223T 16325C 16362C 73G 207G 263G 315.1C	D1	16023-16450	8-382
42E2	16223T 16298C 16320T 16325C 73G 249d 263G 291-291d 309.1C 315.1C	C1 + <u>@16327</u>	16023-16450	8-382
42C23	16051G 16298C 16325C 73G 194T 249d 263G 290-291d 315.1C	C1d + <u>@16327</u>	16023-16151 16240-16450	8-382
42B-3	16051G 16140C 16223T 16288C 16298C 16325C 16327T 194T 249d 263G 290-291d 315.1C	C1d3	16023-16450	132-382
42C28	16051G 16223T 16298C 16325C 73G 194T 263G	C1d+ <u>@16327</u>	16156-16450	8-383
Ar-A	16209C 16223T 16298C 16325C 16327T 73G 195C 249d 263G 290- 291d 309.1C 315.1C	C1	16023-16450	8-382
Ar-B	16189C 16223T 16241G 16301T 16342C 16362C 73G 152C 194G 263G 309.1C 315.1C	D4h3a	16023-16450	8-296
Ar-H	16189C 16223T 16241G 16301T 16342C 16362C 73G 152C 194G 263G 309.1C 315.1C	D4h3a	16023-16450	8-382
LV-TC	16129R 16223T 16298C 16325C 16327T 73G 195C 315.1C	C1	16098-16450	8-224 260-382
LV-2- 43	16189C 16223Y 16291T 16298C 16325C 16327Y 195C 309.1C 315.1C	C1	16023-16151 16156-16450	8-224 260-382

Como se observa en la tabla 7, siete de las 10 muestras fueron asignadas al haplogrupo C1. A su vez, de estas siete, dos muestras se correspondieron con el subhaplogrupo C1d y una al linaje derivado C1d3. Una muestra corresponde al haplogrupo D1 y dos al D4h3a. En el caso de las muestras 42E2, 42C23 y 42C28, se registró la pérdida de la mutación diagnóstica 16327T. Si bien, durante el proceso de amplificación de la secuencia (PCR), pueden ocurrir errores en la adición de bases debido a daños en la molécula de ADN, estos generalmente se deben a la desaminación de las citosinas. Se trata de uno de los daños más comunes del ADN por el cual una citosina se transforma en uracilo, generando transiciones C→T y G→A (Hofreiter *et al.*, 2001). Sin embargo, en el caso de la mutación en la posición 16327 el cambio fue T→C, por lo cual la pérdida de esta mutación sería auténtica y no como resultado de degradación en el ADN. Esto fue confirmado con la segunda tanda de secuenciaciones donde nuevamente se registró la pérdida de la mutación 16327T en las tres muestras. Adicionalmente, se confirmó la presencia del polimorfismo 16320T en 42E2, el cual es considerado como una mutación poco frecuente (Soares, 2009).

En algunos casos no se pudieron registrar mutaciones diagnósticas debido al fracaso en las amplificaciones de los fragmentos que las contendrían. En el caso de la muestra 42C23, la mutación diagnóstica del haplogrupo C1d que le falta (16223T) corresponde a los fragmentos 2 y 3 de la HVRI que no se pudieron amplificar. Es plausible suponer que el individuo también presentaría esta mutación ya que es muy frecuente en el haplogrupo C1d. La misma explicación se puede aplicar a las muestras 42C28, LV-TC y LV-2-43, a las cuales le faltan las delecciones en los sitios 249, 290 y 291, pertenecientes a los fragmentos C y D de la HVRII los cuáles no se lograron amplificar (Tabla 6).

Un dato que merece mención aparte corresponde a las muestras Ar-B y Ar-H de Arazatí. Ambas presentaron secuencias idénticas, indicando que el cráneo (Ar-B) y el poscráneo (Ar-H) se corresponden a un mismo individuo (referido de ahora en más únicamente como Ar-B). El haplogrupo asignado en este caso fue D4h3a, para el cual existe una subdivisión en los subhaplogrupos D4h3a1 y D4h3a2. Sin embargo, debido a que las mutaciones diagnósticas para observar esta distinción se encuentran fuera de la región hipervariable del genoma mitocondrial (Perego *et al.*, 2009), no fue posible realizar tal distinción en este estudio. Una mutación significativa es la transversión 194G la cual es única para este individuo, y no se ha registrado en secuencias publicadas del haplogrupo D4h3a.

Respecto a las muestras que se descartaron, las razones fueron varias. En el caso de 42C28B se registraron las mutaciones 16223T - 16288C - 16298C - 16325C - 16327T - 73G - 194T - 263G. Estas variantes estarían indicando la correspondencia al haplogrupo C1d3; sin embargo, fueron detectados en una única hebra, sin que aparecieran en ninguna otra amplificación. Por esta razón se decidió no incluirla en análisis posteriores. En la muestra 42A2, se registró únicamente la mutación 16311C, siendo el resto de las secuencias de los fragmentos amplificados idénticas a la referencia rCRS. Por lo tanto, se asumió que esta muestra estaría contaminada con ADN exógeno, posiblemente de origen europeo. Una situación muy similar ocurrió con las muestras 42B10 y LV-1-163. En el primer caso se registró solamente la presencia de dos T en una única hebra en las posiciones 16184 y 16239, las cuales probablemente se corresponda a daños en el ADN. El resto de la secuencia de 42B10 y la totalidad de LV-1-163 mostraron una identidad perfecta con la referencia, nuevamente sugiriendo posible contaminación. En otra de las muestras de La Viuda, LV-2-41, se registraron las mutaciones 16150T, 16278T, 16294T, 73G, 263G y 315.1C. Este grupo de polimorfismos no logró ser asignado a ningún haplogrupo indígena, asumiendo una posible contaminación y descartándose la secuencia. Por otro lado, en la muestra LV-1-138 no se logró obtener amplificaciones para ninguna de las HVR.

5.3 Análisis filogenético

Las afinidades poblacionales se visualizaron a través de las redes de haplotipos generadas por el programa *Network*, realizando el análisis por haplogrupos. De esta forma se obtuvieron cuatro redes correspondientes a los linajes C1, C1d, D1 y D4h3 (Figuras 8 a 11). Las figuras no representan los *networks* completos para cada haplogrupo, sino que presentan el recorte vinculado a las ramas de las muestras estudiadas. La única excepción es D4h3 ya que, debido a su tamaño muestral relativamente reducido, sí se encuentra completo.

En el caso de las secuencias del haplogrupo C1 (Figura 9), se puede observar que los vínculos más cercanos de las muestras de Uruguay Ar-A y LV-TC, se dan con poblaciones de la provincia de San Luis, en el centro de Argentina (García *et al.*, 2018), siendo las muestras uruguayas derivados de un haplotipo presente en este último país. A su vez, se observa un vínculo más lejano con San Pablo, Brasil (Cardena *et al.*, 2013). Por su lado, LV-43 mostró un vínculo a través de la mutación 16189C con individuos de Argentina (Sala *et al.*, 2019, García *et al.*, 2018, Bobillo *et al.*, 2010) y Brasil (Cardena *et al.*, 2013). Sin embargo, debido a que 16189 es un sitio altamente variable, y que LV-

43 adquiere la mutación en 16291T, ausente en los demás individuos de Brasil y Argentina, no se profundizó en estos vínculos.

A partir del nodal de C1 se produce una mutación en la posición 195, la cual se pierde posteriormente en dos ocasiones. Por otro lado, el individuo 42E2 es el único que no presenta una conexión regional. Sin embargo, existe la posibilidad de que este individuo presentara el polimorfismo 16051 pero que no se haya detectado debido a daños o contaminación. En ese caso, 42E2 pasaría a corresponderse con el subhaplogrupo C1d ya que, al igual que 42C23 + 42C28, también presentó la reversión en 16327.

Para el haplogrupo C1d (Figura 10) se observa una situación similar, con afinidades más cercanas con el centro de Argentina (García *et al.*, 2018) y Perú (Llamas *et al.*, 2016). A partir de un nodo central se distinguen claramente dos agrupamientos. En uno de ellos se ubica el individuo 42C28 + 42C23 con la pérdida de la mutación 16327T. Se observa en el *network* que fue el único que no mostró una conexión regional pero sí con secuencias de Perú (Perego *et al.*, 2010; Llamas *et al.*, 2016). Respecto a la otra agrupación, se incluye a 42B3 dentro de las demás poblaciones del norte de Uruguay con el subhaplogrupo C1d3 (Figueiro *et al.*, 2022; Sans *et al.*, 2015, 2012). A su vez, de todas estas deriva un haplotipo de Córdoba, Argentina (García *et al.*, 2018), separadas por una única mutación en la posición 16093. Se destaca acá que este individuo de Córdoba es el único caso de C1d3 registrado fuera de Uruguay hasta la fecha.

El *network* correspondiente al haplogrupo D1 (Figura 11) incluye únicamente al individuo 42E4C para el cual se observa una conexión directa con el nodal, separado por dos mutaciones en las posiciones 207 y 16189. Debido a que ésta última es muy homoplásica (Soares *et al.*, 2009), se decidió trabajar con el polimorfismo en 207 como unión al nodal, siendo la opción más parsimoniosa. Esto causó la eliminación del nodal inicial del *network*, recurriendo a la elaboración de otro en forma manual, el cual es el mostrado en la figura 10. Inicialmente se detectó un vínculo con el Chaco y la presencia de un gran *cluster* chaqueño. Sin embargo, al trabajar con el nuevo nodal, el grupo chaqueño queda alejado. En general los vínculos más cercanos para 42E4C se encuentran con individuos de Uruguay (Figueiro *et al.*, 2022) y de Paraguay (Simao *et al.*, 2018), a una distancia de dos pasos mutacionales en cada caso, presentando un vínculo lejano con Perú (Barbieri *et al.*, 2017),

El último árbol generado corresponde al haplogrupo D4h3 (Figura 12), el cual incluye al individuo Ar-B. La mutación observada en la posición 194G corresponde a una

transición exclusiva de este individuo. Por otro lado, si bien el polimorfismo en 16189 es poco informativo (Soares *et al.*, 2009), en este caso en particular, se lo registra únicamente en Ar-B, haciéndolo destacable. Respecto a las afinidades filogenéticas, se muestra un vínculo con el Chaco (Sevini *et al.*, 2014), pudiendo ser éste su origen poblacional.

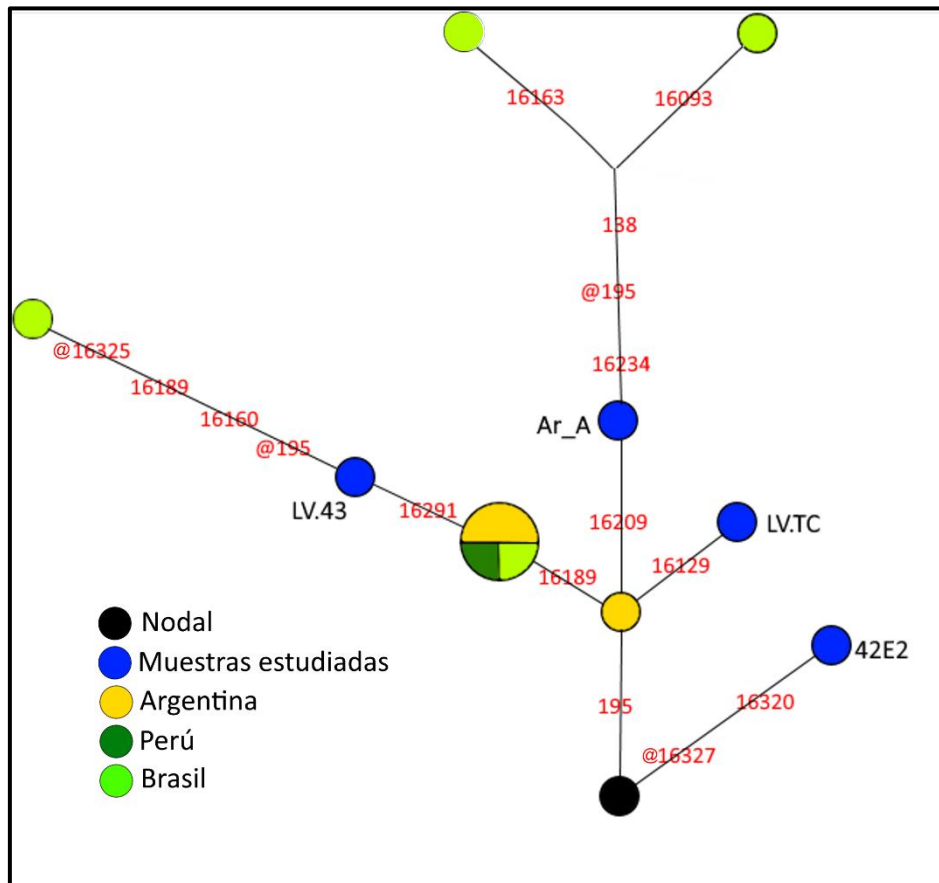


Figura 9. Red de haplogrupo generada por el programa *Network* para el linaje C1. En rojo se muestran las mutaciones registradas.

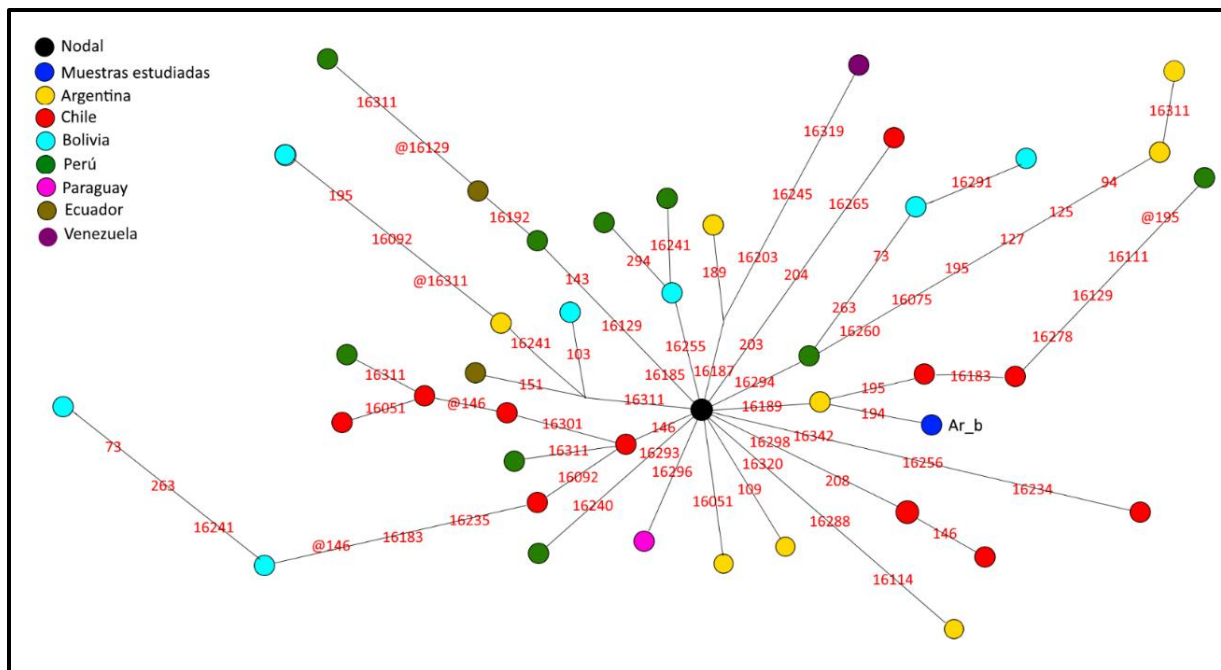


Figura 12. Red de haplogrupo generada por el programa *Network* para el linaje D4h3a. En rojo se muestran las mutaciones registradas.

Por otro lado, las comparaciones realizadas limitándose a los polimorfismos de la HVRI, permitieron aumentar el tamaño muestral y detectar afinidades adicionales con las muestras de Arazatí y La Viuda. En el primer caso, para el individuo Ar_A (Figura 9), se encontraron semejanzas con un haplotipo de Bolivia (Taboada-Echelar *et al.*, 2013) para el cual se hipotetiza una perteneciente al linaje C1d2a con una reversión en la posición 16051. Para el caso del individuo Ar_B (Figura 12) se encontraron dos secuencias idénticas, una de a Chile (Perego *et al.*, 2009) asignada al haplotipo D4h3a2, y otra del Chaco, Argentina (Sevini *et al.*, 2015) con el haplotipo D4h3a. Respecto a La Viuda, se registraron afinidades entre el individuo LV-TC (Figura 9) con uno de Brasil (Cardena, *et al.*, 2013) perteneciente al linaje C1b, y dos de Bolivia (Taboada-Echelar, *et al.*, 2013) correspondientes al haplogrupo C1.

5.4 Análisis de regresión logística

El modelo de regresión permitió conocer cuál de las dos variables consideradas (el largo del fragmento amplificado y la antigüedad de la muestra), influía más en el éxito de amplificación del segmento de genoma mitocondrial. Los resultados mostraron que únicamente la antigüedad de la secuencia tenía un peso estadísticamente significativo ($p < 0,05$), mientras que el largo tendría poca influencia ($p > 0,05$) (Tabla 8). Por ello, se procedió a generar un modelo basado únicamente en la antigüedad (Tabla 9).

Tabla 8: Resumen de la regresión logística usando como variables independientes la antigüedad de la muestra y el largo del fragmento.

	Coficiente	Error estándar	P
Intersección	4,1050883	2,1586452	0,057211
Antigüedad	-0,0023756	0,0006203	0,000128
Largo	-0,0088235	0,0151359	0,559927

Tabla 9: Resumen de la regresión logística usando como variable independiente la antigüedad.

	Coficiente	Error estándar	P
Intersección	2,9003367	0,5834542	$6,66 \times 10^{-7}$
Antigüedad	-0,0023704	0,0006195	0,00013

Observando el valor del estimativo del coeficiente de regresión obtenido para la variable antigüedad, se registra un valor de -0,0023704. El signo negativo está indicando una relación inversa entre antigüedad y probabilidad de amplificación; es decir, cuanto más antigua sea la muestra, menos eficiente es la amplificación. Con esta información, el siguiente paso consistió en estimar a partir de qué antigüedad, el éxito de amplificación se reduce a menos del 50%, lo que implicó buscar el punto en que el cociente entre probabilidad de éxito y probabilidad de fracaso es de 1. Para conocerlo se realizó el siguiente procedimiento:

$$y = \ln\left(\frac{p(\text{éxito})}{1-p}\right) = bx + a$$

Donde: y = probabilidad de amplificación, b = coeficiente de regresión, x = antigüedad,

a = intersección

Entonces,

$$y = \ln\left(\frac{p(\text{éxito})}{1-p}\right) = -0,0023704 \times \text{antigüedad} + 2,9003367$$

Y dado que $\ln(0,5/0,5) = \ln(1) = 0$,

$$0 = -0,0023704 \times \text{antigüedad} + 2,9003367$$

Por lo que

$$\text{antigüedad} = \frac{-2,9003367}{-0,0023704} = 1223 \text{ años}$$

Este resultado estaría indicando que, a partir de 1223 años radiocarbónicos, el éxito de amplificación disminuye a un 50% y, por ende, una muestra de mayor antigüedad conlleva una tasa de éxito menor a 50% (Figura 13).

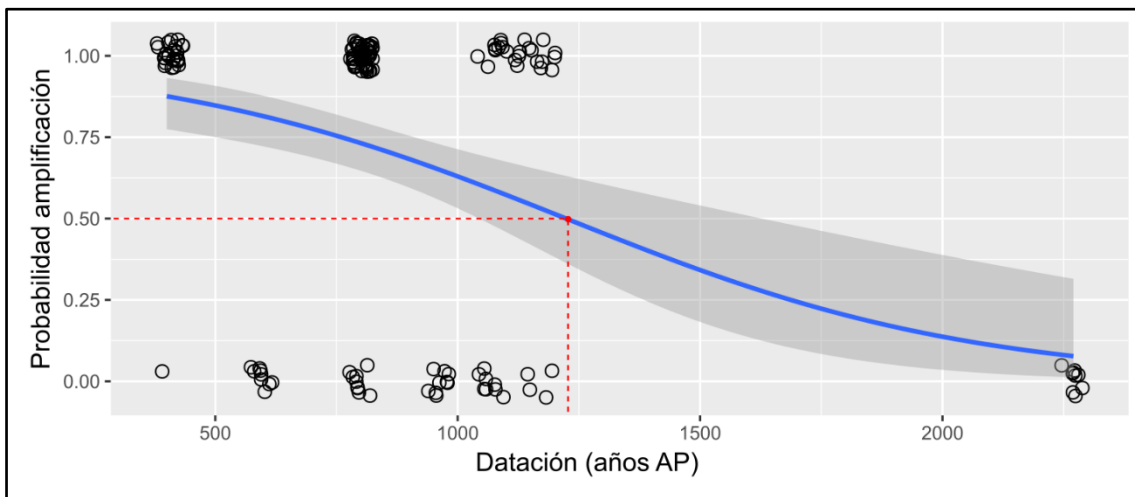


Figura 13. Gráfica de la función de la regresión con su correspondiente intervalo de confianza del 95%. En rojo se indica la antigüedad a la cual la probabilidad de éxito en la extracción es de 50%. Cada círculo representa el éxito o fracaso en la amplificación de la secuencia de un individuo.

6. Discusión

6.1 Éxito de las extracciones

Dos de los principales obstáculos que se presentan al trabajar con ADN antiguo son la degradación que se acumula a lo largo del tiempo, y su propensión a la contaminación con ADN moderno. Debido a distintos factores ambientales, la molécula de ADN puede presentar daños físicos o químicos, causando que la cantidad de material genético disponible para analizar sea muy reducida. Por este motivo, si hay contaminación con ADN moderno, la cantidad de este último va a superar ampliamente al número de moléculas de ADN antiguo, y en análisis con PCR esto es un impedimento ya que las amplificaciones generadas corresponderán al ADN exógeno, generando falsos positivos (Yang & Watt, 2005). Considerando estas problemáticas, en el presente trabajo se logró una alta tasa de éxito de las extracciones, consiguiendo obtener 107 secuencias correspondientes a segmentos de la HVRI y HVRII, de un total de 153 intentos de amplificación, es decir, un 70%. Este resultado es destacable al compararlo con los rendimientos obtenidos en otras investigaciones de la región. Uno de estos estudios fue el realizado por Figueiro (2013) en el cual se analiza el ADN mitocondrial de individuos provenientes de sitios arqueológicos del este y oeste de Uruguay, la región pampeana argentina y sur de Brasil, con un rango temporal que va de los 7800 años AP a los 250 años AP. En este caso, se logró una tasa de éxito del 53%, incluyendo los casos de uso de la técnica de PCR-RFLP para las muestras más antiguas.

En otro trabajo más reciente hecho por Anza (2023), se analizaron las regiones hipervariables I y II de individuos provenientes del sitio Colonia Concordia, Uruguay. Las dataciones realizadas en dos restos óseos humanos mostraron fechados de 1850 ± 100 y 1780 ± 70 años A.P. La tasa de éxito obtenida en este análisis fue de 11,8%, un valor que la autora relaciona a las características del ambiente del sitio (clima húmedo, temperatura y pH del suelo), la antigüedad de los restos, y la manipulación durante y después de su excavación (Anza, 2023).

Ambos trabajos tuvieron rendimientos notoriamente menores que los obtenidos en esta tesis. En parte, la alta tasa de éxito observada aquí se atribuye a los individuos provenientes del sitio Arazatí, para los cuales se logró amplificar prácticamente todos los fragmentos de las HVR (Tabla 7), y a las muestras de Punta del Este. Probablemente el éxito en el caso de Arazatí se deba a que presenta las cronologías más recientes (400 años A.P.) de las tres muestras estudiadas, lo cual podría estar influyendo en una mejor preservación del material genético.

Por otro lado, los restos de Punta del Este mostraron un rendimiento menor que el obtenido para los restos de Arazatí, amplificando 56 fragmentos de 72 (77,7%). Esto es coherente si se tiene en cuenta que el contexto de recuperación de estas piezas implica enterramientos en dunas. Estos yacimientos son los menos propicios para la preservación de restos óseos ya que, por un lado, el movimiento de la arena genera que éstos se cubran y descubran de forma intermitente. Por otro, estos contextos de médanos favorecen que el agua de la lluvia circule rápidamente, generando que las condiciones de humedad y temperatura presenten una gran variabilidad en muy poco tiempo, intensificando la degradación de los restos óseos. A su vez, en los yacimientos superficiales se le debe agregar los efectos de la exposición a la intemperie evidenciada en decoloraciones, fisuras y agrietamientos (Moreno, 2006). Este es el caso de varias piezas correspondientes a la colección Seijo (Silveira y Figueiro, 2020), lo cual podría estar explicando el menor rendimiento de estos restos en los procesos de amplificación. A esto se le debe agregar que el resto 42A2 se asocia a una muestra con una datación de 2270 ± 30 años AP., siendo la pieza más antigua de las tres muestras analizadas. Los fragmentos amplificados de 42A2 mostraron ser consecuencia de contaminación, por lo que su rendimiento de amplificación fue cero.

Los individuos provenientes del sitio La Viuda fueron los que presentaron el menor rendimiento en las extracciones, lo cual podría deberse a que presentan las cronologías más antiguas aparte del ya mencionado individuo 42A2: exceptuando LV 2-40, que presenta una datación de 593 ± 21 años AP, los restos presentan fechados que van de 959 ± 29 a 1131 ± 21 años AP.

En general, estos resultados muestran que la antigüedad de los restos óseos puede influir en el éxito de las extracciones, lo cual fue corroborado en este trabajo con los resultados de la regresión logística. Esto contrasta con lo observado por Figueiro (2013), en cuyo trabajo no constató una asociación entre ambas variables. Sin embargo, el autor analizó una muestra muy heterogénea en términos de cronología, profundidad, tipos de suelos, manipulación y preservación, lo cual impediría determinar en qué grado afecta cada variable a la calidad de los extractos obtenidos (Figueiro, 2013). Las muestras trabajadas aquí, si bien presentan cierta variabilidad, en general provienen de sitios costeros o próximos a cuerpos de agua, y preservados en colecciones particulares o institucionales. Los contextos costeros son poco favorables para la preservación de los restos y por ende del material genético, debido a los procesos diagenéticos que actúan sobre ellos, especialmente debido al tipo de clima, la alta humedad y condiciones sedimentológicas (Moreno, 2006). Considerando estas limitantes al trabajar con restos provenientes de la costa, y a los datos obtenidos de la regresión, se puede plantear que, a partir de 1200 años de antigüedad, las probabilidades de obtener extractos de calidad

son menores al 50%. Sería posible ampliar la aplicabilidad de este modelo a otros contextos ambientales mediante la inclusión de variables relacionadas al entorno tales como tipo de sedimento y humedad en futuros modelos.

Teniendo en cuenta que los trabajos de extracción de ADN implican una destrucción de parte del material óseo, la antigüedad de los restos es un dato a considerar al momento de decidir si es conveniente efectuar este tipo de análisis.

6.2 El dato arqueológico y el dato genético

6.2.1 Estimación del número mínimo de individuos (NMI)

Los análisis genéticos son de gran utilidad para el estudio de restos óseos antiguos, especialmente para aquellos materiales para los cuales no se cuenta con información del contexto arqueológico. Los estudios genéticos pueden aportar datos que ayuden a esclarecer incógnitas derivadas de la falta de contexto, tales como el número de individuos presentes, así como otros datos que ayuden a profundizar en el estudio de las poblaciones pasadas, como es el caso del análisis de los vínculos de parentesco o vínculos con otros sitios o regiones.

En el presente trabajo uno de los objetivos planteados fue la estimación del número mínimo de individuos (NMI) de las muestras, ya que, en casos como la colección Seijo, la documentación disponible se contradice con las piezas presentes en la muestra. Si se recurren a los datos bibliográficos (Seijo, 1923 y 1930) para la muestra de Punta de Este, se observa que el autor menciona la presencia de dos cráneos infantiles, uno de ellos hallado en el interior de un médano a poca profundidad. Los únicos datos proporcionados por el autor señalan que se correspondería a un individuo de 8 o 9 años, con un gran desgaste en la dentición decidua (Seijo, 1923). Respecto al segundo cráneo infantil (Figura 14), Seijo menciona que fue hallado en la misma península que el primer cráneo, debajo de una capa de arena a poca profundidad. Según el autor, este individuo también tendría 8 o 9 años; sin embargo, aclara que sería un poco más joven que el primer cráneo. Nuevamente señala el gran desgaste dental lo cual atribuye a una dieta abrasiva. Se destaca en este caso, la presencia de varias valvas de moluscos con un orificio central, interpretadas como restos de un collar asociado al cráneo.



Figura 14. Del lado izquierdo se observa el fragmento de cráneo correspondiente a un individuo infantil de Punta del Este, y a la derecha el mismo cráneo fotografiado por Carlos Seijo (1930). El temporal 42C28B corresponde a estos restos.

En ambos casos, los cráneos se habrían exhumado de forma aislada, sin restos poscraneales asociados. Sin embargo, en la colección Seijo se pueden encontrar varios huesos largos (fémures y tibias) de subadulto, así como restos de un isquion y un ilion, también de subadulto. Respecto a la presencia de los cráneos en la muestra, únicamente se confirmó el correspondiente al subadulto enterrado con el collar de valvas (Figura 14). En el trabajo de Silveira y Figueiro (2020), se discute la posibilidad de que los huesos largos puedan corresponderse a un mismo individuo, e incluso que se correspondan con el cráneo infantil, ya que los huesos largos tendrían una edad en el rango de entre 5 y 8 años, solapante con el del cráneo (Silveira y Figueiro, 2020). En este trabajo se profundizó en esta discusión a la luz de los nuevos datos genéticos generados. En primer lugar, al cráneo infantil (42C28B), como ya se mencionó, no se lo pudo considerar para los análisis ya que se obtuvieron pocas secuencias de baja calidad. Sin embargo, sí hubo éxito en las amplificaciones para los huesos largos, es decir para uno de los fémures (42C23) y para el isquion (42C28). En la primera amplificación realizada se obtuvieron secuencias casi idénticas correspondientes al haplogrupo C1d, con un par de diferencias: una mutación C-T en la base 194 para 42C23 y T-C en la base 195 para 42C28. Es llamativo que ambas secuencias tengan una mutación casi en la misma posición, en dos bases contiguas. En el caso de 194T podría tratarse de una transición C a T debido a daños en el ADN (Hofreiter *et al.*, 2001) y no de una mutación auténtica. En este escenario, la única diferencia sería la presencia de 195C en 42C28, lo cual permitiría hipotetizar que, si bien ambas secuencias corresponderían individuos distintos, éstos tendrían un vínculo de parentesco por vía materna. Por otro lado, la posición 195 es un sitio muy variable (Soares, 2009) por lo

cual se puede considerar que el estado 195T en 42C23 sea un artefacto de daño *post mortem*, en cuyo caso no habría diferencias entre ambas secuencias, tratándose de un mismo individuo. Conjuntamente, no es menor el hecho de que ambas secuencias presenten una mutación poco frecuente (Soares, 2009) en la posición 16327. Este hecho junto al alto grado de similitud entre ambas secuencias, permiten pensar que 42C23 y 42C28 podrían llegar a tener un vínculo cercano por vía materna o incluso ser el mismo individuo, como se plantea en Silveira y Figueiro (2020). Para intentar esclarecer esta situación, se realizó una nueva tanda de amplificación para las dos muestras, donde se halló 194T, pero no se confirmó 195C. En el caso de 42C23, se confirmó la presencia de 194T. Con estos nuevos datos, se puede suponer que se traten del mismo individuo, aunque, por ahora, se sigue tratando de un poscráneo aislado.

Estas dos muestras son las únicas de toda la colección de Punta del Este que presentaron similitudes, considerando a todas las demás como individuos distintos. Es decir, las cinco muestras que se pudieron secuenciar corresponderían como mínimo a cuatro individuos presentes en la colección Seijo. Queda pendiente determinar la correspondencia del cráneo 42C28B a los restos de poscráneo; como se detalla en Resultados, las secuencias obtenidas fueron excluidas de este análisis por su baja calidad, pero los resultados preliminares sugieren que se trataría de un individuo adicional por su pertenencia al subhaplogrupo C1d3.

En el caso de la muestra de Arazatí, los datos genéticos obtenidos en este trabajo también fueron de utilidad para ayudar a estimar el número de individuos presentes. Los datos bibliográficos (Beovide *et al.*, 2014) mencionan la presencia de un cráneo completo (individuo 1), fragmentos de neurocráneo y maxilar (individuo 2), y restos de poscráneo. Todas las piezas se corresponderían a individuos subadultos. Como ya se mencionó previamente, la asociación de los huesos largos con alguno de los cráneos no era clara, aunque los datos de edad (Beovide *et al.*, 2014) y las posteriores dataciones obtenidas para ambos individuos (G. Figueiro, comunicación personal), estarían señalando que los restos poscraneales se corresponderían con el individuo 2. A partir de los datos bioarqueológicos, se puede afirmar que la muestra presenta como mínimo dos individuos. Los restos poscraneales pueden corresponderse al individuo 2, o ser un individuo separado, en cuyo caso el NMI aumentaría a tres. Debido a este escenario, en este trabajo se amplificaron segmentos de las HVR correspondientes a los dos cráneos (Ar-A = individuo 1 y Ar-B = individuo 2) así como de un resto del poscráneo (Ar-H, húmero). Las secuencias obtenidas para Ar-B y Ar-H son idénticas, indicando que se tratarían del mismo individuo. De esta forma, se puede sostener que la muestra de Arazatí estaría conformada por dos individuos infantiles.

Respecto a la muestra de La Viuda, los análisis bioarqueológicos realizados previamente por Cáceres (2022) ya mencionaban un número mínimo de seis individuos presentes en la muestra, cada uno con una datación asociada las cuales confirman este dato. La alta degradación de ADN que presentaron los fragmentos obtenidos causó que solo se logaran asignar un haplogrupo a dos de las seis muestras (LV-TC y LV-2-43). Si bien estos individuos presentan dataciones similares, se constataron diferencias a nivel macroscópico (Cáceres, 2022) y también a nivel de secuencias. En este sentido, los polimorfismos observados en cada caso manifestaron que se trata de dos individuos distintos, ambos pertenecientes al haplogrupo indígena C1.

6.2.2 Inferencias sobre modalidades de entierro

La bibliografía referente a los hallazgos de Arazatí dan pocos datos respecto a los patrones de enterramientos observados. El trabajo original de Penino (1957) se centra en una descripción física de los cráneos subadultos presentes, para pasar luego a detallar las modalidades de enterramiento en los grupos indígenas de la región. Trabajos posteriores (Beovide *et al.*, 2014, 2015, 2019, 2021, entre otros) se ocupan de analizar los ajuares asociados a los restos óseos, fundamentalmente, los collares realizados con valvas de moluscos, incluyendo en algunos casos, estudios bioarqueológicos de los restos juveniles. Sin embargo, no se ha profundizado en las modalidades de enterramiento observadas en este sitio. Los patrones funerarios de Arazatí son llamativos debido, en primer lugar, a la presencia de restos subadultos, los cuales son poco frecuentes en sitios arqueológicos. Por ejemplo, Sans (1988) registra un 7,1% de restos infantiles en todo el territorio nacional. Este subregistro podría responder a diferencias en las pautas de enterramientos de los niños (Sans, 1999), o a factores vinculados con la identificación de los restos infantiles ya que muchas veces aparecen mezclados con restos de fauna (Moreno *et al.*, 2014). En segundo lugar, se destaca la presencia de sedimentos con hematita (“ocre”) asociado a un conjunto de las valvas perforadas, las cuales formarían un collar (Beovide *et al.*, 2019, 2021), y podrían estar indicando un estatus social diferencial dentro del grupo.

Por último, merece especial atención el individuo A de Arazatí, que constituiría un cráneo subadulto aislado. Un trabajo realizado por Gascue (2019), donde realiza un extenso análisis de las manifestaciones funerarias a lo largo del litoral del Río Uruguay, menciona que solo el 0,9% de las piezas registradas, son aisladas. Conjuntamente, constata que los restos infantiles son escasos y en su mayoría se encuentran en enterramientos múltiples. Estos datos se corresponden a los hallazgos de Arazatí. La

presencia de restos aislados es frecuente en la literatura de la región, atribuyéndolo a un carácter intencional o debido a los procesos de formación de sitio, siendo arrastrados con los materiales de construcción (Moreno *et al.*, 2014). En el caso de Arazatí, podría corresponderse con la hipótesis de una modalidad de enterramiento secundario, respondiendo a tratamiento diferenciales para distintos grupos sociales. Hasta el momento, no se cuenta con suficientes datos arqueológicos que puedan confirmar o rechazar esta hipótesis. Los análisis bioarqueológicos del cráneo (Beovide *et al.*, 2014) no mencionan la presencia de marcas de corte, por lo tanto, no habría indicios de un procesamiento que indiquen la separación *ex profeso* del cráneo. En este sentido, se puede suponer que Penino no haya recogido los huesos poscraneales; sin embargo, el hecho de que sí haya recuperado los restos correspondientes al otro cráneo pone en duda esta suposición. Lamentablemente, el trabajo de Penino (1957) no brinda suficiente información al respecto. Por otro lado, no es menor que ambos subadultos presentan dataciones solapantes (410 ± 30 AP y 400 ± 30 AP), lo cual estaría indicando que probablemente fallecieron y fueron enterrados al mismo tiempo. Los datos genéticos obtenidos en este trabajo mostraron que las secuencias de ambos individuos son lo suficientemente distintas como para descartar un vínculo por línea materna. Por lo tanto, se trataría de un enterramiento múltiple con individuos no emparentados.

Una situación similar se observa en la colección de Punta del Este con los dos enterramientos infantiles. Si bien en ambos casos se rescatan únicamente los cráneos, no está claro que hayan sido enterrados en forma aislada intencionalmente. En particular, para el subadulto menor, Seijo (1930) aclara que no se encontraron los restos poscraneales pero que los mismos pudieron haberse destruido durante la excavación ya que el cráneo se encontraba en posición vertical. Por su lado, para el subadulto mayor, Seijo no proporciona ningún dato respecto a los demás elementos óseos, limitándose a describir el cráneo (Seijo, 1923). Como ya se mencionó previamente, no se logró secuenciar con éxito el cráneo infantil, y por lo tanto no se logró establecer si se correspondía o no con los huesos poscraneales infantiles presentes en la colección. Si se consideran los datos brindados por el autor (Seijo, 1923 y 1930), entonces los huesos largos no se corresponderían con ninguno de los cráneos presentes. Esto sería un elemento a favor de la presencia de un enterramiento aislado, especialmente para el caso donde Seijo no da información al respecto (Seijo, 1923). De ser este el caso, nuevamente se trataría de un enterramiento infantil aislado, como se registró para Arazatí. Asimismo, al igual que uno de los esqueletos de Arazatí, el subadulto mayor de Punta del Este también presentó un collar hecho a partir de valvas. Lo llamativo de este hecho, es que las valvas utilizadas en ambos casos corresponden a moluscos

provenientes de la costa atlántica (Beovide *et al.*, 2019), lo cual podría indicar algún tipo de vínculo entre ambos grupos. Si bien, en este trabajo, no se detectó un vínculo por linaje materno a nivel de secuencias, es probable que los grupos del oeste y sureste del país hayan mantenido un contacto que posibilitó el intercambio de recursos observado en los enterramientos.

6.3 Contactos poblacionales

Los diversos vínculos detectados entre las poblaciones estudiadas con otras de la región se encuentran resumidos en la figura 15. A continuación, se van a discutir estos contactos en términos de distancia, diferenciando las afinidades con otros grupos dentro del territorio uruguayo, y con grupos fuera del país.

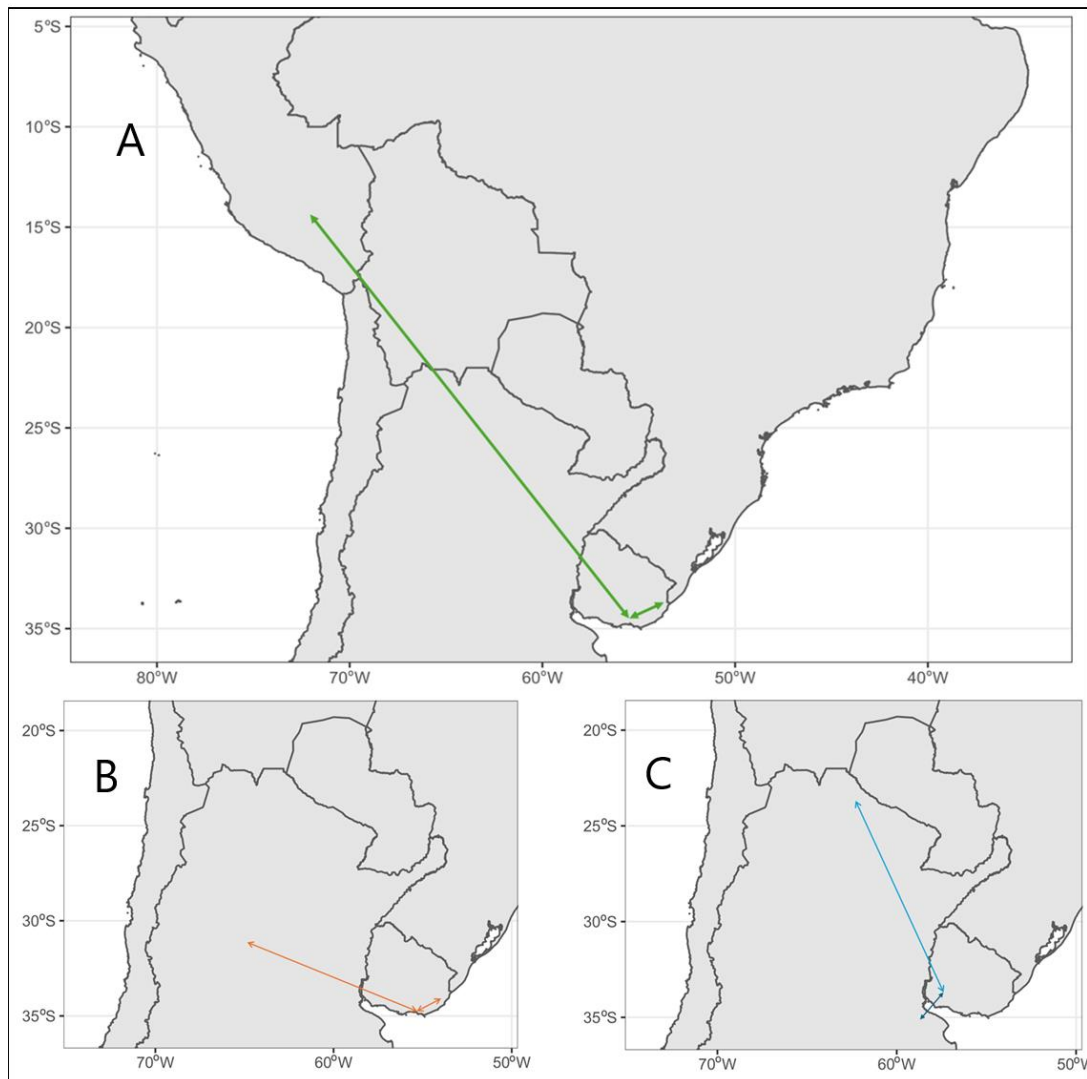


Figura 15. Resumen de los vínculos detectados. A: Vínculo entre Maldonado con La Viuda y entre Maldonado con Perú. B: Vínculo entre La Viuda y Maldonado, y entre La Viuda con Córdoba (C1d3). C: Vínculo entre Arazatí con el Delta del Paraná y entre Arazatí con El Chaco (D4h3).

6.3.1 Afinidades regionales a corta distancia

Los datos obtenidos en este trabajo manifestaron una afinidad genética entre las poblaciones de Punta del Este (Maldonado) y los grupos constructores de *cerritos de indios* de Rocha. Esta afinidad se basa en el hallazgo de un individuo con el subhaplogrupo C1d3 en Punta del Este (42B-3), el cual, previo a este trabajo, solo había sido registrado a nivel arqueológico en individuos provenientes de los cerritos (Sans *et al.*, 2012). Ha sido detectado en individuos modernos del país, por lo cual presenta una continuidad en la población de Uruguay hasta la actualidad (Sans *et al.*, 2015). Este subhaplogrupo fue definido como de origen local ya que se encuentra mayoritariamente en Uruguay, hallando hasta el momento un solo caso fuera de Uruguay (García *et al.*, 2018).

La implicancia de hallar este subhaplogrupo en Punta del Este podría estar indicando que ambas poblaciones (Maldonado y Rocha) mantenían algún tipo de contacto, ya sea sostenido en el tiempo o puntual. Sería necesario secuenciar mayor cantidad de individuos de Punta del Este para profundizar en este vínculo.

Por otro lado, tanto en individuos de Punta del Este como de La Viuda se constató la presencia del haplogrupo C1, el cual también ha sido registrado previamente en individuos provenientes de cerritos (Sans *et al.*, 2012 y 2015). En este caso se podría hipotetizar sobre la presencia de una misma población desde el punto de vista biológico, la cual se ha adaptado de manera diferencial a los distintos ambientes de la costa atlántica. Este hecho se lo puede ver reflejado en la diversidad económica en cada una de las poblaciones. Los grupos de Punta del Este, adaptados a ambientes costeros de médanos, muestran indicios de una dieta marina. Esto se manifiesta en el alto desgaste dental presente en todos los individuos y baja frecuencia de caries, siendo ambas características propias de grupos que explotan los recursos marinos (Silveira y Figueiro, 2020). En otro trabajo realizado por Bracco y colegas (2000), se analizan los valores de estroncio e isótopos estables de carbono-13 (^{13}C) para determinar su frecuencia en individuos de Punta del Este, Rocha, Salto, Paysandú y Soriano. Los resultados obtenidos demostraron que la mayoría de las poblaciones estudiadas se corresponderían con una dieta continental. La excepción sería Punta del Este, cuyos altos valores de ^{13}C estarían indicando la presencia de pescadores de ambiente marino (Bracco *et al.*, 2000)¹. La explotación de los recursos costeros no solo se observa en los

¹ Datos recientes (G. Figueiro, com. pers; M. Caporale, com. pers.) corroboran estos valores, agregando además valores altos para nitrógeno-15 (42A2: $\delta^{13}\text{C}$ -17,8; $\delta^{15}\text{N}$ +11,7; 42C23: $\delta^{13}\text{C}$ -16,8; $\delta^{15}\text{N}$ +13,3).

análisis directos sobre los huesos (Bracco *et al.*, 2000; Silveira y Figueiro, 2020), sino también en los contextos arqueológicos. En este sentido, investigaciones arqueológicas realizadas en los últimos años en sitios costeros de Maldonado, han hallado restos de fauna marina para el consumo, con predominancia de los lobos marinos *Otaria flavescens* y *Arctocephalus australis* (Caporale *et al.*, 2019).

Por otro lado, los grupos del este (Rocha), presentan un panorama distinto. Se registra un menor desgaste dental, y una mayor presencia de caries en estos individuos, la cual ha sido asociada al consumo frecuente del fruto de butiá (*Butia capitata*) y el pindó (*Syagrus romanzoffiana*) (Portas y Sans, 1995). Incluso se propuso la presencia de una agricultura incipiente como complemento de la dieta (Sans *et al.*, 1997). A esto se le agrega los valores isotópicos hallados por Bracco y colegas (2000), quienes adjudicarían una dieta continental para los grupos de Rocha.

En un trabajo previo (Silveira, 2018) se menciona que las diferencias observadas a nivel bioarqueológico y arqueológico, entre las poblaciones de Maldonado y Rocha, parecerían indicar que no se trataría de una misma población que habitó ambos ambientes, aunque es probable que se trate de una misma población desde el punto de vista genético. La presencia de individuos con haplogrupos C1, C1d y C1d3 en las muestras de Punta del Este y La Viuda registrados en este trabajo, estarían apoyando esta hipótesis de una misma población biológica, con manifestaciones culturales distintas adaptadas a los ambientes costeros.

6.3.2 Afinidades regionales a larga distancia

Las cuatro redes de haplotipos generadas en este trabajo reflejaron que los vínculos más cercanos se dan con poblaciones de Argentina. Es llamativo que se hayan registrado escasos contactos con Brasil, especialmente entre el sur de este país y los individuos de La Viuda. La presencia en ambas regiones de montículos antrópicos, así como la relativa proximidad geográfica, llevaría a esperar una afinidad genética entre ambas poblaciones, la cual no se registró o fue muy lejana. Sin embargo, esto podría deberse a un sesgo en los datos ya que se cuenta con una mayor cantidad de información para muestras provenientes de Argentina (Bobillo *et al.*, 2010; Perego *et al.*, 2010; Catelli *et al.*, 2011; Bodner *et al.*, 2012; De Saint Pierre *et al.*, 2012; Sala *et al.*, 2014, 2019; Sevini *et al.*, 2014; Motti *et al.*, 2015; Llamas *et al.*, 2016; García *et al.*, 2018, 2021; Arencibia *et al.*, 2023) que para otras regiones, como por ejemplo, Brasil (Perego *et al.*, 2009, 2010; Bodner *et al.*, 2012; Cardoso *et al.*, 2013; Avila *et al.*, 2019; Guevara *et al.*, 2020). Esta disparidad en los datos genera que los resultados obtenidos deban

ser interpretados con cautela, sin poder llegar a darle un carácter cuantitativo a los vínculos con una u otra región. No obstante, sí se pueden discutir los vínculos que efectivamente se observaron con cada una de las muestras analizadas.

Considerando la información existente hasta el momento para la región, merece la pena profundizar en las afinidades registradas con Argentina, especialmente cuando se toma en cuenta la información arqueológica. Los individuos Ar-A y Ar-B del sitio Arazatí, presentaron vínculos cercanos con haplotipos de San Luis y El Chaco respectivamente, ambas provincias de Argentina (Figuras 9 y 12). A nivel arqueológico, sin embargo, se han detectado similitudes en estilos cerámicos entre sitios costeros del oeste de Uruguay, incluyendo Arazatí, y la cuenca del río Paraná medio e inferior, y la margen derecha del río Uruguay inferior. Estas similitudes están vinculadas a la presencia de alfarerías conocidas como *campanas zoomórficas*, las cuales reciben dicho nombre debido a la presencia de apéndices modelados en la parte superior generalmente con forma animal (Malán, 2022). En Argentina se ha vinculado estos materiales a la cultura de los Ribereños Plásticos según Serrano (1972), posteriormente denominada Entidad Arqueológica Goya-Malabrigo (Politis y Bonomo, 2012). Presentan dataciones que van de los 2000 años AP las más antiguas, hasta momentos alrededor del contacto (López Mazz, 2018 en Malán, 2022). No está clara la función de estas campanas, atribuyéndoles un carácter ceremonial, como objetos de ajuares funerarios, hasta funciones utilitarias como la conservación del fuego (Politis & Bonomo, 2012). En Arazatí, hay registros de dos campanas obtenidas por Penino a través de excavaciones asistemáticas, actualmente extraviadas (Figura 16). Hasta el momento, son las únicas en el territorio uruguayo asociadas a contextos funerarios (Malán, 2022). Este punto es especialmente relevante si se considera el trabajo realizado por Loponte y colegas (2019), quienes analizan un conjunto de campanas zoomorfas provenientes de varios sitios de la cuenca del Paraná sobre el territorio argentino. A través de la revisión de las



Figura 16. Comparación entre las campanas zoomorfas de Uruguay y Argentina. A la izquierda se observan las campanas zoomorfas halladas en el sitio Arazatí (tomado de Malán, 2022), y a la derecha las campanas provenientes del sitio Tres Cerros, delta inferior del Paraná (Argentina) (tomado de Bonomo *et al.*, 2019).

crónicas históricas, y de diversos análisis sobre la composición de los materiales empleados en la elaboración de estas cerámicas, los autores llegan a la conclusión de que la función más probable sería como parte de ritos mortuorios. Se plantea que no hay evidencias de un uso doméstico, descartando funciones utilitarias (Loponte *et al.*, 2019). Si se sigue esta idea, las campanas de Arazatí no solamente tendrían una similitud estética con las del territorio argentino, sino también similitud en la función como ajuar funerario. Estas semejanzas podrían estar indicando algún tipo de vínculo entre las poblaciones de ambas regiones, relacionado a contactos puntuales o que, eventualmente, se trate de una misma población. Si se considera la segunda hipótesis, lo esperable sería encontrar semejanzas genéticas entre los individuos de Arazatí y del bajo río Uruguay y Paraná inferior. Considerando que únicamente se cuenta con dos individuos para esta región de Argentina (Bobillo *et al.*, 2010 y Catelli *et al.*, 2011), es posible que este vínculo exista, pero sería necesario ampliar la muestra del bajo río Uruguay para detectarlo. Las afinidades entre los individuos de Arazatí y las provincias de San Luis y el Chaco, observadas en este trabajo, no se podrían explicar a través de la presencia de las campanas zoomórficas, ya que este tipo de alfarería en Argentina se ha registrado únicamente en los sitios de la manifestación Goya-Malabrigo (localizados en Corrientes y Santa Fe y al noreste de Buenos Aires - Politis & Bonomo, 2012). No obstante, no se puede descartar una afinidad del centro/norte de Argentina con el fenómeno Goya-Malabrigo, lo cual podría explicar los vínculos observados con Arazatí.

Es de particular interés el vínculo entre Ar-B con el Chaco ya que, este individuo de Arazatí presentó los polimorfismos correspondientes al subhaplogrupo D4h3a, siendo el único caso hasta el momento donde se registró dicho linaje en Uruguay. Es llamativa la presencia de este subhaplogrupo en particular ya que es característico del sur de la Patagonia argentina y chilena (Parolin *et al.*, 2019), aunque también se lo ha registrado, en menor frecuencia, en el norte de Argentina (Martínez, 2018). La presencia de este linaje en Arazatí podría deberse a la llegada de migrantes desde el norte de Argentina, ya sea de la región chaqueña, Patagonia o, más lejos, de la región andina. Por el momento no se cuenta con suficientes datos que permitan esclarecer mejor este vínculo.

Por otro lado, los *networks* correspondientes a los haplogrupos C1d y D1 mostraron afinidades genéticas entre dos individuos de Punta del Este (42C23+42C28 y 42E4C) y poblaciones de Perú (Perego *et al.*, 2010; Llamas *et al.*, 2016 y Barbieri *et al.*, 2017). En total se registraron cuatro vínculos, tres para 42C23+42C28 de los cuales dos son cercanos con solo uno o dos pasos mutacionales, y uno para 42E4C, aunque en este último caso la afinidad es lejana (Figura 10). Estas afinidades, si bien resultaron

llamativas en un principio, cobran sentido a la luz de dos hipótesis poblacionales. La primera de ellas se basa en un trabajo reciente donde se menciona una nueva hipótesis para el poblamiento de América. En dicho trabajo, Campelo dos Santos y colegas (2022) proponen una nueva ruta migratoria para Sudamérica en base a las evidencias genómicas. Los autores proponen un ingreso desde Norteamérica hacia el sur del continente, dispersándose por la costa del Pacífico y asentándose en los Andes. Desde este punto se habría producido una divergencia, migrando una parte de la población hacia el este, a la costa atlántica (Campelo dos Santos *et al.*, 2022). En este sentido, los vínculos observados en este trabajo entre Punta del Este y Perú, podrían ser el resultado de la ruta migratoria conectando el Pacífico con el Atlántico. Conjuntamente, en ambos *networks* se observa que los individuos de Perú son derivados de los correspondientes a Punta del Este, lo cual podría estar reforzando esta hipótesis. En este caso, se trataría de un vínculo lejano entre ambas poblaciones por ancestría común.

La segunda hipótesis se basa en el vínculo entre grupos de Argentina y la región andina durante el Holoceno tardío, manifestado a través de evidencias arqueológicas que también se registran en Uruguay. Estas manifestaciones consisten en la presencia de placas de cobre utilizadas como ajueres funerarios en enterramientos humanos. En Argentina estos materiales fueron hallados en diversos sitios del delta medio e inferior del Paraná (Bonomo *et al.*, 2014 y 2019). Junto a las placas también se encontraron pendientes y cuentas hechas en cobre puro y en bronce, así como otros elementos de origen animal y líticos. Se plantea que la mayoría de las poblaciones prehispánicas de las Tierras Bajas de Sudamérica no fabricaban elementos con metal, sino que estos eran obtenidos por intercambio con poblaciones de la cordillera de los Andes o alguna otra como intermediaria. Estos materiales habrían recorrido largas distancias antes de llegar al Paraná, incluso se plantean tres posibles rutas: por el río Carcarañá en la provincia de Córdoba, por los ríos Salado-Dulce atravesando Santiago del Estero, y por el corredor Paraná-Paraguay a través del Chaco (Bonomo *et al.*, 2019). Por su lado, en Uruguay, se ha registrado la presencia de tres placas de cobre en un enterramiento humano en el sitio Punta Chaparro, en la localidad de Nueva Palmira, departamento de Colonia (Fontana, 1930; Gascue *et al.*, 2019). Los autores no aportan mayores datos respecto a la presencia de estos materiales, sin embargo, se puede hipotetizar que fue producto de contacto con las poblaciones del actual territorio argentino debido a la proximidad geográfica entre los sitios. Consecuentemente, Uruguay habría mantenido un contacto indirecto con los grupos andinos a través del intercambio de materiales con las poblaciones de Argentina. Estos episodios de contacto podrían haber posibilitado en cierta medida, procesos de flujo génico los cuales explicarían las afinidades genéticas

registradas en este trabajo entre Uruguay y Perú. Esta segunda hipótesis estaría señalando un vínculo temporalmente cercano por contacto poblacional.

En el caso del individuo 42E4C también se destaca un vínculo cercano (dos pasos mutacionales) con un haplotipo de Paraguay. Este dato no es llamativo si se considera la presencia en Uruguay de guaraníes misioneros. La presencia de misiones jesuíticas se da junto al inicio de la explotación ganadera en el siglo XVII, instalándose principalmente al norte del país (Barreto y Curbelo, 2010) y recibiendo indígenas de toda la región, incluyendo el Chaco y el actual Paraguay. Esta inserción de indígenas misioneros va a generar un lento proceso de mestizaje desde finales del siglo XVIII y hasta mediados del siglo XIX (Barreto y Curbelo, 2009), lo cual podría explicar la afinidad genética registrada en este trabajo.

7. Conclusiones y perspectivas futuras

A lo largo de este trabajo se ha demostrado la utilidad de incluir análisis genéticos en el estudio de muestras óseas arqueológicas almacenadas en museos con muy pocos datos contextuales. Se destaca en este caso la alta tasa de éxito obtenida en las extracciones (70%), superando los rendimientos obtenidos en otros trabajos recientes para la región. Este éxito fue notorio en los individuos de Arazatí, logrando amplificar prácticamente todos los fragmentos para las HVRI y II, lo cual probablemente responda a que presentan una cronología temprana (400 años AP). Punta del Este presentó un rendimiento menor al de Arazatí. Es probable que el contexto de dunas del cual provienen los restos óseos de esta colección (el cual es poco favorable para la preservación del material genético - Moreno, 2006), así como una cronología más temprana (800 años AP, llegando un caso a 2300 años AP), esté influyendo en estos resultados. Por su parte, los individuos de La Viuda mostraron la tasa de rendimiento más baja, lo cual se lo atribuye a tener la cronología más antigua de las tres muestras en general, con dataciones que van de 959 ± 29 a 1131 ± 21 años AP.

Estos datos parecerían estar indicando que la antigüedad de los restos óseos estaría influyendo en el éxito de las extracciones. Este hecho fue corroborado a través de la regresión logística, que evidenció que, entre el largo de la secuencia y su antigüedad, esta última tendría un mayor peso en el rendimiento. A partir de este análisis se propone una edad de 1200 años como la cronología máxima para la que la probabilidad de éxito supera a la de fracaso en la extracción.

Por otro lado, los análisis realizados permitieron esclarecer escenarios confusos respecto al número de individuos presentes, lo cual es una situación frecuente al trabajar con colecciones de museos. Para la muestra de Arazatí se confirmó la presencia de dos individuos subadultos, el cual uno de ellos estaría representado por un cráneo aislado. La combinación de los datos arqueológicos y genéticos permitió pensar en un enterramiento múltiple de dos individuos, con un cráneo aislado, los cuales habrían sido enterrados al mismo tiempo o en fechas muy próximas. Los individuos habrían sido enterrados junto a sedimentos con hematita (“ocre”) y un conjunto de valvas perforadas, las cuales formarían un collar. Estas últimas tendrían una procedencia de la costa atlántica (Beovide *et al.*, 2019, 2021).

Respecto a la muestra de Punta del Este, se logró aportar datos referentes al número de subadultos presentes. La bibliografía menciona la presencia de dos cráneos infantiles sin restos poscraneales asociados (Seijo, 1923 y 1930), lo cual generaba interrogantes respecto a los huesos largos infantiles presentes actualmente en la colección. Los análisis realizados en este trabajo permitieron confirmar la correspondencia entre los huesos largos entre sí, y en primera instancia, no se corresponderían a ninguno de los dos cráneos presentes. De esta forma, los enterramientos de Punta del Este implicarían tres inhumaciones infantiles, de los cuales uno podría corresponderse a un cráneo aislado. En uno de los casos nuevamente se registró la presencia de un conjunto de valvas formando un collar (Seijo, 1923 y 1930). Estas semejanzas arqueológicas con los enterramientos de Arazatí estarían indicando algún tipo de contacto entre ambas poblaciones que seguramente involucró el intercambio de recursos, sin embargo, en este trabajo no se registró un vínculo genético entre ambas.

La asignación de linajes a las secuencias reflejó una predominancia del haplogrupo C1 y sus subhaplogrupos, concordante con la hipótesis planteada inicialmente para este trabajo. Se destaca la presencia de un individuo de Punta del Este correspondiente al linaje C1d3, el cual únicamente se lo había detectado a nivel arqueológico en el departamento de Rocha. Este hecho, así como el registro de individuos C1 en el sitio La Viuda, estaría sugiriendo la presencia de una única población biológica pero culturalmente distintas, adaptadas a los distintos ambientes de la costa atlántica. Los datos isotópicos y anatómicos realizados en trabajos previos evidenciaron estas diferencias culturales, mientras que los datos genéticos reflejaron el origen común de estos grupos.

Respecto a los vínculos con la región, se esperaba encontrar afinidades entre los individuos de La Viuda y el sur de Brasil debido a las similitudes culturales y la proximidad geográfica. Sin embargo, no se detectaron estos vínculos o fueron muy lejanos, predominando las afinidades con Argentina en general. Estos resultados se explicarían por la gran acumulación de información que se cuenta para Argentina en contraposición a Brasil y, por ende, no se descarta un vínculo genético entre este último y los grupos de La Viuda. Por otro lado, se registraron afinidades entre los individuos de Arazatí y dos haplotipos de Argentina, específicamente el Chaco y San Luis. La revisión de la bibliografía evidenció similitudes arqueológicas entre grupos del oeste de Uruguay, incluido Arazatí, con el centro en Argentina, referidas a la presencia de cerámicas zoomorfas (Malán, 2022; Bonomo *et al.*, 2019). Probables vínculos entre el centro y

norte de Argentina entre sí podrían explicar la afinidad observada entre Arazatí y el norte de ese país. Se destaca dentro del vínculo con el Chaco, la correspondencia del individuo Ar-B de Arazatí al subhaplogrupo D4h3a ya que es el primer caso de este linaje registrado en Uruguay. Considerando que D4h3a es típico de la Patagonia argentina y chilena, se puede plantear que su presencia en el territorio uruguayo sea el resultado de una migrante proveniente desde el norte de Argentina, de la Patagonia o de la región andina.

Por su parte, las afinidades genéticas registradas entre Punta del Este con haplotipos de Perú podrían ser un elemento a favor de la hipótesis para el poblamiento americano planteada por Campelo do Santos y colegas (2022), la cual propone una ruta migratoria que vincularía a la costa pacífica con la atlántica. En este caso, las afinidades con Perú implicarían una ancestría común. Una explicación alternativa sería un contacto indirecto entre los grupos andinos con los de Uruguay, observada en la presencia de placas de cobre en contextos de Argentina. Autores como Bonomo y colegas (2019) plantean que estos materiales habrían llegado a Argentina a través de contactos con los grupos andinos. Es plausible que estos contactos hayan derivado en procesos de flujo génico los cuales podrían explicar las afinidades observadas entre Perú y Uruguay.

7.1 Perspectivas futuras

Como último punto, vale la pena mencionar que los resultados expuestos aquí, si bien son informativos, se pueden profundizar aún más con futuros análisis. Uno de ellos consiste en la aplicación de la técnica Secuenciación de Nueva Generación (NGS) a varias escalas. A una escala mayor, se aplicaría para la obtención de genomas mitocondriales completos. A una menor escala, puede aplicarse a los productos de PCR para afrontar la problemática de la contaminación de las muestras con ADN exógeno, lo cual generó el descarte de varias piezas en este trabajo. La aplicación de secuenciación masiva, utilizando a los productos de PCR como moldes, permitiría distinguir las secuencias antiguas de las contaminantes, y de esa forma se verificaría su autenticidad. Adicionalmente, permitiría confirmar la presencia de daños en el ADN. Este punto se podría aplicar a casos como el correspondiente al individuo 42E2 de Maldonado, el cual a pesar de tener la reversión 16327 (al igual que los individuos 42C23 y 42C28), no se pudo ubicar como perteneciente al linaje C1d ya que no presentó el polimorfismo 16051 el cual es diagnóstico de este haplogrupo. Esta ausencia puede responder a daños en la estructura de ADN o por la presencia de ADN exógeno. La aplicación de secuenciación masiva permitiría confirmar esta incógnita.

Por otro lado, aprovechando el buen rendimiento de las muestras de Arazatí, quedan pendientes varios estudios a realizar. Uno de ellos refiere al individuo Ar-B con linaje D4h3a cuya presencia en Arazatí no está clara. En consecuencia, sería deseable ampliar la muestra con el fin de contar con un mayor número de secuencias y, por ende, más información para comprender los procesos mediante los cuales un subhaplogrupo de la Patagonia llegó al oeste de Uruguay. Adicionalmente, se podrían incluir análisis de los isótopos estables de oxígeno (^{18}O) y estroncio (^{87}Sr) para determinar si el individuo Ar-B era un migrante o descendiente de una migrante. Cuando un organismo se mueve de un lugar a otro, los isótopos presentes en los alimentos y el agua que consume también pueden cambiar. Por lo tanto, al comparar las proporciones de isótopos en tejidos que se formaron temprano en la vida y aquellos que se renuevan constantemente, se puede determinar si un individuo ha cambiado de ubicación geográfica. En el caso del de oxígeno-18, hay varios factores que influyen en su proporción (clima, fuente de agua, humedad, plantas, animales consumidos); en general, se plantea que la proporción de oxígeno-18 disminuye a medida que aumenta la distancia de la costa. Por su lado, la composición isotópica del estroncio en un área específica está influenciada por el tipo de roca subyacente que compone la geología local. Cuando estas rocas se descomponen y erosionan, liberan estroncio que puede incorporarse al suelo y al agua circundante. Por ende, las proporciones de isótopos de estroncio pueden servir como indicadores útiles para rastrear la geografía de un individuo (Katzenberg y Waters-Rist, 2019).

Por otro lado, Ar-B presentó la transición 194G la cual, además de ser una mutación rara, no se ha registrado previamente en individuos con este linaje. Estos elementos hacen de Ar-B un excelente candidato para realizarle un análisis del genoma mitocondrial completo.

En función de las similitudes arqueológicas observadas entre Arazatí y el delta del Paraná (presencia de campanas zoomorfas), sería de gran valor aumentar el número de individuos de esta región de Argentina en búsqueda de afinidades genéticas. De esta forma se podría profundizar en los vínculos con la región, permitiendo conocer si existieron procesos de flujo génico o si únicamente implicaban un intercambio de recursos.

Respecto al este de Uruguay, por un lado, queda pendiente aumentar el tamaño muestral de Punta del Este con el fin de comprobar si hay más individuos pertenecientes al subhaplogrupo C1d3, y de esta forma tener más información para estudiar el vínculo entre Maldonado y Rocha. Adicionalmente, un análisis del genoma mitocondrial completo del individuo 42B-3 (con subhaplogrupo C1d3) permitiría detectar variantes

adicionales para estimar vínculos con individuos tanto antiguos como modernos pertenecientes al mismo haplogrupo. Por otro lado, es necesario incorporar un mayor número de individuos del sur de Brasil para comparar a nivel de secuencias con la muestra de La Viuda. Como ya se mencionó, la presencia de montículos antrópicos en ambos lugares, así como la proximidad geográfica, son datos que justifican analizar si ambas poblaciones mantenían algún tipo de contacto.

A modo de conclusión, si bien los análisis genéticos con restos prehistóricos tienen sus dificultades respecto a preservación del material y riesgo de contaminación (Knapp *et al.*, 2012), sus aportes son de gran valor permitiendo complementar los análisis arqueológicos y bioarqueológicos. Estos aportes son especialmente útiles cuando se trabaja con colecciones con escasos datos sobre los contextos de recuperación (como son los casos de la colección de Punta del Este y Arazatí), y con presencia de restos mezclados. A nivel regional, los estudios genéticos son fundamentales para comprender el grado de profundidad que tenían los vínculos entre los diversos grupos.

En este trabajo en particular, se ha logrado realizar un aporte al conocimiento de las poblaciones prehistóricas del oeste, sur y este de Uruguay. Sin embargo, los futuros análisis propuestos permitirán seguir comprendiendo las dinámicas entre los grupos, y de esta forma reconstruir los procesos poblacionales del país.

8. Referencias bibliográficas

- Achilli, A., Perego, U. A., Bravi, C. M., Coble, M. D., Kong, Q. P., Woodward, S. R., Salas, A., Torroni, A. & Bandelt, H. J. (2008). The phylogeny of the four pan-American MtDNA haplogroups: implications for evolutionary and disease studies. *PLoS One*, 3(3), e1764.
- Andrews, R. M., Kubacka, I., Chinnery, P. F., Lightowlers, R. N., Turnbull, D. M., & Howell, N. (1999). Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nature genetics*, 23(2), 147-147.
- Anza, L. (2023). Estudio de la variabilidad genética de restos humanos recuperados en sitios arqueológicos del oeste de Uruguay. Tesis de maestría inédita. Universidad de la República.
- Arencibia, V., Hidalgo, M. M., Crespo, C., Maldonado, L., Lichtenstein, G., Kamenetzky, L., Vera, P., Zangrando, A. F., Tessone, A., Avena, S., Lia, V., Puebla, A. & Dejean, C. (2023). Ancient Human Mitogenome of the Beagle Channel (Tierra del Fuego): An Argentine Collaborative Project. *Latin American Antiquity*, 1-14.
- Arias, L., Barbieri, C., Barreto, G., Stoneking, M., & Pakendorf, B. (2018). High-resolution mitochondrial DNA analysis sheds light on human diversity, cultural interactions, and population mobility in Northwestern Amazonia. *American journal of physical anthropology*, 165(2), 238-255.
- Avila, E., Graebín, P., Chemale, G., Freitas, J., Kahmann, A., & Alho, C. S. (2019). Full mtDNA genome sequencing of Brazilian admixed populations: A forensic-focused evaluation of a MPS application as an alternative to Sanger sequencing methods. *Forensic Science International: Genetics*, 42, 154-164.
- Bandelt, H. J. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Genetics*, 141, 743.
- Barbieri, C., Sandoval, J. R., Valqui, J., Shimelman, A., Ziemendorff, S., Schröder, R., Geppert, M., Roewer, L., Gray, R., Stoneking, M., Fujita, R. & Heggarty, P. (2017). Enclaves of genetic diversity resisted Inca impacts on population history. *Scientific Reports*, 7(1), 17411.
- Barreto, I., & Curbelo, C. (2009). Presencia indígena misionera en el Uruguay: movilidad, estructura demográfica y conformación familiar al Norte del Río Negro en el primer tercio del siglo XIX. *XII Jornadas Internacionales Misiones Jesuíticas. Interacciones y sentidos de la conversión*.
- Barreto, I., & Curbelo, C. (2010). Misiones Jesuíticas e indígenas misioneros en Uruguay. Conocimiento aplicado para la integración al Turismo Cultural regional. En: *IV Congreso Latinoamericano de Investigación Turística*, setiembre. CD ROM. Montevideo.

- Beovide, L., Lorenzo, M., & Martínez, S. (2019). Elaboración de adornos sobre materiales conchiliológicos recuperados en sitios arqueológicos de la costa de Río de la Plata (ca. 3000 a 400 años AP). Aportes experimentales. *Archaeofauna*, 28, 141-156.
- Beovide, L., Lorenzo, M., & Martínez, S. (2021). Procesos de manufactura de las pequeñas cuentas arqueológicas de Arazatí, Uruguay: Ensayos experimentales utilizando *Urosalpinx haneti*. *Boletín de Arqueología Experimental*, (15), 51-83.
- Beovide, L., Martínez, S., & Figueiro, G. (2015). *Urosalpinxhaneti* (gasterópoda) como adorno funerario (ca. 900 a 500 años AP), Arazatí, costa del Río de la Plata (Uruguay). En *Resúmenes III Congreso Latinoamericano de Zooarqueología*.
- Beovide, L., Pardo, H., Faccio, R., Figueiro, G., Martínez, S., Baeza, J., y Lorenzo, M. (2014). *Los niños prehistóricos de "Arazatí" y su ajuar funerario*. IV Congreso Latinoamericano de Arqueometría.
- Bertoni, B., Figueiro, G., Cabana, G., McDonough, J. E., Bluteau, C., Merriwether, D., & Sans, M. (2004). Primeras secuencias de ADN mitocondrial de indígenas prehistóricos del Uruguay. En *X Congreso Uruguayo de Arqueología: La Arqueología Uruguaya ante los desafíos del nuevo siglo*. Montevideo: Asociación Uruguaya de Arqueología.
- Bobillo, M. C., Zimmermann, B., Sala, A., Huber, G., Röck, A., Bandelt, H. J., Corach, D., & Parson, W. (2010). Amerindian mitochondrial DNA haplogroups predominate in the population of Argentina: towards a first nationwide forensic mitochondrial DNA sequence database. *International Journal of Legal Medicine*, 124, 263-268.
- Bodner, M., Perego, U. A., Huber, G., Fendt, L., Röck, A. W., Zimmermann, B., Olivieri, A., Gomez-Carballa, A., Lancioni, H., Angerhofer, N., Bobillo, M. C., Corach, D., Woodward, S. R., Salas, A., Achilli, A., Torroni, A., Bandelt, H. J. & Parson, W. (2012). Rapid coastal spread of First Americans: Novel insights from South America's Southern Cone mitochondrial genomes. *Genome research*, 22(5), 811-820.
- Bonilla, C., Bertoni, B., González, S., Cardoso, H., Brum-Zorrilla, N., & Sans, M. (2004). Substantial native American female contribution to the population of Tacuarembó, Uruguay, reveals past episodes of sex-biased gene flow. *American Journal of Human Biology: The Official Journal of the Human Biology Association*, 16(3), 289-297.
- Bonilla, C., Bertoni, B., Hidalgo, P. C., Artagaveytia, N., Ackermann, E., Barreto, I., Cancela, P., Cappetta, M., Egaña, A., Figueiro, G., Heinzen, S., Hooker, S., Román, E., Sans, M. & Kittles, R. A. (2015). Breast cancer risk and genetic ancestry: a case-control study in Uruguay. *BMC Women's Health*, 15, 1-10.
- Bonomo, M., Di Prado, V. S., Silva, C. B., Scabuzzo, C., Ramos van Raap, M. A., Castiñeira Latorre, C., Colobig, M. M. & Politis, G. G. (2019). Las poblaciones indígenas prehispánicas del río Paraná Inferior y Medio. *Revista del Museo de La Plata*, 4.
- Bonomo, M., Politis, G., & Castro, J. C. (2014). Los indígenas de Entre Ríos. *Manual de Entre Ríos I. Ministerio de Cultura y Comunicación de la provincia de Entre Ríos*, 1, 45-75.

- Bracco, R., Fregeiro, M. I., Panarello, H., Odino, R. & Souto, B. (2000). Dieta, Modos de Producción de Alimentos y Complejidad. En Alicia Durán Coirolo & Roberto Bracco Boksar (Eds.) *Arqueología de las Tierras bajas* (pp. 227- 278). Ministerio de Educación y Cultura.
- Brandini, S., Bergamaschi, P., Cerna, M. F., Gandini, F., Bastaroli, F., Bertolini, E., Cereda, C., Ferretti, L., Gomez-Carballa, A., Battaglia, V., Salas, A., Semino, O., Achilli, A., Olivieri, A. & Torroni, A. (2018). The Paleo-Indian entry into South America according to mitogenomes. *Molecular Biology and Evolution*, 35(2), 299-311.
- Cáceres, S. (2022). *Análisis de un conjunto óseo del Cerro de La Viuda (Rocha, Uruguay)*. Monografía inédita. Universidad de la República.
- Cadavid Sánchez, I. C., & Gómez García, G. F. (2018). *Preparación de solución de lisis para extracción de ADN descrito por Collins et al. (1987)*.
- Campelo dos Santos, A. L., Owings, A., Sullasi, H. S. L., Gokcumen, O., DeGiorgio, M., & Lindo, J. (2022). Genomic evidence for ancient human migration routes along South America's Atlantic coast. *Proceedings of the Royal Society B*, 289(1986), 20221078.
- Caporale, M. & Baeza, J. (2014). *Solicitud de autorización para ejecutar proyecto de Arqueología*. Centro interdisciplinario para el manejo costero integrado del cono sur.
- Caporale, M., Lublin, G., Silvera, M., & Ferraro, A. (2019). Aprovechamiento Y Uso De Los Recursos Faunísticos De Las Poblaciones Prehispánicas De La Zona Costera Del Departamento De Maldonado, Uruguay. *Cuadernos del Instituto Nacional de Antropología y Pensamiento Latinoamericano—Series Especiales*, 7(2), 67-75.
- Cardena, M. M., Ribeiro-dos-Santos, A., Santos, S., Mansur, A. J., Pereira, A. C., & Fridman, C. (2013). Assessment of the relationship between self-declared ethnicity, mitochondrial haplogroups and genomic ancestry in Brazilian individuals. *PloS one*, 8(4), e62005.
- Castro e Silva, M. A., Ferraz, T., & Hünemeier, T. (2022). A genomic perspective on South American human history. *Genetics and Molecular Biology*, 45.
- Catelli, M. L., Álvarez-Iglesias, V., Gómez-Carballa, A., Mosquera-Miguel, A., Romanini, C., Borosky, A., Amigo, J., Carracedo A., Vullo, C. & Salas, A. (2011). The impact of modern migrations on present-day multi-ethnic Argentina as recorded on the mitochondrial DNA genome. *BMC Genetics*, 12, 1-13.
- Chinnery, P. F. (2006). Mitochondrial DNA in Homo sapiens. En *Human Mitochondrial DNA and the Evolution of Homo sapiens* (pp. 3-15). Springer Berlin Heidelberg.
- Chitarroni, H. (2002). *La regresión logística*. Universidad del Salvador.
- De la Fuente Castro, C., & Figueiro, G. (2024). Human ancient DNA analysis in Latin America: Current state and challenges. *Archaeometry*.

- Del Papa, M. C., Vázquez, R. C., Muñe, M. C., & Di Bastiano, A. (2010). Administración de las colecciones osteológicas en la División Antropología-FCNyM. En *Congreso Nacional de Museos Universitarios*.
- De Saint Pierre, M., Gandini, F., Perego, U. A., Bodner, M., Gomez-Carballa, A., Corach, D., Angerhofer, N., Woodward, S. R., Semino, O., Salas, A., Parson, W., Moraga, M., Achilli, A., Torroni, A. & Olivieri, A. (2012). Arrival of Paleo-Indians to the southern cone of South America: new clues from mitogenomes. *PLoS one*, 7(12), e51311.
- Di Corcia, T., Scano, G., Martínez-Labarga, C., Sarno, S., De Fanti, S., Luiselli, D., & Rickards, O. (2021). Uniparental lineages from the oldest indigenous population of Ecuador: The Tsachilas. *Genes*, 12(8), 1273.
- Fagundes, N. J., Kanitz, R., & Bonatto, S. L. (2008). A reevaluation of the Native American mtDNA genome diversity and its bearing on the models of early colonization of Beringia. *PLoS One*, 3(9), e3157.
- Fagundes, N. J., Kanitz, R., Eckert, R., Valls, A. C., Bogo, M. R., Salzano, F. M., Smith, D. G., Silva, W. A. Jr., Zago, M. A., Ribeiro-dos-Santos, A. K., Santos, S. E., Petzl-Erler, M. L. & Bonatto, S. L. (2008). Mitochondrial population genomics supports a single pre-Clovis origin with a coastal route for the peopling of the Americas. *The American Journal of Human Genetics*, 82(3), 583-592.
- Ferraz, T., Suarez Villagran, X., Nägele, K., Radzevičiūtė, R., Barbosa Lemes, R., Salazar-García, D. C., ... & Posth, C. (2023). Genomic history of coastal societies from eastern South America. *Nature Ecology & Evolution*, 7(8), 1315-1330.
- Figueiro, G. (2013). Estudio de la variación temporal y espacial en el ADN mitocondrial de las poblaciones prehistóricas de la Región Pampeana. Tesis de doctorado inédita. Universidad de la República.
- Figueiro, G., Cabrera Pérez, L., Lindo, J., Mallott, E. K., Owings, A., Malhi, R. S., & Sans, M. (2017). Análisis Del Genoma Mitocondrial De Dos Individuos Inhumados En El Sitio Arqueológico Cg14E01" Isla Larga"(Rocha, Uruguay). *Revista Argentina de Antropología Biológica*, 19(1), 0-0.
- Figueiro, G., Mut, P., Ale, L., Flores-Gutiérrez, S., Greif, G., Hidalgo, P. C., Luna, L., Ackermann, E., Negro, R. G., Spangenberg, L., Naya, H. & Sans, M. (2022). Filogeografía de mitogenomas indígenas de Uruguay. *Revista Argentina de Antropología Biológica*, 24(1).
- Figueiro, G., Mut, P., & Sans, M. (2021). Los estudios moleculares para análisis de orígenes poblacionales y ancestría. *Revista del Instituto de Estudios Genealógicos del Uruguay*, 37, 287-303.
- Fontana, M. A. (1930). Memoria de la excursión científica a Nueva Palmira. *Revista de la Sociedad "Amigos de la Arqueología"*, (IV) 119-181.

- Forster, P., Harding, R., Torroni, A., & Bandelt, H. J. (1996). Origin and evolution of Native American mtDNA variation: a reappraisal. *American Journal of Human Genetics*, 59(4), 935.
- García, A., Nores, R., Motti, J. M., Pauro, M., Luisi, P., Bravi, C. M., Fabra, M., Gosling, A. L., Kardailsky, O., Boocock, J., Sole-Morata, N., Matisoo-Smith, E. A., Comas, D. & Demarchi, D. A. (2021). Ancient and modern mitogenomes from Central Argentina: new insights into population continuity, temporal depth and migration in South America. *Human Molecular Genetics*, 30(13), 1200-1217.
- García, A., Pauro, M., Bailliet, G., Bravi, C. M., & Demarchi, D. A. (2018). Genetic variation in populations from central Argentina based on mitochondrial and Y chromosome DNA evidence. *Journal of Human Genetics*, 63(4), 493-507.
- Gascue, A., Scarabino, F., Bortolotto, N., Clavijo, C., & Capdepon, I. (2019). El rol de los moluscos en las poblaciones prehispánicas de Uruguay. *Comechingonia*, 23(1), 1-10.
- Gascue, C., Mimbacas, A., Sans, M., Gallino, J. P., Bertoni, B., Hidalgo, P., & Cardoso, H. (2005). Frequencies of the four major Amerindian mtDNA haplogroups in the population of Montevideo, Uruguay. *Human Biology*, 873-878.
- Goebel, T., Waters, M. R., & O'Rourke, D. H. (2008). *The late Pleistocene dispersal of modern humans in the Americas*. *Science*, 319(5869), 1497-1502.
- Gómez-Carballa, A., Ignacio-Veiga, A., Álvarez-Iglesias, V., Pastoriza-Mourelle, A., Ruiz, Y., Pineda, L., Carracedo, A. & Salas, A. (2012). A melting pot of multicontinental mtDNA lineages in admixed Venezuelans. *American Journal of Physical Anthropology*, 147(1), 78-87.
- Gordón, F. (2009). Tafonomía humana y lesiones traumáticas en colecciones de museos: Evaluación en cráneos del noreste de Patagonia. *Intersecciones en Antropología*, 10(1), 27-41.
- Guevara, E. K., Palo, J. U., Översti, S., King, J. L., Seidel, M., Stoljarova, M., Wendt, F. R., Bus, M. M., Guengerich, A., Church, W. B., Guillen, S., Roewer, L., Budowle, B. & Sajantila, A. (2020). Genetic assessment reveals no population substructure and divergent regional and sex-specific histories in the Chachapoyas from northeast Peru. *Plos one*, 15(12).
- Hansen, H. B., Damgaard, P. B., Margaryan, A., Stenderup, J., Lynnerup, N., Willerslev, E., & Allentoft, M. E. (2017). Comparing ancient DNA preservation in petrous bone and tooth cementum. *Plos one*, 12(1).
- Hofreiter, M., Serre, D., Poinar, H. N., Kuch, M., & Pääbo, S. (2001). ancient DNA. *Nature Reviews Genetics*, 2(5), 353-359.
- Ingman, M., Kaessmann, H., Pääbo, S., & Gyllensten, U. (2000). Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. *Nature*, 408(6813), 708-713.

- Katzenberg, M. A., & Waters-Rist, A. L. (2018). Stable isotope analysis: a tool for studying past diet, demography, and life history. *Biological Anthropology of the Human Skeleton*, 467-504.
- Kemp, B. M., & Schurr, T. G. (2010). Ancient and modern genetic variation in the Americas. *Human Variation in the Americas: The Integration of Archaeology and Biological Anthropology*, 12-50.
- Kitchen, A., Miyamoto, M. M., & Mulligan, C. J. (2008). A three-stage colonization model for the peopling of the Americas. *PLoS one*, 3(2), e1596.
- Knapp, M., Clarke, A. C., Horsburgh, K. A., & Matisoo-Smith, E. A. (2012). Setting the stage—Building and working in an ancient DNA laboratory. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, 194(1), 3-6.
- Lee, E. J., & Merriwether, D. A. (2015). Identification of whole mitochondrial genomes from Venezuela and implications on regional phylogenies in South America. *Human Biology*, 87(1), 29-38.
- Lindo, J., De La Rosa, R., Santos, A. L. D., Sans, M., DeGiorgio, M., & Figueiro, G. (2022). The genomic prehistory of the Indigenous peoples of Uruguay. *PNAS nexus*, 1(2), pgac047.
- Llamas, B., Fehren-Schmitz, L., Valverde, G., Soubrier, J., Mallick, S., Rohland, N., ... & Romero, M. I. B. (2016). Ancient mitochondrial DNA provides high-resolution time scale of the peopling of the Americas. *Science Advances*, 2(4), e1501385.
- Loponte, D., Ottalagano, F., Pérez, M., Malec, L., Ramos, C., Bozzano, P., Iribarren, M., Pérez, R., Leiva, G., Domínguez, S., Sheila, A. & Acosta, A. (2020). Mortuary pottery and sacred landscapes in complex hunter-gatherers in the Paraná Basin, South America. *Cambridge Archaeological Journal*, 30(1), 21-43.
- Gianotti, C. (2015). *Paisajes sociales, monumentalidad y territorio en las tierras bajas de Uruguay*. (Tesis de Doctorado inédita), Universidad de Santiago de Compostela.
- Hansen, H. B., Damgaard, P. B., Margaryan, A., Stenderup, J., Lynnerup, N., Willerslev, E., & Allentoft, M. E. (2017). Comparing ancient DNA preservation in petrous bone and tooth cementum. *PLoS one*, 12(1), e0170940.
- Maeso Tognochi, C. (1977). *Investigaciones arqueológicas*. Impr. Don Bosco. 193-197.
- Malán, M. (2022). Campanas zoomorfas de Uruguay: primer intento de trazabilidad. *Arqueología*, 28(2), 9966-9966.
- Margaryan, A., Hansen, H. B., Rasmussen, S., Sikora, M., Moiseyev, V., Khoklov, A., Epimakhov, L., Yepiskoposyan, A., Kriiska, L., Varul, L., Saag, N., Lynnerup, E., Willerslev & Allentoft, M. E. (2018). Ancient pathogen DNA in human teeth and petrous bones. *Ecology and Evolution*, 8(6), 3534-3542.
- Martínez, J. G. (2019). Sociedades prehispánicas de la Puna argentina: desde el poblamiento temprano hasta los inicios de la producción pastoril y agrícola. *Serie Conservación de la Naturaleza 24: La Puna Argentina: Naturaleza y Cultura*.

- Mazza, B. (2015). Colecciones antiguas, datos nuevos: Primeros resultados del análisis de las colecciones bioarqueológicas del Humedal del Paraná Inferior. *Revista del Museo de Antropología*, 8(1), 133-146.
- Mazz, J. M. L. (2001). Las estructuras tumulares (cerritos) del Litoral Atlántico uruguayo. *Latin American Antiquity*, 12(3), 231-255.
- Mazz, J. M. L., Amaral, A. G., & Rudolph, F. M. (2004). La prehistoria del este de Uruguay: Cambio cultural y aspectos ambientales. En *Anales de Prehistoria y Arqueología*.
- Mazz, J. M. L., Moreno, F., Machado, A., Alonso, N., & Piña, R. (2022). Cambio ambiental, respuesta humana y emergencia de complejidad cultural: primeros resultados de la investigación en la localidad arqueológica de La Viuda (Bañado de India Muerta, Rocha, Uruguay). *Arqueología*, 28(2), 9912-9912.
- Meltzer, D. J. (2003). Peopling of north America. *Developments in Quaternary Sciences*, 1, 539-563.
- Moreno Rudolph, F. (2006). Arqueotafonomía costera: la conservación de restos óseos en yacimientos del litoral Atlántico Uruguayo. *Arqueotafonomía Costera*. BIBLID [1138-9435 (2006) 8, 1-265]
- Moreno, F., Figueiro, G., & Sans, M. (2014). Huesos mezclados: restos humanos de subadultos en el conjunto arqueofaunístico de un sitio prehistórico en el este de Uruguay. *Revista Argentina de Antropología Biológica*, 16(2), 65-78.
- Moreno-Mayar, J. V., Vinner, L., de Barros Damgaard, P., de la Fuente, C., Chan, J., Spence, J. P., ... & Willerslev, E. (2018). Early human dispersals within the Americas. *Science*, 362(6419), eaav2621.
- Motti, J., Hagelberg, E., Lindo, J., Malhi, R. S., Bravi, C. M., & Guichón, R. A. (2015). Primer genoma mitocondrial en restos humanos de la costa de Santa Cruz, Argentina. *Magallania (Punta Arenas)*, 43(2), 119-131.
- Motti, J. M. B., Pauro, M., Scabuzzo, C., García, A., Aldazabal, V., Vecchi, R., Bayon, C., Pastor, N., Demarchi, D. A., Bravi, C. M., Reich, D., Cabana, G. S., & Nores, R. (2023). Ancient mitogenomes from the southern Pampas of Argentina reflect local differentiation and limited extra-regional linkages after rapid initial colonization. *American Journal of Biological Anthropology*, 181(2), 216–230.
- Nakatsuka, N., Lazaridis, I., Barbieri, C., Skoglund, P., Rohland, N., Mallick, S., Posth, C., ... & Fehren-Schmitz, L. (2020). A paleogenomic reconstruction of the deep population history of the Andes. *Cell*, 181(5), 1131-1145.
- Nores, R., Tavella, M. P., Fabra, M., & Demarchi, D. A. (2022). Ancient DNA analysis reveals temporal and geographical patterns of mitochondrial diversity in pre-Hispanic populations from Central Argentina. *American Journal of Human Biology: The Official Journal of the Human Biology Council*, 34(7), e23733.
- Novo Villaverde, F. J. (2007). Genética Humana. *Conceptos, Mecanismos y Aplicaciones de la Genética en el Campo de la Biomedicina*. Pearson.
- Oppenheimer, S., Bradley, B., & Stanford, D. (2014). Solutrean hypothesis: Genetics, the mammoth in the room. *World Archaeology*, 46(5), 752-774.

- O'Rourke, D. H., Hayes, M. G., & Carlyle, S. W. (2000). Ancient DNA studies in physical anthropology. *Annual Review of Anthropology*, 29(1), 217-242.
- O'Rourke, D. H., & Raff, J. A. (2010). *The human genetic history of the Americas: the final frontier*. *Current Biology*, 20(4), R202-R207.
- Parolin, M. L., Galimany, J., Gómez Otero, J., Dahinten, S., Millán, A. G., & Moraga, M. (2019). Primeras secuencias mitocondriales de la región control completa en muestras humanas del Holoceno tardío de la costa norte y centro de Patagonia, Argentina. *Arqueología de la Patagonia: El pasado en las arenas*, 469-480.
- Peláez, I. M. (2016). Modelos de regresión: lineal simple y regresión logística. *Revista Seden*, 14, 195-214.
- Penino, R. (1957). Algunos informes sobre Antropología indígena del Uruguay. *La Nación Charrúa*, 294-297.
- Perego, U. A., Achilli, A., Angerhofer, N., Accetturo, M., Pala, M., Olivieri, A., Kashani, B. H., Ritchie, K. H., Scozzari, R., Kong, Q., Myres, N. M., Salas, A., Semino, O., Bandelt, H., Woodward, S.R., & Torroni, A. (2009). Distinctive Paleo-Indian migration routes from Beringia marked by two rare mtDNA haplogroups. *Current biology*, 19(1), 1-8.
- Perego, U. A., Angerhofer, N., Pala, M., Olivieri, A., Lancioni, H., Kashani, B. H., Carossa, V., ... & Torroni, A. (2010). *The initial peopling of the Americas: a growing number of founding mitochondrial genomes from Beringia*. *Genome Research*, 20(9), 1174-1179.
- Pilli, E., Modi, A., Serpico, C., Achilli, A., Lancioni, H., Lippi, B., Bertoldi, F., Gelichi, S., Lari, M. & Caramelli, D. (2013). Monitoring DNA contamination in handled vs. directly excavated ancient human skeletal remains. *PloS one*, 8(1), e52524.
- Politis, G. y Bonomo, M. (2012). La entidad arqueológica Goya-Malabrigo (ríos Paraná y Uruguay) y su filiación arawak. *Revista de Arqueología*, 25(1), 10-46.
- Portas, M., & Sans, M. (1995). Historias de vida en los restos esqueléticos de dos sitios con elevación del Dpto. de Rocha. En *Arqueología en el Uruguay: 120 años después. VIII Congreso Nacional de Arqueología Uruguay* (pp. 32-35).
- Prates, L., Politis, G. G., & Perez, S. I. (2020). Rapid radiation of humans in South America after the last glacial maximum: A radiocarbon-based study. *PloS one*, 15(7), e0236023.
- Raff, J. A., & Bolnick, D. A. (2015). Does mitochondrial haplogroup X indicate ancient trans-Atlantic migration to the Americas? A critical re-evaluation. *PaleoAmerica*, 1(4), 297-304.
- Raff, J. A., Bolnick, D. A., Tackney, J., & O'Rourke, D. H. (2011). Ancient DNA perspectives on American colonization and population history. *American Journal of Physical Anthropology*, 146(4), 503-514.
- Rasmussen, M., Sikora, M., Albrechtsen, A., Korneliussen, T. S., Moreno-Mayar, J. V., Poznik, G. D., Zollikofer, C.P.E., Ponce de Leo, M.S., Allentoft, M.E., Moltke, I., Valdiosera, C., Malhi, R.S., Orlando, L., Bustamante, C.D., Thomas W. Stafford Jr, T.W., Nielsen, R., & Willerslev, E. (2015). The ancestry and affiliations of Kennewick Man. *Nature*, 523(7561), 455.

- R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Rieux, A., Eriksson, A., Li, M., Sobkowiak, B., Weinert, L. A., Warmuth, V., Ruiz-Linares, A., Manica, A. & Balloux, F. (2014). Improved calibration of the human mitochondrial clock using ancient genomes. *Molecular Biology and Evolution*, 31(10), 2780-2792.
- Roca-Rada, X., Politis, G., Messineo, P., Scheifler, N., Scabuzzo, C., Gonzalez, M., Harkins, K.M., Reich, D., Souilmi, Y., Teixeira, J.C., Llamas, B. & Fehren-Schmitz, L. (2020). New insights on the peopling of the Southern Cone of South America from Early to Late Holocene mitochondrial genomes from the Argentinian Pampas. *Unpublished. GenBank direct submission*.
- Roca-Rada, X., Politis, G., Messineo, P. G., Scheifler, N., Scabuzzo, C., Gonzalez, M., Harkins, K. M., Reich, D., Souilmi, Y., Teixeira, J.C., Llamas, B., & Fehren-Schmitz, L. (2021). Ancient mitochondrial genomes from the Argentinian Pampas inform the early peopling of the southern cone of South America. *iScience*, 24(6), 102553.
- Russo, M. G., Arencibia, V., Emery, M., Bettera Marcat, G., Seldes, V., Mercolli, P., Soria, S., Maldonado L., Kamenetzky, L., Avena, S., Dejean C. & Stone, A. C. (2023). Ancient mitochondrial genome diversity in South America: Contributions from Quebrada del Toro, Northwestern Argentina. *American Journal of Biological Anthropology*, 181(4), 597-610.
- Russo, M. G., Mendisco, F., Avena, S. A., Crespo, C. M., Arencibia, V., Dejean, C. B., & Seldes, V. (2018). Ancient DNA reveals temporal population structure within the south-central Andes area. *American Journal of Physical Anthropology*, 166(4), 851–860.
- Sala, A., Caputo, M., & Corach, D. (2019). Genetic structure of Mataco-Guaycurú speakers from Argentina and the extent of their genetic admixture with neighbouring urban populations. *Scientific Reports*, 9(1), 17559.
- Sala, A., & Corach, D. (2014). Analysis of admixture and genetic structure of two Native American groups of Southern Argentinean Patagonia. *Molecular Biology Reports*, 41, 1533-1543.
- Sans, M. (1988). Las poblaciones prehistóricas del Uruguay. *Universidad de la República, Facultad de Humanidades y Ciencias, Departamento de Antropología*.
- Sans, M. (1999). Pautas de adaptación en el Este del Uruguay a partir de los restos esqueléticos humanos. *Arqueología y bioantropología de las Tierras Bajas. Montevideo: Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación*. p, 107-126.
- Sans, M., & Avena, S. (2017). 22 Population Genetics in Argentina, Bolivia, Chile, Paraguay, and Uruguay. *Biological Anthropology of Latin America*, 269.
- Sans, M., Figueiro, G., Ackermann, E., Barreto, I., Egaña, A., Bertoni, B., Poittevin-Gilmet, E., Maytia, D. & Hidalgo, P. C. (2011). Mitochondrial DNA in Basque descendants from the city of Trinidad, Uruguay: Uruguayan-or Basque-like population? *Human Biology*, 83(1), 55-70.

- Sans, M., Figueiro, G., & Hidalgo, P. C. (2012). A new mitochondrial C1 lineage from the prehistory of Uruguay: population genocide, ethnocide, and continuity. *Human Biology*, 84(3), 287-305.
- Sans, M., Figueiro, G., Hughes, C. E., Lindo, J., Hidalgo, P. C., & Malhi, R. S. (2015). A South American prehistoric mitogenome: context, continuity, and the origin of haplogroup C1d. *PLoS one*, 10(10), e0141808.
- Sans, M., Figueiro, G., Sanguinetti, C., Echarte-Rafaelli, L., Portela, C., Taranto, L., Pizzarosa, C., Oliver, R., Manikowski, R., Barreto, I., Hidalgo, P. C., & Berro, G. (2010). The last Charrúa Indian;(Uruguay): analysis of the remains of Chief Vaimaca Per&x00FA;. *Nature Precedings*, 1-1.
- Sans, M., Mañé Garzón, F., & Kolski, R. (1986). Presencia de mancha mongólica en recién nacidos de Montevideo. *Arch. Pediatr. Urug*, 149-56.
- Sans, M., Merriwether, D. A., Hidalgo, P. C., Bentancor, N., Weimer, T. A., Franco, M. H. L., ... & Salzano, F. M. (2006). Population structure and admixture in Cerro Largo, Uruguay, based on blood markers and mitochondrial DNA polymorphisms. *American Journal of Human Biology: The Official Journal of the Human Biology Association*, 18(4), 513-524.
- Sans, M., Salzano, F. M., & Chakraborty, R. (1997). Historical genetics in Uruguay: estimates of biological origins and their problems. *Human Biology*, 161-170.
- Schurr, T. G., Ballinger, S. W., Gan, Y. Y., Hodge, J. A., Merriwether, D. A., Lawrence, D. N., Knowler, W.C., Weiss, K.M., & Wallace, D. C. (1990). Amerindian mitochondrial DNAs have rare Asian mutations at high frequencies, suggesting they derived from four primary maternal lineages. *American Journal of Human Genetics*, 46(3), 613.
- Schurr, T. G., & Sherry, S. T. (2004). Mitochondrial DNA and Y chromosome diversity and the peopling of the Americas: evolutionary and demographic evidence. *American Journal of Human Biology*, 16(4), 420-439.
- Seijo, C. (1923). De prehistoria. *Revista Histórica*, 11, 1491-1508.
- Seijo, C. (1930). Cráneo con fragmentos de uncollar. *Revista de la Sociedad "Amigos de la Arqueología"*, 4, 183-195.
- Serrano, A. (1972). Líneas fundamentales de la arqueología del litoral (una tentativa de periodización). *Revista del Instituto de Antropología*, 23, 1-79.
- Sevini, F., Vianello, D., Barbieri, C., Iaquilano, N., De Fanti, S., Luiselli, D., Franceschi, C. & Franceschi, Z. (2014). Human mitochondrial genomes reveal population structure and different phylogenies in Gran Chaco (Argentina). *Unpublished. GenBank direct submission*.
- Silveira, M.F. (2018). Aproximación a las poblaciones prehistóricas del este de Uruguay a través de la colección Carlos Seijo. *Monografía inédita. Departamento de Antropología Biológica, Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación*.

- Silveira, M.F., & Figueiro, G. (2020). Aproximación A Las Poblaciones Prehistóricas Del Este De Uruguay A Través De La Colección Carlos Seijo. *Cuadernos del Instituto Nacional de Antropología y Pensamiento Latinoamericano–Series Especiales*, 8(2), 246-262.
- Simão, F., Strobl, C., Vullo, C., Catelli, L., Machado, P., Huber, N., Schnaller, L., Huber, G., Xavier, C., Carvalho, E.F., Gusmao, L. & Parson, W. (2019). The maternal inheritance of Alto Paraná revealed by full mitogenome sequences. *Forensic Science International: Genetics*, 39, 66-72.
- Soares, P., Ermini, L., Thomson, N., Mormina, M., Rito, T., Röhl, A., Salas, A., Oppenheimer, S., Macaulay, V. & Richards, M. B. (2009). Correcting for purifying selection: an improved human mitochondrial molecular clock. *The American Journal of Human Genetics*, 84(6), 740-759.
- Taboada-Echalar, P., Alvarez-Iglesias, V., Heinz, T., Vidal-Bralo, L., Gomez-Carballa, A., Catelli, L., Pardo-Seco, J., Pastoriza, A., Carracedo A., Torres–Balanza A., Rocabado, O., Vullo, C. & Salas, A. (2013). The genetic legacy of the pre-colonial period in contemporary Bolivians. *PloS one*, 8(3), e58980.
- Tamm, E., Kivisild, T., Reidla, M., Metspalu, M., Smith, D. G., Mulligan, C. J., Bravi, C. M., ... & Malhi, R. S. (2007). Beringian standstill and spread of Native American founders. *PloS one*, 2(9), e829.
- Tito, R. Y., Polo, S. I., & Lewis Jr, C. M. (2012). Mitochondrial genomes and founder effects within the Americas. *Sin publicar. Secuencias disponibles en GenBank*.
- Torroni, A., Schurr, T. G., Cabell, M. F., Brown, M. D., Neel, J. V., Larsen, M., Smith, D. G., Vullo, C. M. y Wallace, D. C. (1993). Asian affinities and continental radiation of the four founding Native American mtDNAs. *American Journal of Human Genetics*, 53(3), 563.
- Torroni, A., Schurr, T. G., Yang, C. C., Szathmary, E. J., Williams, R. C., Schanfield, M. S., Troup G.A., Knowler, W.C., Lawrence, D.N., Weiss, K.M., & Wallace, D.C (1992). Native American mitochondrial DNA analysis indicates that the Amerind and the Nadene populations were founded by two independent migrations. *Genetics*, 130(1), 153-162.
- Willerslev, E., & Cooper, A. (2005). Ancient DNA. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 272(1558), 3-16.
- Xavier, C., Builes, J. J., Gomes, V., Ospino, J. M., Aquino, J., Parson, W., Amorim, A., Gusmao, L., & Goios, A. (2015). Admixture and genetic diversity distribution patterns of non-recombining lineages of Native American ancestry in Colombian populations. *PloS one*, 10(3), e0120155.
- Yang, D. Y., & Watt, K. (2005). Contamination controls when preparing archaeological remains for ancient DNA analysis. *Journal of Archaeological Science*, 32(3), 331-336.

9. Apéndices

Apéndice 1. Datos recopilados para Sudamérica utilizados en este trabajo para los análisis filogenéticos comparativos. La tabla fue creada a partir de la bibliografía disponible y de la base de datos de Genbank.

Localidad	País	C1	D1	D4h3	Referencia
Buenos Aires	Argentina	40	36	4	Bobillo <i>et al.</i> , 2010; Perego <i>et al.</i> , 2010; Catelli <i>et al.</i> , 2011, Bodner <i>et al.</i> , 2012
Córdoba	Argentina	147	20	1	Bobillo <i>et al.</i> , 2010; Catelli <i>et al.</i> , 2011; García <i>et al.</i> , 2018; Bodner <i>et al.</i> , 2012
Río Negro	Argentina	7	26	2	Bobillo <i>et al.</i> , 2010; Perego <i>et al.</i> , 2010; Bodner <i>et al.</i> , 2012
Misiones	Argentina	8	4	1	Bobillo <i>et al.</i> , 2010
Chaco	Argentina	7	41	5	Bobillo <i>et al.</i> , 2010; Sevini <i>et al.</i> , 2014; Perego <i>et al.</i> , 2010
Formosa	Argentina	11	2	1	Bobillo <i>et al.</i> , 2010; Catelli <i>et al.</i> , 2011; Sala <i>et al.</i> , 2019
Entre Ríos	Argentina	2	0	0	Bobillo <i>et al.</i> , 2010; Catelli <i>et al.</i> , 2011
Santiago del Estero	Argentina	38	3	0	Catelli <i>et al.</i> , 2011
Tucumán	Argentina	2	2	0	Catelli <i>et al.</i> , 2011; Bodner <i>et al.</i> , 2012
San Juan	Argentina	1	1	0	Catelli <i>et al.</i> , 2011
Salta	Argentina	3	2	0	Perego <i>et al.</i> , 2010; Russo <i>et al.</i> , 2023; Bodner <i>et al.</i> , 2012
Catamarca	Argentina	3	3	0	Catelli <i>et al.</i> , 2011; Perego <i>et al.</i> , 2010; Bodner <i>et al.</i> , 2012
Corrientes	Argentina	3	2	0	Catelli <i>et al.</i> , 2011; Perego <i>et al.</i> , 2010; Bodner <i>et al.</i> , 2012
San Luis	Argentina	31	0	0	García <i>et al.</i> , 2018
Patagonia	Argentina	41	0	0	Sala <i>et al.</i> , 2014
Santa Fe	Argentina	3	2	0	Sala <i>et al.</i> , 2019; Llamas <i>et al.</i> , 2016
Argentina	Argentina	14	5	0	García <i>et al.</i> , 2021, De Saint Pierre <i>et al.</i> , 2012; Roca Rada <i>et al.</i> , 2020; Llamas <i>et al.</i> , 2016
Argentina Central	Argentina	0	30	0	García <i>et al.</i> , 2021
Neuquén	Argentina	1	2	0	Catelli <i>et al.</i> , 2011; Bodner <i>et al.</i> , 2012
Chubut	Argentina	0	2	0	Bobillo <i>et al.</i> , 2010; Bodner <i>et al.</i> , 2012
Santa Cruz	Argentina	0	1	1	Catelli <i>et al.</i> , 2011; Motti <i>et al.</i> , 2015
La Rioja	Argentina	0	3	0	Catelli <i>et al.</i> , 2011
Tierra del Fuego	Argentina	0	1	0	Arencibia, 2023

Localidad	País	C1	D1	D4h3	Referencia
La Paz	Bolivia	31	0	7	Taboada-Echalar <i>et al.</i> , 2013; Perego, <i>et al.</i> 2009;
Chuquisaca	Bolivia	14	0	1	Taboada-Echalar, <i>et al.</i> , 2013
Beni	Bolivia	48	0	0	Taboada-Echalar, <i>et al.</i> , 2013
Pando	Bolivia	22	0	0	Taboada-Echalar, <i>et al.</i> , 2013
Santa Cruz	Bolivia	21	0	0	Taboada-Echalar, <i>et al.</i> , 2013
Cochabamba	Bolivia	19	0	0	Taboada-Echalar, <i>et al.</i> , 2013
Rio Grande do Sul	Brasil	1	1	0	Perego <i>et al.</i> , 2010; Bodner <i>et al.</i> , 2012
Minas Gerais	Brasil	1	0	0	Perego <i>et al.</i> , 2010
Mato Grosso do Sul	Brasil	1	0	0	Perego <i>et al.</i> , 2010
Distrito Federal	Brasil	4	3	0	Avila <i>et al.</i> , 2019, Guevara <i>et al.</i> , 2020
Sao Paulo	Brasil	0	1	0	Bodner <i>et al.</i> , 2012
Río de Janeiro	Brasil	0	1	0	Avila <i>et al.</i> , 2019
Maranhao	Brasil	0	0	1	Perego <i>et al.</i> , 2009
Brasil	Brasil	27	0	0	Cardoso <i>et al.</i> , 2013
Los Lagos	Chile	2	1	2	de Saint Pierre <i>et al.</i> , 2012; Bodner <i>et al.</i> , 2012; Perego <i>et al.</i> , 2009
Tarapaca	Chile	0	1	1	Bodner <i>et al.</i> , 2012; Perego <i>et al.</i> , 2009
Biobio	Chile	0	2	0	Bodner <i>et al.</i> , 2012
Maule	Chile	0	2	1	Bodner <i>et al.</i> , 2012; Perego <i>et al.</i> , 2009
Valparaiso	Chile	0	3	0	Bodner <i>et al.</i> , 2012
Atacama	Chile	0	1	1	Bodner <i>et al.</i> , 2012; Perego <i>et al.</i> , 2009
Aisen	Chile	0	1	0	Bodner <i>et al.</i> , 2012
Araucania	Chile	0	1	0	Bodner <i>et al.</i> , 2012
Coquimbo	Chile	0	0	2	Perego <i>et al.</i> , 2009
Santiago de Chile	Chile	0	0	1	Perego <i>et al.</i> , 2009
Chile	Chile	18	2	10	de Saint Pierre <i>et al.</i> , 2012; Rieux <i>et al.</i> , 2014; Perego <i>et al.</i> , 2009
Amazonas	Colombia	26	6	0	Arias <i>et al.</i> , 2017
Guainia	Colombia	7	1	0	Arias <i>et al.</i> , 2017
Guaviare	Colombia	1	12	0	Arias <i>et al.</i> , 2017
Putumayo	Colombia	8	17	0	Arias <i>et al.</i> , 2017
Cauca	Colombia	37	0	0	Xavier <i>et al.</i> , 2015
Meta	Colombia	0	4	0	Arias <i>et al.</i> , 2017
Colombia	Colombia	11	3	0	Tamm <i>et al.</i> , 2007; Perego <i>et al.</i> , 2010; Rieux <i>et al.</i> , 2014
Ecuador	Ecuador	1	27	2	Brandini <i>et al.</i> , 2017; Di Corcia <i>et al.</i> , 2021
Cayapa	Ecuador	0	0	1	Tamm <i>et al.</i> , 2007
Chaco	Paraguay	1	0	0	Perego <i>et al.</i> , 2010

Localidad	País	C1	D1	D4h3	Referencia
Alto Paraná	Paraguay	15	15	1	Simao <i>et al.</i> , 2018
Apurímac	Perú	0	0	1	Perego <i>et al.</i> , 2009
Cajamarca	Perú	1	3	0	Perego <i>et al.</i> , 2010; Guevara <i>et al.</i> , 2020
Huanuco	Perú	1	0	0	Perego <i>et al.</i> , 2010
Cuzco	Perú	1	0	0	Perego <i>et al.</i> , 2010
Piura	Perú	1	0	1	Perego <i>et al.</i> , 2010; Perego <i>et al.</i> , 2009
Amazonas	Perú	11	47	0	Barbieri <i>et al.</i> , 2017; Guevara <i>et al.</i> , 2020
San Martín	Perú	1	1	0	Barbieri <i>et al.</i> , 2017
Lima	Perú	0	3	1	Llamas <i>et al.</i> , 2016; Perego <i>et al.</i> , 2009
Ancash	Perú	0	1	1	Perego <i>et al.</i> , 2009; Llamas <i>et al.</i> , 2016
Loreto	Perú	0	0	2	Perego <i>et al.</i> , 2009
Arequipa	Perú	0	0	4	Perego <i>et al.</i> , 2009
Perú	Perú	3	53	5	Tito <i>et al.</i> , 2012; Llamas <i>et al.</i> , 2016; Brandini <i>et al.</i> , 2017; Barbieri <i>et al.</i> , 2017; Perego <i>et al.</i> , 2009
Flores	Uruguay	1	3	0	Perego <i>et al.</i> , 2010; Figueiro <i>et al.</i> , 2022
Tacuarembó	Uruguay	2	2	0	Figueiro <i>et al.</i> , 2022
Montevideo	Uruguay	2	1	0	Figueiro <i>et al.</i> , 2022
Maldonado	Uruguay	4	1	0	Este trabajo
Rocha	Uruguay	2	0	0	Este trabajo
Uruguay	Uruguay	6	5	0	Perego <i>et al.</i> , 2010; Sans <i>et al.</i> , 2012; Sans <i>et al.</i> , 2015; Figueiro <i>et al.</i> , 2014; Figueiro <i>et al.</i> , 2015
San José	Uruguay	1	0	1	Este trabajo
Caracas	Venezuela	51	0	0	Gómez <i>et al.</i> , 2012
Venezuela	Venezuela	2	3	0	Brandini <i>et al.</i> , 2017; Lee <i>et al.</i> , 2015, Ingman <i>et al.</i> , 2001
Mérida	Venezuela	0	0	6	Gómez <i>et al.</i> , 2012; Gómez <i>et al.</i> , 2013; Gómez <i>et al.</i> , 2014; Gómez <i>et al.</i> , 2015; Gómez <i>et al.</i> , 2016
	Total	768	416	68	