

Análisis de Linajes Maternos en Poblaciones Indígenas Americanas

Claudio M. Bravi

Pilar Peral García
Director

Néstor O. Bianchi
Co-director

Facultad de Ciencias Naturales y Museo
Universidad Nacional de La Plata

2005

A mi familia.

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mis Directores de Tesis, Pilar Peral García y Néstor Bianchi. Fue en el laboratorio del Dr. Bianchi, en el IMBICE, donde inicié mis estudios de ADN mitocondrial y Antropología Molecular. Y fue Pilar quien nunca agotó paciencia y creatividad en pos de cumplir su rol en todos estos años.

Agradezco también a Graciela Bailliet, quien pacientemente supervisó mis primeros encuentros con fenoles, agarosas, *primers* y polimerasas. Y no sólo eso.

Muchos amigos, especialmente Guillermo Giovambattista y Gastón Murias, y varios colegas *senior* y *junior*, alentaron el fin de este trabajo y colaboraron al efecto. Estela Izuel digitalizó las fotografías.

Contribuyeron con información inédita y/o secuencias en formato electrónico: Sandro Bonatto, Mauricio Moraga, Pilar Carvallo, David G. Smith, Joseph Lorenz, Ripan Malhi, Masashi Tanaka, Thomas Parsons, Luis Carvajal Carmona, Andrés Ruiz Linares, Henrik Kaessmann, Masha Golubenko, Mónica Sans, Charles Ginther, Alexandre Vieira, Jeff Murray, Lance Green, Francesc Calafell, Yong-Gang Yao y Soong Deok Lee.

Especial agradecimiento vaya para Carolina Bonilla y Rachel Zemans, remitentes de selectos textos desde lejanas tierras boreales. Y otro tanto a mis compañeros y colegas del Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE) y del Centro de Investigaciones en Genética Básica y Aplicada (CIGEBA).

El trabajo experimental de esta Tesis fue realizado durante mi estadía en el IMBICE, en el marco de Becas de Iniciación y Perfeccionamiento del CONICET. La compilación y análisis de secuencias publicadas, así como la redacción de un primer borrador de este trabajo fueron realizados en el CIGEBA gracias a una Beca de Formación Superior de la Universidad Nacional de La Plata y un subsidio de Fundación Antorchas.

Esta Tesis difícilmente hubiera existido sin el apoyo de los antes mencionados, ya personal, ya colectivamente. Pero fue Angélica el principal catalizador de su concreción. A todos, muchas gracias.

Indice

El Poblamiento Humano de América	7
1.1- La evidencia arqueológica	7
1.2- La evidencia bioantropológica	9
1.2.1- Antropología Dental.....	9
1.2.2- Estudios osteológicos.....	9
1.3- Aportes de la Lingüística Histórica	10
1.4- Contribuciones de la Antropología Molecular	12
De los Grupos Sanguíneos al Genoma Humano.....	12
Marcadores moleculares “clásicos”.....	14
Marcadores “clásicos” en América.....	15
Marcadores de ADN.....	16
Historia Natural del ADN mitocondrial	18
2.1- Introducción	18
2.2- Biogénesis mitocondrial	19
2.3- Origen endosimbiótico de las mitocondrias	19
2.4- El ADN mitocondrial	20
2.5- El ADN mitocondrial animal	22
2.6- El ADN mitocondrial humano	22
2.6.1- Estructura.....	22
2.6.2- Regiones no codificantes del ADNmt.....	23
La Región Control.....	23
2.6.3- Heredabilidad.....	26
2.6.4- Número de mitocondrias y copias de ADNmt por célula.....	27
2.6.5- Evolución del ADN mitocondrial.....	28
Estimaciones de tasa de evolución para el ADNmt humano.....	31
Estimaciones basadas en el método filogenético.....	31
Estimaciones basadas en el método genealógico.....	33
Contraste entre las tasas filogenética y genealógica para la Región Control.....	33
2.6.6- Naturaleza de la variación en la Región Control.....	34
Regiones Hipervariables y Regiones Conservadas.....	34
Heterogeneidad en la tasa sustitucional entre sitios.....	35

Patrón de sustituciones.....	35
2.6.7- Heteroplasmia.....	35
ADN mitocondrial y evolución humana.....	38
3.1- Los primeros estudios: análisis de baja resolución mediante PLFR y electroforesis.....	38
3.2- Amplificación enzimática: RCP-PLFR de alta resolución y secuenciación de regiones hipervariables.....	39
3.3- Refinando la filogenia del ADNmt: de la secuenciación de algunas regiones codificantes a la secuenciación de genomas completos.....	40
ADN mitocondrial y el Poblamiento Humano de América.....	44
4.1- De los estudios iniciales al primer consenso.....	44
4.2- Un quinto haplogrupo mitocondrial en América.....	47
4.2.1- Distribución étnico-geográfica del haplogrupo X.....	48
4.3- ¿Hay evidencia de más de 5 haplogrupos mitocondriales en América?.....	50
4.3.1- Linajes X6 y X7: un enfoque afilogenético y varios problemas metodológicos.....	50
4.3.2- El linaje “Cayapa”, una variante del haplogrupo D.....	54
4.4- Grupos naturales vs. grupos polifiléticos: utilidad del marcador 16517e.....	55
4.5- Un poco de ruido en el sistema: reversiones de sitios diagnóstico y otras homoplasias. 57	57
4.5.1- ¿Heterogeneidad de linajes dentro del haplogrupo B americano o recurrencia para el marcador +10394c?.....	58
Linajes maternos autóctonos y alóctonos en poblaciones aborígenes americanas.....	60
5.1- Materiales y Métodos.....	60
5.1.1- Nomenclatura.....	60
5.1.2- Poblaciones estudiadas.....	62
5.1.3- Extracción de ADN genómico total.....	64
Extracción basada en Chelex® 100.....	64
Extracción orgánica basada en el protocolo de John y col. (1991).....	65
5.1.4- Tipificación de haplogrupos mitocondriales.....	66
Amplificación de los fragmentos.....	66
Digestión enzimática.....	68
Electroforesis. Verificación de las amplificaciones y de las digestiones.....	69
Electroforesis. Polimorfismo de la Región V.....	69
Secuenciación de la Región Hipervariable I.....	70
Amplificación del templado.....	70

Purificación y cuantificación del templado.....	70
Reacción de secuenciación.....	71
Electroforesis.....	72
Preparación del gel.....	72
Soluciones utilizadas.....	73
Exposición y revelado.....	73
5.2- Resultados y Discusión.....	74
5.2.1- Origen de la introgresión europea y africana mediada por mujeres en Patagonia.....	78
Diversidad de haplotipos fundadores para el haplogrupo D en América.....	80
6.1- Antecedentes.....	81
6.2- Enfoque experimental.....	83
6.3- Materiales y Métodos.....	84
6.3.1- Poblaciones analizadas para la posición 2092.....	84
6.3.2- Tipificación de la mutación C→T 2092.....	85
Amplificación del fragmento de interés.....	85
Digestión y electroforesis.....	87
6.3.3- Secuenciación de la Región Hipervariable I.....	87
6.3.4- Análisis filogeográfico de los linajes “Cayapa”.....	88
Compilación de secuencias RHV-I de origen asiático y americano.....	88
Identificación de haplotipos “Cayapa” y linajes relacionados.....	88
Construcción de redes de haplotipos.....	88
6.4- Resultados y Discusión.....	89
6.4.1- Distribución de variantes para la posición 2092.....	89
6.4.2- Correlación entre RHV-I y polimorfismos para la posición 2092.....	89
6.4.3- Filogeografía del linaje “Cayapa”.....	91
Distribución étnico-geográfica.....	95
Linajes asiáticos filogenéticamente afines a los “Cayapa” americanos.....	96
6.4.4- Filogeografía de los sub-haplogrupos D a ambos lados del Estrecho de Bering.....	99
El caso americano.....	99
Al oeste de Bering: sub-haplogrupos de D en Asia.....	100
6.5- Comentarios finales.....	101
Un origen híbrido para Esquimales y Aleutianos.....	101
Un Nuevo Mundo para ¿pocos? fundadores.....	102
Bibliografía.....	104

El Poblamiento Humano de América

A partir del “descubrimiento” del Nuevo Mundo por Colón en 1492, los europeos ilustrados buscaron una explicación para el origen de sus habitantes en las fuentes históricas por excelencia de la época: las Sagradas Escrituras. Así, durante unos 300 años la interpretación más favorecida fue que los nativos del Nuevo Mundo debían ser descendientes de las Diez Tribus Perdidas de Israel, aunque también se postularon ancestros fenicios, egipcios, griegos, troyanos, romanos, etruscos, tártaros, irlandeses, galeses, vikingos, vascos, portugueses e incluso sobrevivientes del continente perdido de la Atlántida, entre otros (Meltzer 1994). Entre mediados y fines del siglo XVIII naturalistas como el Conde de Buffon y Blumenbach reconocieron las similitudes de, y postularon parentescos entre, los indígenas americanos y grupos mongoloides como tártaros, chinos y japoneses (Crawford 1998).

Pero es con el desarrollo de los estudios científicos modernos, realizados a lo largo de los últimos 120 años, que la cuestión del origen y antigüedad del hombre americano se ha visto enormemente beneficiada. Sin los aportes de disciplinas como la Arqueología, la Lingüística, la Antropología Biológica, la Geología y la Paleontología, nuestro conocimiento sobre la más moderna de las expansiones continentales de nuestra especie no pasaría de ser de mera especulación.

1.1- La evidencia arqueológica

Hasta la década iniciada en 1920, y bajo la poderosa influencia de Aleš Hrdlička, el consenso entre los arqueólogos y antropólogos biólogos era que América había sido ocupada tardíamente, y sólo por el hombre moderno, hacia los 5.000-6.000 años A.P. (Antes del Presente). En 1927, una cuidadosa excavación en la localidad de Folsom, (New Mexico, E.U.A.) condujo al descubrimiento de 19 puntas de proyectil de indudable factura humana, íntimamente asociadas a los restos de más de 20 individuos de *Bison antiquus*, una especie extinta de bisonte. Este hallazgo otorgó a la presencia del hombre en el continente una profundidad temporal mínima: América ya estaba poblada antes del fin de la última glaciación, a fines del Pleistoceno superior.

La primera sugerencia de una vía de poblamiento terrestre desde Asia a través del actual Estrecho de Bering fue propuesta por un geólogo canadiense en 1933. En un simposio dedicado a discutir el origen y la antigüedad del hombre en América, W. Johnston señaló la relación entre los ciclos glaciales, la oscilación del nivel del mar y la aparición y desaparición de un puente terrestre continuo entre Alaska y el nordeste siberiano (citado en Dixon 1999:10).

Desde 1927, los hallazgos de grandes puntas de proyectil de edad fini-pleistocénica se sucedieron a lo largo y ancho de todo el continente, desde Canadá hasta Tierra del Fuego. Los más antiguos de estos proyectiles fueron inicialmente hallados cerca de Clovis, otra localidad de New Mexico que, transformada en localidad-tipo, prestó su nombre para una cultura que por mucho tiempo fue considerada la más temprana del continente. La interpretación de que un pueblo cuya economía se basaba en la caza de grandes mamíferos era distinguible como el primero del continente predominó en el pensamiento arqueológico durante gran parte del siglo XX, al menos entre los investigadores norteamericanos. Hoy sabemos que todos los sitios Clovis tienen una antigüedad acotada entre los 11.200 y 10.800 años radiocarbónicos A.P., y que existen varios sitios arqueológicos con fechados indisputables de igual o mayor antigüedad, tanto en Norte como Sud América.

Es en el extremo sur del continente, paradójicamente, donde la evidencia acumulada permite confirmar la presencia humana por lo menos 1.000 años antes de la aparición de la cultura Clovis. Sitios como Monte Verde en Chile y Piedra Museo en Argentina (Miotti y Salemme 2003), ubicados unos 16.000 km al sur de la supuesta vía de poblamiento continental, son claros testimonios que refutan el paradigma de Clovis como primera cultura americana.

Otras localidades, o componentes de localidades arqueológicas, han sido informadas como mucho más antiguas pero no son ampliamente aceptadas. Algunas de las más conocidas son:

- Meadowcroft Rockshelter (Pennsylvania, E.U.A.), donde James Adovasio y colaboradores han propuesto presencia humana para los ~19.000 años A.P. (Adovasio y col. 1998);

- varios sitios del estado de Piauí, en Brasil, donde Niede Guidon y su grupo han postulado fechas de presencia humana de 32.000 y hasta 48.500 años A.P. (Guidon y Delibrias 1986, Parenti y col. 1996, Watanabe y col. 2003);

- el componente 1 de Monte Verde, con fechados de 33.000 años A.P.

Finalmente, la evidencia arqueológica también permite descartar un temprano contacto con Oceanía, ya que la expansión del hombre moderno en el Pacífico más allá de Melanesia comenzó hace aproximadamente unos 3.000 años. El poblamiento humano de Polinesia, el enorme triángulo que tiene por vértices a Hawaii en el norte, Nueva Zelanda en el sud-oeste e Isla de Pascua en el sud-este, finalizó hace apenas unos 1.200 años, con la primera y definitiva ocupación de las últimas dos localidades mencionadas. Para ese entonces América había estado poblada en forma continua por lo menos durante los últimos 10.000 años, desde Alaska hasta la Patagonia.

1.2- La evidencia bioantropológica

1.2.1- Antropología Dental

El uso de caracteres morfológicos de la corona y raíz dental, de variación cuasi-continua y polimórficos en diferentes poblaciones humanas, es de larga tradición en la Antropología Biológica (Scott y Turner II 1988). Fue el ya mencionado Hrdlička (1920) uno de los primeros en proponer un origen asiático para los nativos americanos en base a la morfología dental, al notar la alta incidencia de incisivos superiores en pala en muestras de esas poblaciones, contra lo observado en europeos y africanos (Turner II 2002).

Hanihara (1968) propuso la existencia de un “complejo dental mongoloide”, una combinación de caracteres que por presentarse en muy alta o muy baja frecuencia permitía distinguir las poblaciones de origen mongoloide de las restantes. Turner II profundizó el trabajo de Hanihara al distinguir dos patrones morfológicos al interior de las poblaciones mongoloides. Llamó sundadonte al patrón hallado en el sudeste asiático, y sinodonte al presente en el nordeste asiático y en todos los nativos americanos. Fue también este autor el primero en postular la hipótesis de tres migraciones que habrían dado origen, por separado, a las poblaciones peri-árticas, a los Na-dené del noroeste norteamericano, y a los Indios del resto del continente, basándose en la existencia de tres sub-patrones dentales temporal y espacialmente estables en América (Turner II 1984).

1.2.2- Estudios osteológicos

Numerosos estudios basados en el análisis de rasgos craneales métricos y no-métricos han demostrado la esperable afinidad asiático-americana al comparar muestras de poblaciones relativamente modernas (por ejemplo Howells 1989, Ishida 1993).

Pero el estudio de varios de los restos humanos más antiguos disponibles en América ha llevado a algunos autores a postular la existencia de una discontinuidad biológica entre aquellos y las poblaciones presentes en el continente a partir del Holoceno medio (para una revisión reciente véase Steele y Powell 2002). Steele y Powell (1992) describieron una muestra de “Paleoindios” norteamericanos craneofacialmente más parecidos a europeos y asiáticos sud-orientales que a poblaciones nor-asiáticas o americanas modernas. Estudios similares en individuos sudamericanos del Pleistoceno final-Holoceno temprano permitieron a Neves, Pucciarelli y colaboradores descubrir mayores afinidades morfológicas de estos restos con otros de origen australiano y africano, y postular que el poblamiento inicial del continente habría sido realizado por una población de morfología craneal generalizada en la que aun no se evidenciaban los rasgos mongoloides (Neves y Pucciarelli 1989, 1991; Neves y col. 1999; Powell y Neves 1999; Powell y col. 1999).

1.3- Aportes de la Lingüística Histórica

“We may say, quite literally and safely, that in the state of California alone there are greater and more numerous linguistic extremes than can be illustrated in all the length and breadth of Europe.”

Sapir y Swadesh 1946 (citado en Campbell 1998)

Tan temprano como en 1786, Thomas Jefferson reflexionó sobre el parecido existente entre los nativos americanos y los habitantes del este asiático, opinando que estos probablemente derivaran de aquellos. Esta aseveración se basó en la sola evidencia de la existencia de una mayor diversidad de lenguas “radicalmente diferentes” (sic) en América que en Asia (carta a Ezra Stiles, 1786, citado en Campbell 1998:92). El conocimiento lingüístico ha avanzado mucho desde los tiempos de Jefferson, y en la actualidad se reconoce la existencia de unas 1.200 lenguas en América. Sin embargo, es escaso el acuerdo entre los especialistas acerca de las relaciones genéticas discernibles entre ellas, sus vínculos putativos con lenguas del Viejo Mundo, y la antigüedad de su presencia en el continente.

La lingüística histórica intenta develar el origen y evolución de las lenguas. El fin último de esta disciplina es reconstruir grupos naturales de lenguas, grupos que reúnan lenguas que se parecen entre sí por descender de un ancestro común. El gran problema que enfrenta la disciplina, al igual que ocurre en las Ciencias Naturales, es distinguir entre

similitud homóloga (aquella derivada de la existencia de un ancestro común) de la similitud que puede derivar de mecanismos que generan ruido evolutivo, como los préstamos entre lenguas distintas, el origen onomatopéyico de algunos vocablos, el azar, etc.

Para el caso americano dos posiciones enfrentadas dominan el campo. La mayoría de los especialistas acuerda en reconocer la existencia de unos 150 *stocks* o clados reconstruibles de la mayor categoría (ver Nichols 1997 y trabajos allí citados), y sostienen que es imposible establecer relaciones genéticas superiores para la mayoría de ellos. Aproximadamente la mitad de estos clados están formados por una sola lengua, para las que no se pueden establecer relaciones genéticas conclusivas (Kaufmann y Golla 2000). Joseph Greenberg y Merrit Ruhlen, por el contrario, defienden que la evidencia disponible permite reunir todas las lenguas habladas en el continente en tres grandes grupos genéticos (Greenberg y col. 1986, Ruhlen 1991, Greenberg y Ruhlen 1992):

a) la familia Eskimo-Aleutiana, con unas 10 lenguas restringidas a las Islas Aleutianas y Commander, el extremo nordeste de Siberia, y las costas periárticas desde el sudoeste de Alaska hasta Groenlandia, pasando por Canadá;

b) la familia Na-Dené, formada por la reunión de 3 lenguas independientes (Haida, Tlingit y Eyak) y las 30 de la familia Athabaska. Las tres primeras se hablan o hablaron en las costas sudeste de Alaska y oeste de Canadá, mientras que la familia Athapaska tiene una distribución disyunta, cubriendo en forma continua el interior de Alaska y el centro-oeste de Canadá, y reapareciendo como los aislados geográficos Navajo y Apache en el sudoeste de E.U.A., y otras en las regiones costeras del norte de California y Oregon;

c) la familia Amerindia, reunión de todas las demás lenguas habladas en el continente, desde el norte de Canadá hasta Tierra del Fuego.

Las familias Eskimo-Aleutiana y Na-dené han sido ampliamente aceptadas como grupos naturales desde la propuesta inicial de Sapir en las primeras décadas del siglo XX, pero es en la existencia de una única familia Amerindia donde Greenberg recibe numerosos cuestionamientos de sus colegas. Quizá por su mayor simplicidad, es ésta la clasificación que más frecuentemente se ha usado en estudios de Antropología Molecular (por ejemplo Torroni y col. 1993, Cavalli-Sforza y col. 1994).

Las explicaciones acerca del origen de la enorme diversidad lingüística americana también han sido dispares. La distribución de los aproximadamente 250 *stocks* reconocidos en todo el mundo es muy irregular, ya que amplias regiones como el continente africano o Eurasia boreal (Eurasia sin el sur y sudeste asiático) albergan 14 y 15 *stocks*,

respectivamente, mientras que en América, el último de los continentes en ser poblado, habría unos 150 (Nichols 1990). Mientras que Greenberg y col. (1986) proponen tres migraciones relativamente recientes (en los últimos 12.000 años) que originaron cada una de sus familias, Nichols (1990) postula que la enorme variedad acumulada en el grupo Amerindio *sensu* Greenberg sería consecuencia de múltiples migraciones de lenguas ya diferenciadas, y con una antigüedad de hasta 35.000 años en el continente. Sin discutir la pertinencia de la división tripartita de Greenberg, Nettle (1999) utiliza la misma información que Nichols (1990) para reconciliar la diversidad presente en América con una muy reciente colonización.

1.4- Contribuciones de la Antropología Molecular

El empleo de marcadores moleculares para estudiar el origen y evolución de la diversidad biológica de nuestra especie distingue a la Antropología Molecular como una sub-disciplina dentro de la Antropología Biológica. Se entiende por marcador molecular a toda molécula, o fracción de molécula, que es polimórfica dentro de una población, especie, o taxón de categoría superior. En Genética de Poblaciones se acepta que un marcador molecular es polimórfico cuando presenta al menos dos formas distinguibles, llamadas alelos, y cuando el menos común de ellos tiene una frecuencia igual o mayor al 1 % en una población dada. Alelos con frecuencias menores son llamados “familiares” o “privados”.

De los Grupos Sanguíneos al Genoma Humano

En el desarrollo histórico de la disciplina podemos reconocer cuatro etapas, no necesariamente cronológicas, distinguibles en parte por el tipo de moléculas analizadas pero especialmente por las técnicas de detección empleadas.

En la más temprana las técnicas fueron inmunológicas, basadas en la reacción antígeno–anticuerpo, y las moléculas puestas en evidencia fueron proteínas, glicoproteínas, o grupos carbohidratos asociados a glicoproteínas o glicolípidos, de circulación libre en la sangre o bien asociadas a membrana en distintos tipos celulares. Los sistemas polimórficos descubiertos y analizados mediante estas técnicas son los grupos sanguíneos (como los sistemas AB0 y RH), las inmunoglobulinas (como los sistemas GM y KM), y el sistema de antígenos leucocitarios.

La segunda etapa se definió a partir del desarrollo de la electroforesis, una técnica que permite la separación de moléculas por su migración diferencial en un campo eléctrico.

Su aplicación permitió descubrir que la anemia falciforme se debía a la presencia de la hemoglobina S, una variedad alélica de la normal (Pauling y col. 1949), y pronto su uso se extendió al estudio de otras proteínas presentes ya en el citoplasma de algunos tipos celulares (como las enzimas eritrocitarias), ya en el plasma sanguíneo (como la albúmina).

Las siguientes dos etapas son subsidiarias tanto del descubrimiento de que los ácidos nucleicos son el material hereditario universal (Avery y col. 1944) cuanto del conocimiento de la organización molecular del ADN (Watson y Crick 1953). Aunque ambos hallazgos se hicieron al promediar el siglo XX, no fue sino hasta los 1970s que comenzó la tercera etapa, cuando la variabilidad poblacional de secuencias nucleotídicas pudo ser puesta en evidencia gracias a una técnica conocida por el acrónimo **RFLP** (del inglés **R**estriction **F**ragments **L**ength **P**olymorphism). El análisis de los **PLFRs** (**P**olimorfismos de **L**ongitud de **F**ragmentos de **R**estricción) se basa en la digestión del ADN mediante las llamadas endonucleasas de restricción, y en la resolución de los fragmentos resultantes según su tamaño mediante electroforesis. Estas enzimas de origen bacteriano son capaces de cortar una doble hélice de ADN dentro o cerca de una determinada secuencia de 4-8 pares de bases. La presencia o ausencia de sitios de reconocimiento para una enzima en cierto locus determina el tamaño de los fragmentos en que resultará digerido el ADN.

La última de las etapas representa un salto cualitativo y cuantitativo respecto de la anterior, consecuencia del desarrollo de la **Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)** por su acrónimo en inglés) a partir de 1986. Este método permite la síntesis *in vitro* de millones de copias de una secuencia específica de ADN (Mullis y col. 1986), que puede luego ser analizada mediante electroforesis, digestión enzimática, secuenciación, etc. La **RCP** facilitó la obtención de secuencias polimórficas de ADN a partir de cualquier tipo de tejido obtenido en poblaciones contemporáneas, y abrió el camino de la comparación diacrónica de información molecular de alta calidad, al permitir la replicación de material genético preservado en restos arqueológicos y paleontológicos. Baste a modo de ejemplo citar que disponemos al momento de secuencias mitocondriales de cuatro individuos atribuibles a *Homo sapiens neanderthalensis* (Krings y col. 2000). Finalmente, la **RCP** y otros desarrollos en Biología Molecular y análisis de datos a gran escala permitieron la secuenciación completa de numerosos genomas procariotas y eucariotas, incluyendo el humano (Lander y col. 2001).

Marcadores moleculares “clásicos”

Se denominan marcadores “clásicos” o bioquímicos a todos aquellos que se detectan como fenotipos, por oposición a los marcadores basados en polimorfismos de ADN. Los primeros estudios de polimorfismos “clásicos” se iniciaron en 1901, cuando el inmunólogo austriaco Karl Landsteiner publicó el descubrimiento del sistema de grupos sanguíneos AB0, proveyendo la primera evidencia de la existencia de variabilidad molecular al interior de una especie (Landsteiner, 1901). Aunque en aquel tiempo se creía que esas especificidades detectadas inmunológicamente podían ser consecuencia de la historia de enfermedades previas del portador, en 1910 von Dungern y Hirschfeld demostraron que las variantes observadas se heredaban en forma mendeliana (Owen 2000). El nacimiento formal de lo que podríamos llamar Genética Molecular de Poblaciones aconteció en 1919, cuando Hirschfeld y Hirschfeld describieron la variación hallada en las frecuencias para los alelos A y B del sistema AB0 entre las diferentes nacionalidades que combatieron en la Primera Guerra Mundial.

Sucesivas investigaciones a lo largo del siglo XX, promovidas por la importancia médica de los grupos sanguíneos, llevaron al descubrimiento de nuevos sistemas, como el MNS en 1927, el RH en 1940 y el Diego en 1954, entre otros (Cruse y Lewis 2001). En la actualidad se reconocen unos 25 sistemas de grupos sanguíneos, entre los cuales el sistema MNS está determinado por tres genes, el RH por dos y la mayoría de los demás por un único gen (Daniels 2001).

De especial interés para el estudio de los nativos americanos resultó el sistema Diego. En 1954, Levine y colaboradores describieron, en una pareja venezolana, la presencia de un sistema antígeno-anticuerpo causante de la enfermedad hemolítica del recién nacido, distinto de los sistemas AB0 y RH. Como el antígeno presente en el suero de la señora aglutinó los hematíes de su marido pero no los de unos 200 individuos “caucasoides” norteamericanos, los investigadores concluyeron que el factor sanguíneo debía ser un polimorfismo de baja incidencia, privado de la familia (Levine y col. 1954). Correspondió a Layrisse y Arends demostrar que ese antígeno tenía una amplia distribución poblacional en la población mestiza e indígena venezolana (Layrisse y Arends 1956). El antígeno fue llamado Diego (Di*A), en homenaje al segundo hijo de aquella familia venezolana en que se descubriera, fallecido como consecuencia de eritroblastocis fetal. Este fue el primer grupo sanguíneo en mostrar la existencia de alelos con distribución étnica restringida, ya que DI*A sólo está presente en poblaciones mongoloides del Nuevo y Viejo Mundo (para una exhaustiva revisión reciente ver Layrisse y Wilbert 1999).

Marcadores “clásicos” en América

A la fecha se han publicado numerosos estudios utilizando marcadores clásicos en poblaciones americanas. Salzano y Callegari-Jacques (1988), en una revisión para poblaciones sudamericanas, compilaron información sobre 72 sistemas genéticos presentes en 259 trabajos publicados hasta 1983. El más antiguo trabajo conocido por estos autores es aquel en que Salvador Mazza informa los grupos sanguíneos presentes en indígenas del noroeste argentino (Mazza y Francke 1927). Revisiones similares para América del Norte pueden encontrarse en Szathmary (1984, 1993).

El examen de marcadores clásicos ha revelado la existencia de una jerarquía en la distribución de alelos. Existen alelos privados de una tribu o grupo de etnias relacionadas o vecinas, como el alelo TF*D-GUA de la transferrina y el ACP*GUA de la fosfatasa ácida 1, dos de varias formas restringidas a poblaciones de lengua chibcha de Centro América (Thompson y Neel 1996). Algunos sistemas genéticos muestran alelos de amplia distribución dentro de un subcontinente, como las formas AI*Naskapi y AI*Mexico de la albúmina en Norte América (Smith y col. 2000), mientras que otros tienen una distribución pan-americana, como el alelo TF*C4 de la transferrina (Kamboh y Ferrell 1987). Hay marcadores compartidos por poblaciones mongoloides del Viejo y Nuevo Mundo, como el ya mencionado DI*A, y otros que permiten inferir introgresión reciente de origen europeo o africano en las poblaciones nativas, como Hb*S para hemoglobina y RH*cDe para el sistema RH.

El más extensivo y reciente de los análisis de marcadores clásicos es el realizado por Cavalli-Sforza y col. (1994), quienes analizaron 49 marcadores en poblaciones de todo el mundo. En el apartado dedicado a nativos americanos utilizaron la información disponible para 124 poblaciones del continente, reunidas en 23 grupos en base a criterios lingüísticos. El análisis de distancia genética entre poblaciones confirmó el acuerdo entre lingüística, caracteres dentales y genéticos propuesta en la división tripartita de Greenberg y col. (1986). Otra conclusión relevante de este estudio fue el reconocimiento de la deriva génica al azar como uno de los mecanismos evolutivos más importantes que habrían afectado la diferenciación genética de los nativos americanos. En efecto, en ningún otro continente se observan tan drásticas variaciones de frecuencias alélicas entre poblaciones como en América.

Marcadores de ADN

Los notables desarrollos de la Biología Molecular en los últimos 15 años han redundado en un mejor conocimiento de la organización de los genomas eucariotas, consecuencia del cual disponemos en la actualidad de muchas clases distintas de marcadores polimórficos de ADN. Entre los más utilizados se destacan:

a) las mutaciones de punto en regiones codificantes o no codificantes del genoma, conocidas como **SNPs** (del inglés **Single Nucleotide Polymorphisms**);

b) las inserciones o deleciones de cierta cantidad de pares de bases, también llamadas **indels**;

c) las secuencias repetidas en tándem, en las que un monómero se presenta un número variable de veces. Conocidos como **VNTRs** en la literatura (del inglés **Variable Number of Tandem Repeats**), se los distingue usualmente como microsatélites y minisatélites, según el tamaño del repetido oscile entre 1-6 o 15-100 pares de bases, respectivamente;

d) los elementos transponibles, secuencias de tamaño variable que se replican e intercalan al azar en el genoma.

Todos los tipos de marcadores mencionados arriba han sido utilizados en estudios de poblaciones humanas, y aplicados a diferentes regiones o locus de interés. Pero hay dos fracciones del genoma humano que han recibido especial atención, por la alta calidad de la información que pueden otorgar: el ADN mitocondrial y la región Y-específica de cromosoma Y. Ambas son regiones de ligamiento completo, que se transmiten en bloque de una generación a la siguiente. En ausencia de recombinación, las mutaciones se acumulan en forma secuencial y de esta forma el estudio apropiado de estas regiones particulares tiene el potencial de revelar la información históricamente acumulada en la secuencia. Al tener un número efectivo menor que las secuencias y marcadores ubicados en los autosomas y el cromosoma X, son más sensibles a cambios producidos por deriva al azar, y por lo tanto buenas herramientas para distinguir poblaciones estrechamente emparentadas. Cada uno de estos sistemas muestra un patrón de herencia sexo-específico, ya que el ADNmt es transmitido por las mujeres mientras que sólo los varones heredan la región Y-específica de sus progenitores masculinos.

Otras características distinguen al ADNmt: posee una mayor tasa mutacional relativa que secuencias comparables del genoma nuclear y, por estar presente en gran

número de copias por célula, suele ser el único material genético recuperable en restos arqueológicos.

Finalmente, la existencia de una marcada estructura geográfica para los linajes mitocondriales y del cromosoma Y en las diferentes poblaciones continentales permite cuantificar el grado, origen étnico/geográfico y sesgo por sexo en casos de introgresión o hibridación de poblaciones.

Historia Natural del ADN mitocondrial

2.1- Introducción

Las mitocondrias son organoides de localización citoplasmática presentes en la mayoría de las células eucariotas, cuya principal función consiste en generar energía bajo la forma de ATP mediante la fosforilación oxidativa.

Las primeras referencias acerca de estructuras intracelulares que probablemente representaran mitocondrias datan de observaciones citológicas realizadas a mediados del siglo XIX (Ernster y Schatz 1981). Correspondió a Altmann (1890) desarrollar una técnica de tinción más o menos específica para estos corpúsculos, basada en el empleo de fucsina ácida, así como determinar su presencia universal en diferentes tipos celulares. Propuso llamarlos “bioblastos”, y sugirió que eran formas elementales de vida que existían en todos los tipos celulares y que, como las bacterias a las que se parecían, eran probablemente capaces de tener vida independiente.

Benda, en 1897, acuñó el nombre por el cual las mitocondrias son conocidas en la actualidad. Compuesto a partir de los términos griegos *mitos* (filamento) y *chondros* (gránulo), el término hace referencia al aspecto ya de gránulos, ya de filamentos, con que estas estructuras eran percibidas al microscopio óptico en diferentes preparados celulares. Michaelis (1900) demostró que las mitocondrias se teñían selectivamente in vivo con el colorante verde Jano B, indicador de óxido-reducción, mientras que Kingsbury (1912) sugirió que en ellas se producían las reacciones de oxidación. La asociación específica de la actividad respiratoria con las mitocondrias correspondió a Hogeboom y colaboradores, en 1948, quienes demostraron la coexistencia de actividad succinato-oxidasa, citocromo-oxidasa y partículas filiformes que se teñían con verde Jano B en una fracción de homogenato celular.

En 1949, Kennedy y Lehninger demostraron que la fracción mitocondrial del homogenato de hígado de rata era la única en la que se producía la oxidación de los metabolitos del ciclo del ácido cítrico, la oxidación de los ácidos grasos, y la síntesis simultánea de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico. Utilizando microscopía electrónica, Palade (1952) fue el primero en describir la organización ultraestructural de estas organelas.

2.2- Biogénesis mitocondrial

Ya en 1914, Lewis y Lewis observaron que las mitocondrias cambian frecuentemente de aspecto, que las formas filamentosas podían fragmentarse en otras granulares, y que estas podían fundirse entre sí revirtiendo el fenómeno anterior. Estas observaciones fueron ampliamente confirmadas, e incluso filmadas, a partir de la introducción del microscopio de contraste de fases, en 1934. Frédéric (1958) fotografió a intervalos un ciclo celular completo utilizando un microscopio de contraste de fases, y observó que el número de mitocondrias aumentaba por alargamiento y fragmentación de organelas preexistentes.

Aunque durante mucho tiempo se creyó que las mitocondrias podían generarse de novo a partir de otras estructuras celulares, el descubrimiento de que en ellas se sintetizan diversos componentes estructurales tales como proteínas, ácidos grasos y fosfolípidos (Roodyn y col. 1962, Kroon 1963), y los experimentos que demostraron la incorporación de precursores marcados radiactivamente y su distribución homogénea en las organelas tras varios ciclos de reproducción celular (Luck 1963) avalaron la interpretación de que las mitocondrias crecen por adición de material para luego dividirse y segregarse entre las células hijas.

2.3- Origen endosimbiótico de las mitocondrias

“For those who have sought homologies in the localization of respiratory enzymes in bacterial cells and in cells of higher organisms, the most appropriate choice of a structure homologous with the mitochondrion is the entire bacterial cell...”
Marr (1960)

“It can be said that the statement ‘*what is good for E. coli is good for an elephant*’ should rather read ‘...*is good for an elephant’s mitochondria.*’”
Nass y col. (1965)

Como ya citáramos anteriormente, las afinidades bacterianas en forma y tamaño al nivel de resolución del microscopio óptico de las mitocondrias fueron notadas por Altmann a fines del siglo XIX. Fueron Portier (1918, citado en Nass y col. 1965) y Wallin (1922, 1923, 1927, citado en Nass y col. 1965, y en Margulis 1970) los primeros en proponer que las mitocondrias derivarían de bacterias que habrían establecido una relación simbiote con otras células. Este último autor basó su propuesta en observaciones microscópicas y en la similitud de las afinidades tintóreas de los organoides y las bacterias, y sostuvo que fue

capaz de aislar y hacer crecer mitocondrias en condiciones de laboratorio, hecho que fue luego refutado y que llevó su obra al descrédito (Margulis 1971).

Desde la versión inicial de Schimper y Meyer (1883) respecto de los cloroplastos, y las de Portier (1918) y Wallis (1922, 1923, 1927) aplicadas a las mitocondrias, numerosos autores han postulado la hipótesis de la simbiosis intracelular hereditaria como mecanismo principal por el cual se habrían originado diferentes organoides a partir de formas de vida libre (v.g. Lederberg 1952, Ris y Plaut 1962, citados en Margulis, 1970). Correspondió a Lynn Margulis-Sagan (Sagan 1967, Margulis 1970) proponer una versión moderna y unificada de estas ideas, conocida como Teoría Endosimbionte del Origen de las Células Eucariotas, según la cual mitocondrias, corpúsculos basales y plástidos derivarían de diferentes ancestros procariotas que habrían establecido relaciones de endosimbiosis hereditaria con una célula huésped.

Un origen eubacteriano para las mitocondrias es respaldado ampliamente por diversos hallazgos, tales como el pequeño tamaño de los ARNs ribosomales, la sensibilidad de la síntesis proteica mitocondrial a ciertos antibióticos como cloranfenicol, eritromicina o tetraciclina, y el uso de formil-metionina como aminoácido inicial en la traducción. Recientes análisis de secuencias de ADN bacteriano y ADN mitocondrial (para una revisión ver Gray 1999) han reforzado la hipótesis de un origen monofilético y eubacteriano del genoma mitocondrial. Entre los diferentes taxa estudiados, los miembros de la subdivisión rickettsial de las α -Proteobacteria (a la que pertenecen parásitos intracelulares obligados como *Rickettsia* y *Anaplasma*) están considerados como las formas eubacterianas conocidas más afines a las mitocondrias (Lang y col. 1999).

2.4- El ADN mitocondrial

Junto con los cloroplastos, las mitocondrias son las únicas organelas portadoras de material genético: mientras que la mayor parte del ADN presente en las células eucariotas se halla confinado en el núcleo, cada una de estas organelas posee un genoma funcional y estructuralmente distinto del presente en el núcleo celular.

Aunque en 1957 Chevremont y col. demostraron que en ciertas condiciones las mitocondrias de células en cultivo daban positivo para la reacción de Feulgen, que tiñe al ADN, hasta 1963 prevaleció la idea de que este ácido nucleico sólo poseía localización nuclear. Si bien varios análisis bioquímicos indicaban que las fracciones mitocondriales de homogenatos celulares eran portadoras de hasta el 12% del ADN total presente en las

células (Hogeboom y col. 1955, Martin y Morton 1956), esta cantidad fue interpretada como una contaminación con ADN nuclear hasta que Nass y Nass (1963), utilizando microscopía electrónica y técnicas citoquímicas, observaron la presencia de filamentos sensibles a la ADNasa pero no a la ARNasa ni a la pepsina en el interior de mitocondrias de células de embrión de pollo, filamentos que fueron interpretados como moléculas de ADN. Una confirmación independiente de estas observaciones corrió por cuenta de Luck y Reich (1964), quienes aislaron ADN mitocondrial de *Neurospora* utilizando técnicas bioquímicas, y por Schatz y col. (1964), quienes aislaron y cuantificaron el ADN extraído de mitocondrias de levaduras. La ocurrencia universal de ADN mitocondrial fue observada por Nass y col. (1965) en raíz de cebolla, protistas, y en 17 especies animales pertenecientes a siete *phyla*.

El ADNmt cumple un papel fundamental en todas las células eucariotas que lo poseen, codificando un número limitado de ARNs y proteínas esenciales para la formación de una mitocondria funcional. La mayoría de estas proteínas son componentes de los complejos enzimáticos de la cadena de transporte de electrones (complejos I-IV) y del complejo V, la sintetasa de ATP. Parte de la maquinaria molecular necesaria para la traducción de los ARN mensajeros mitocondriales también son especificados por el ADNmt: dos, o menos frecuentemente tres, ARN ribosomales (ARNr); y un complemento parcial o total de ARNs de transferencia (ARNt). En plantas y protistas, pero no así en animales ni en la mayoría de los hongos, algunas de las proteínas que forman los ribosomas mitocondriales también son codificados por el ADNmt.

En su larga historia de simbiosis, las mitocondrias han transferido la mayor parte de sus genes al núcleo, conservando en su genoma una fracción muy pequeña del total de la información genética necesaria para un correcto funcionamiento del organoide. El análisis de los diferentes genomas mitocondriales secuenciados en forma completa indica que existe una enorme variabilidad de tamaños, organización y contenido génico. El genoma mitocondrial de *Plasmodium falciparum*, el más pequeño de los conocidos, tiene una longitud de 6.000 pares de bases y codifica sólo tres proteínas y dos ARNr (Feagin 1994). El mayor de los ADNmt secuenciados es el de una planta, *Arabidopsis thaliana*, con un tamaño de 367 kb (kilobases) y un contenido génico que especifica 32 proteínas (Unsold y col. 1997).

Un notable ejemplo de la reducción en contenido génico del ADNmt se puede obtener fácilmente al comparar los genomas mitocondriales con los genomas de los procariotas filogenéticamente relacionados. Así, aunque el genoma de la α -proteobacteria

Rickettsia prowazekii es apenas tres veces más grande que el de *A. thaliana* (Andersson y col. 1998), su contenido génico es 26 veces mayor. Por otra parte, el genoma mitocondrial más rico en genes conocido hasta el momento, el del flagelado *Reclinomonas americana*, con 97 genes, es así y todo casi un orden de magnitud menor que el de la eubacteria *Rickettsia prowazekii* (Lang y col. 1997). Esta comparación adquiere una dimensión mayor cuando se tiene en cuenta que el de este taxón, con 834 genes codificantes para proteínas, es ya un genoma muy reducido, probable consecuencia de su estilo de vida parasítico.

2.5- El ADN mitocondrial animal

A septiembre del 2004, unas 492 secuencias mitocondriales completas han sido publicadas para diversas especies de metazoos (Boore 1999 y referencias allí citadas; Organelle Genome Resources¹, National Center for Biological Information). Una comparación de estas secuencias ha puesto en evidencia un claro patrón de conservadurismo estructural: por un lado, con un tamaño que oscila generalmente entre 15 a 20 kb, el de los animales es un genoma mitocondrial relativamente pequeño. Por otra parte, y con pocas excepciones, es portador de los mismos 37 genes: 13 codificantes para proteínas, dos para ARNs ribosomales y 22 para ARNs de transferencia (Boore 1999).

Otros rasgos estructurales también se hallan notablemente conservados: salvo la notable peculiaridad de varios Cnidarios (Cubozoa, Scyphozoa e Hydrozoa) y un crustáceo que poseen moléculas lineales (Bridge y col. 1992, Raimond y col. 1999), en los demás taxa analizados el ADNmt se presenta como una doble cadena cerrada sobre sí misma. Asimismo, es frecuente la existencia de una única región no codificante de gran tamaño en la que, al menos para algunos taxones, se ubican las secuencias responsables de la replicación y transcripción (Shadel y Clayton 1997).

2.6- El ADN mitocondrial humano

2.6.1- Estructura

El humano fue el primero de los genomas mitocondriales en ser secuenciado en forma completa (Anderson y col. 1981). Esta primer secuencia humana completa es conocida como la Secuencia de Referencia de Cambridge (SRC) y fue la utilizada como referencia hasta 1999, cuando fue reemplazada por una versión corregida obtenida a partir

¹ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/ORGANELLES/mztax_short.html

de la muestra de ADN original (Andrews y col. 1999). Con un tamaño de 16569 pares de bases, la estructura y contenido génico del ADNmt humano son similares a los de otros genomas mamalianos (Figura 1).

Dado que existe una distribución diferencial de guanina y citosina entre ambas cadenas, una de ellas es más pesada que la otra, y esta característica es utilizada para diferenciarlas. La cadena liviana, rica en residuos citidina, actúa como templado para un polipéptido (ND6: subunidad 6 de la NADH deshidrogenasa) y ocho ARNs de transferencia, mientras que la cadena pesada codifica los restantes doce polipéptidos y catorce ARNt, así como también los ARN ribosomales pequeño (12S) y grande (16S).

La secuencia del ADNmt muestra una notable economía de organización: los genes no están interrumpidos por intrones, algunas de las secuencias codificantes de polipéptidos superponen sus marcos de lectura (Anderson y col. 1981) y, en muchos casos, parte de los codones de terminación no están presentes en el ADNmt, siendo generados post-transcripcionalmente por poli-adenilación de los ARN mensajeros (Ojala y col. 1981).

2.6.2- Regiones no codificantes del ADNmt

Con la excepción de la secuencia correspondiente al origen de replicación de la cadena liviana, y de las regiones Control y V, casi no existen posiciones no codificantes: la mayoría de los genes están yuxtapuestos o separados por una o unas pocas bases no codificantes (ver Fig. 2 en Anderson y col. 1981). El origen de replicación de la cadena liviana es una secuencia de 31 pares de bases ubicada dentro de un grupo de cinco ARNt, entre las posiciones 5730 y 5760 según la secuencia Cambridge (Figura 1; Anderson y col. 1981). La Región V, flanqueada por los genes codificantes para la citocromo-oxidasa II y el ARNt^{Lis}, se extiende entre las posiciones 8270 y 8294. Se caracteriza por poseer una secuencia básica de 9 pares de bases (5'-CCCCCTCTA-3') que puede presentarse como copia única o bien repetida en tándem dos a cuatro veces. La Región V con dos repetidos tiene una longitud de 25 pares de bases, y es considerada la ancestral por ser la más frecuente en diferentes poblaciones humanas y la única hallada en primates antropomorfos.

La Región Control

Con una extensión de 1122 pares de bases, la Región Control es la única porción no codificante de gran tamaño (Figura 1). Flanqueada por los ARNt^{Fen} y ARNt^{Pro}, en ella se

Figura 1. Mapa esquemático del ADN mitocondrial humano. Se muestra la localización y tamaño relativo aproximado de los genes y de la Región Control. En blanco se indican los genes codificantes para proteínas y en celeste o azul se muestran los ARNr. Los ARNt se denotan por su aminoácido cognato como barras grises o negras, de tamaño relativo exagerado para facilitar su visualización. Los ocho ARNt codificados por la cadena liviana se muestran al interior del mapa. Las flechas acodadas indican los orígenes de replicación de las cadenas pesada (OH) y liviana (OL), así como los promotores de transcripción de cada cadena (PH, PL).

concentra la mayoría de las secuencias reguladoras: el origen de replicación de la cadena pesada (Anderson y col. 1981), los orígenes y promotores de transcripción de ambas cadenas (Cantatore y Attardi 1980), dos sitios de unión para factores de transcripción, tres bloques de secuencias conservadas (BSC) asociados con el inicio de la replicación, y las secuencias asociadas (SAT) al fin de síntesis del asa-D o asa de Desplazamiento (Displacement-loop o D-loop en la literatura anglosajona).

La Región Control es, en los Metazoa, la porción del ADNmt más variable en secuencia y longitud, contrastando en ese sentido con el conservadurismo que se observa en

el resto de la molécula. Comparaciones intra- e inter-específicas han permitido establecer la existencia de tres segmentos estructurales-funcionales: un Dominio Central, muy estable filogenéticamente, y las porciones flanqueantes, más variables: el Dominio 5' o BSC (Bloque de Secuencias Conservadas) y el Dominio 3' o SAT (Secuencias Asociadas a la Terminación) (Walberg y Clayton 1981, Saccone y col. 1991, Sbisá y col. 1997).

Aunque en la literatura es muy frecuente el uso indistinto de Región Control y Asa-D como sinónimos, lo cierto es que ésta última se halla contenida dentro de aquella, ocupando ~ 60% de su extensión. Dado que el sistema de numeración de la secuencia de referencia comienza arbitrariamente en medio de la Región Control, ésta se extiende en forma continua entre las posiciones 16024-16569 y 1-576. El asa-D es una región de triple cadena generada por la síntesis de un fragmento de la cadena pesada, el ADN 7S, que se aparee con la secuencia complementaria de la cadena liviana. En los seres humanos se han descrito cuatro especies de ADN 7S, con longitudes variables entre 571 y 656 pb. El extremo 3' se extiende entre las posiciones 16104-16106, mientras que los diferentes extremos 5' se distribuyen entre las posiciones 108 y 191 (Walberg y Clayton 1981).

En 1983, Greenberg y col. analizaron la distribución de polimorfismos en un fragmento de ~ 900 pb de la Región Control. Utilizando 7 secuencias humanas obtenidas entre las posiciones 16129 y 459, notaron que la tasa de sustitución era significativamente heterogénea en la región analizada, con una concentración de sitios variables en las dos regiones distales. En 1989, Vigilant y colaboradores informaron que un estudio preliminar de secuencias completas de la Región Control en 21 muestras humanas les había permitido mapear la distribución de los sitios polimórficos: en dos fragmentos de aproximadamente 400 pb se concentraban el 92% de las posiciones variables. Estos fragmentos fueron llamados Regiones Hipervariables I y II (RHV-I y RHV-II), y en virtud de su alta tasa mutacional relativa han sido intensamente utilizados en estudios evolutivos y forenses. Los límites para estas regiones no están establecidos rígidamente, por lo que las definiciones varían según los autores: usualmente, la RHV-I es informada entre las posiciones 16024 y ~16365 mientras que la RHV-II lo es entre ~73 y ~340. Las RHV-I y II están contenidas dentro de los Dominios 5' y 3' de la Región Control descritos antes en esta sección. Una tercera región hipervariable ha sido propuesta entre las posiciones 438 y 574 (Lutz y col. 1997).

2.6.3- Heredabilidad

La transmisión uniparental materna de los genomas citoplasmáticos ha sido universalmente observada en los animales y las plantas (Birky 1995). Ya en 1965, Szollosi observó que las mitocondrias del espermatozoide de la rata permanecían asociadas al flagelo y que no se distribuían equitativamente entre las blastómeras, desintegrándose en el estadio de 8 células. Basándose en sus experimentos, el autor concluyó que las mitocondrias maternas serían las únicas en persistir en la progenie.

Varios estudios realizados en la década de los 1970s, utilizando marcadores moleculares, documentaron que el ADNmt era efectivamente transmitido en forma uniparental en los animales superiores (Dawid y Blackler 1972, Hutchinson y col. 1974, Hayashi y col. 1978). Correspondió a Wallace y sus colaboradores (Giles y col. 1980, Case y Wallace 1981) demostrar la herencia estrictamente materna en humanos.

El dogma de una herencia exclusivamente materna del ADNmt se derrumbó con la publicación de ejemplos de transmisión biparental, como los de *Drosophila* (Kondo y col. 1992) y *Mytilus* (Hoeh y col. 1991). Por otra parte, el empleo de cruzamientos interespecíficos permitió demostrar la introgresión de ADNmt paterno en dípteros (Kondo y col. 1990) y roedores (Gyllensten y col. 1991).

Algunos autores han interpretado la herencia uniparental materna como consecuencia de la exclusión de la pieza media del espermatozoide, portadora de las mitocondrias, al momento de la fecundación. Sin embargo, está ampliamente demostrado que en la mayoría de los mamíferos el espermatozoide penetra completo en el citoplasma ovular, donde flagelo y pieza media son aún distinguibles tras varios ciclos de división celular (para una revisión ver Ankel-Simons y Cummins 1996). De hecho, la detección bajo microscopio del flagelo en el citoplasma ovular es utilizado empíricamente como evidencia de fertilización. Otros autores han postulado un “efecto dilución”, en el que las 50-75 mitocondrias del espermatozoide, portadoras de una sola molécula de ADN cada una (Hecht y col. 1984), representan un aporte muy modesto comparado con el del citoplasma ovular, en el que existirían, por citar algunos ejemplos, entre 138.000 (en humanos, Chen y col. 1995) y 260.000 (en bovinos, Michaels y col. 1982) mitocondrias y copias de ADNmt.

En 1995, Kaneda y col. describieron la rápida y selectiva eliminación del ADNmt paterno en cruzamientos intraespecíficos de *Mus musculus* portadores de diferentes linajes mitocondriales, en contraste con la persistencia del ADNmt paterno en tejidos de embriones y neonatos provenientes de cruzamientos interespecíficos *M. musculus* x *M. spretus*. Estos autores postularon que la transmisión materna del ADNmt se debe a la degradación activa

de las mitocondrias paternas mediante algún mecanismo residente en el citoplasma ovular, mecanismo que tendría una elevada especificidad de reconocimiento, ya que sólo se activaría ante la presencia de mitocondrias paternas conespecíficas. El mecanismo cuya existencia infirieron Kaneda y col. ha sido descrito (Sutovsky y col. 1999, Sutovsky y col. 2000) y consiste en la marcación de alguno de los componentes proteicos de las mitocondrias espermatozoicas con ubiquitina, y su posterior destrucción por la maquinaria proteosómica-lisosomal del ovocito. Las ubiquitinas son integrantes de la vía proteolítica citosólica, siendo responsables de unirse covalentemente a otras proteínas para señalar su destrucción (Alberts y col. 1994).

2.6.4- Número de mitocondrias y copias de ADNmt por célula

Los primeros estudios que intentaron cuantificar la cantidad de ADNmt presente en células indicaron la presencia del equivalente a 2-10 moléculas por mitocondria, dependiendo el tipo celular y la especie analizada (para dos revisiones tempranas ver Nass y col. 1965, Borst y Kroon 1969).

En un elegante trabajo, Robin y Wong (1988) analizaron el número de moléculas de ADNmt y de mitocondrias presentes en cinco líneas celulares de mamífero. Utilizando células de rata, ratón, conejo y seres humanos, concluyeron que el número de moléculas de ADNmt por mitocondria permanece constante, independientemente del tipo celular o la especie de origen. Describieron, además, la existencia de una ligera variación del 10% en el número de mitocondrias/célula dentro de cada línea celular, contrastante con la variabilidad observada entre los diferentes tipos celulares. Los autores hallaron entre 2.5 y 2.7 moléculas de ADNmt por mitocondria, y entre 88 ± 12 y 688 ± 75 mitocondrias por célula en las diferentes líneas celulares. La combinación de ambos valores para cada tipo celular permitió estimar la existencia de entre 220 ± 6 (en macrófagos peritoneales de conejo) a 1720 ± 162 moléculas de ADNmt por célula (en macrófagos pulmonares de conejo). Para la única línea celular humana estudiada (fibroblastos de pulmón) estimaron la existencia de ~ 800 moléculas de ADNmt por célula.

Satoh y Kuroiwa (1991) estudiaron el número y organización de las moléculas de ADNmt en una línea celular humana derivada de un carcinoma de ovario, hallando un promedio de 4.6 copias de ADNmt/mitocondria, con un rango de 1-15 y valores modales entre 2 y 6. Dado que las células poseían unas 107 mitocondrias en promedio, estimaron en 500 la cantidad total de copias/célula. Michaels y col. (1982) informaron la existencia de

aproximadamente 2600 moléculas de ADNmt/célula en cultivos primarios de células somáticas de bovinos, y de unos 260.000 genomas mitocondriales en ovocitos de la misma especie. La diferencia en la abundancia promedio de moléculas de ADNmt entre las células somáticas y los ovocitos sería consecuencia del proceso de amplificación del número de mitocondrias que ocurre durante la ovogénesis (Michaels y col. 1982). Por otra parte, en una muestra de nueve ovocitos provenientes de cinco mujeres, Chen y col. (1995) estimaron la presencia de entre 80.000 y 290.000 moléculas, con una media de 138.000 por célula.

Los citados previamente en esta sección son algunos de los muchos trabajos en los que se describe cierta constancia en el número de mitocondrias presentes en diferentes tipos celulares. Sin embargo, ya desde las primeras décadas de siglo XX se sabe que las mitocondrias se fisianan y fusionan repetidamente en el citoplasma. Esta y otras observaciones han llevado a algunos autores a sugerir que las mitocondrias carecerían de individualidad y que tendrían una existencia temporal, siendo parte de una red que se fragmenta y reensambla constantemente (Hayashi y col. 1994).

2.6.5- Evolución del ADN mitocondrial

La evolución molecular es el resultado de dos procesos básicos: la ocurrencia de mutaciones en el ADN, y la fijación de las mismas en una población de organismos (Wilson y col. 1977). La tasa de evolución E es el producto de la tasa de mutación por población M por la fracción de mutaciones fijadas F :

$$E = MF$$

Hasta 1979, la mayoría de los expertos en evolución molecular habían asumido que el ADNmt animal era uno de los componentes genómicos celulares de menor tasa mutacional. Estas expectativas se basaban en ciertas generalizaciones, ampliamente aceptadas, respecto de las tasas de evolución molecular, así como en consideraciones funcionales: cuanto más importante fuera la función de un gen o una proteína, tanto más limitada serían sus posibilidades de variar sin provocar efectos deletéreos (Brown y col. 1979). Las observaciones que indicaban una relativa uniformidad en el tamaño y contenido génico del ADNmt en diferentes taxa animales eran interpretadas como resultado de fuertes presiones evolutivas contra la variación. Estas inferencias, sumadas al conocimiento del

alto grado de empaquetamiento de las secuencias codificantes así como del papel central que juegan las mitocondrias en la fisiología celular, cuyo correcto funcionamiento es en parte dependiente de la información contenida en el ADNmt, hacían prever una baja tasa de evolución molecular para ésta molécula.

En un influyente trabajo, Brown y col. (1979) compararon las tasas de evolución molecular de los ADNs nucleares y mitocondriales en diferentes especies de primates utilizando dos estrategias. Por una parte mapearon la presencia de sitios de reconocimiento para once enzimas de restricción en los genomas mitocondriales de *Homo sapiens*, *Cercopithecus aethiops*, *Macaca mulatta* y *Papio papio*, y estimaron el grado de divergencia en las secuencias nucleotídicas a partir de la fracción de sitios compartidos por cada par de especies. De un modo experimentalmente independiente, evaluaron el grado de divergencia de las secuencias completas del ADNmt en el par *H. sapiens*-*C. aethiops* mediante el análisis de temperatura de fusión de heterodúplex. Las estimaciones obtenidas fueron similares para el único par de especies investigado utilizando ambas metodologías: *H. sapiens* y *C. aethiops* diferirían en ~ 22-23% de sus posiciones nucleotídicas. Por otra parte, y para todos los pares de especies, contrastaron las tasas de divergencia para el ADNmt obtenidas de sus experimentos con las estimadas para genes de copia única del ADN nuclear, concluyendo que aquél evoluciona 5 a 10 veces más rápido que éste.

La alta tasa de evolución observada en el ADNmt podría deberse a una alta tasa de mutación, a una alta tasa de fijación, o bien a una combinación de ambas. Se han postulado diversos mecanismos para dar cuenta de la tasa mutacional observada en el ADNmt animal, mecanismos que no necesariamente se excluyen entre sí:

a) la directa exposición del ADNmt a altas dosis de agentes mutagénicos como las especies reactivas de oxígeno generadas durante la fosforilación oxidativa, acoplada a la ausencia de histonas asociadas al ADN;

b) la ausencia o ineficacia de mecanismos de reparación del daño en el ADN (Bogenhagen 1999, Sawyer y Van Houten 1999);

c) la menor fidelidad de la maquinaria molecular involucrada en la replicación (Kunkel y Loeb 1981), y la mayor tasa relativa de replicación respecto del ADN nuclear.

Un rasgo peculiar del espectro mutacional mitocondrial es la incidencia relativamente alta de polimorfismos de longitud, así como la preeminencia de transiciones sobre transversiones (Aquadro y Greenberg 1983). Las transiciones son mutaciones en las que una base púrica o pirimídica es reemplazada por otra de su misma familia ($A \leftrightarrow G$, $C \leftrightarrow T$), mientras que una transversión ocurre cuando una base púrica es reemplazada por

otra pirimídica (A,G↔C,T), o viceversa. Tanto los cambios transicionales como las mutaciones de longitud son los errores más comunes durante la replicación del ADN (Topal y Fresco 1976), por lo que estas observaciones son consistentes con la hipótesis de que la alta tasa mutacional del ADNmt esté relacionada con la relativa ineficiencia de los mecanismos de reparación del mismo.

Brown y col. (1979) fueron los primeros en informar una estimación de la tasa de evolución del ADNmt. Contrastando la divergencia nucleotídica acumulada contra los tiempos de divergencia desde un ancestro común para veinte pares de especies de mamíferos, concluyeron que el ADNmt mamaliano evoluciona acumulando 0.01 sustituciones por par de bases por millón de años (Ma), o 1% por linaje por millón de años, o 2% de divergencia de secuencias entre pares de especies por millón de años.

En un estudio más reciente, Pesole y col. (1999) analizaron la heterogeneidad en las tasas de evolución de las diferentes regiones funcionales del ADNmt mamaliano, y además las compararon con las de sus contrapartes nucleares. Utilizando las secuencias mitocondriales completas de seis pares de especies cercanamente emparentadas, pertenecientes a cuatro órdenes, consideraron por separado los ARNr 12S, ARNr 16S y los sitios sinónimos y no sinónimos en los genes codificantes para proteínas, mientras que tomaron todos los ARNr como un supergen. La Región Control fue analizada como un todo y también dividida en tres segmentos estructurales-funcionales: los dominios Central, BSC (Bloque de Secuencias Conservadas) y SAT (Secuencias Asociadas a la Terminación). Como era de esperarse, encontraron una enorme variabilidad intragenómica en las tasas evolutivas, identificando regiones de baja y alta tasa. Los genes codificantes para diferentes especies de ARN, el dominio Central de la Región Control y los sitios no sinónimos presentaron tasas de evolución mucho menores que las encontradas en los sitios sinónimos y los dominios periféricos de la Región Control. Cuando compararon las tasas mitocondriales con las presentes en genes homólogos de localización nuclear, informaron que:

a) los sitios no sinónimos mitocondriales y nucleares evolucionan con una tasa similar;

b) los ARNr 16S mitocondriales evolucionan cuatro veces más rápidamente que sus contrapartes nucleares, mientras que la tasa de los ARNr pequeños y de los sitios sinónimos mitocondriales es aproximadamente veinte veces mayor;

c) los ARNr mitocondriales presentan una tasa de evolución dos órdenes de magnitud mayor que sus análogos nucleares.

Estimaciones de tasa de evolución para el ADNmt humano

Dos métodos distintos han sido empleados para estimar la tasa de evolución del ADNmt humano. El primero en ser desarrollado fue el llamado método filogenético, consistente en la utilización de las secuencias mitocondriales de un grupo de individuos para construir un árbol filogenético, a partir del cuál se estiman el número de mutaciones acumuladas. Una fuente independiente de información es utilizada luego para datar la edad del árbol o de alguna de las ramas (v.g. la separación de los clados *Homo* y *Pan*, o un cuello de botella poblacional, o el poblamiento inicial de un área previamente deshabitada), permitiendo derivar una tasa de divergencia (ver ejemplos adelante). El método genealógico, o del pedigrí, intensamente utilizado en el último lustro (Howell y col. 1996a, Soodyall y col. 1997, Parsons y col. 1997, Sigurgardottir y col. 2000) basa la estimación de la tasa mutacional en el simple conteo de las mutaciones observadas en pedigríes.

Mientras que el método filogenético ha sido aplicado tanto al análisis de los diferentes componentes del genoma mitocondrial como a la molécula completa, el método del pedigrí ha sido casi exclusivamente empleado para estudiar la Región Control, con la excepción del trabajo de Howell y col. (1996a), en el que también fueron analizadas regiones codificantes putativamente implicadas en una patología de etiología mitocondrial.

Estimaciones basadas en el método filogenético

Los primeros intentos de cuantificar las tasas relativas de evolución de los diferentes componentes del genoma mitocondrial humano fueron realizados por Cann y col. (1984). Utilizando doce enzimas de restricción, analizaron la distribución de PLFRs en el ADNmt de 112 muestras humanas de diversos orígenes geográficos. Los autores estimaron las tasas relativas de evolución para las diferentes regiones funcionales de la molécula de dos modos: por un lado calcularon la fracción de sitios variables respecto del total, mientras que por otra parte infirieron filogenéticamente el número de mutaciones por sitio. Sus resultados indicaron que la Región Control es entre 1.4 a 2.8 veces más variable que las regiones codificantes para proteínas, las que a su vez son, en promedio, ligeramente más variables que los ARNs. Estos resultados fueron confirmados y refinados por el mismo grupo de investigadores, aplicando idénticas técnicas a una muestra de mayor tamaño (ver Fig. 2 en Cann y col. 1987).

Stoneking y col. (1986) presentaron la primera calibración de la tasa de divergencia nucleotídica mitocondrial basada enteramente en la comparación entre diferentes

secuencias humanas. Aplicando técnicas experimentales y analíticas similares a las explicadas en el párrafo precedente a tres muestras poblacionales de Papúa-Nueva Guinea, Australia y América, estimaron el grado de divergencia promedio acumulado en cada población regional desde su fundación. Conociendo estos valores de divergencia y disponiendo de fechados e inferencias arqueológicas que permiten conocer la profundidad temporal mínima para la presencia humana en cada región, estimaron la tasa de divergencia. Los valores obtenidos, calculados teniendo en cuenta diferentes escenarios de poblamiento, oscilaron entre 1.8 y 9.3% de divergencia por millón de años, para el ADNmt completo, razonablemente de acuerdo con la tasa de 2-4%/Ma derivada de comparaciones entre diferentes especies de vertebrados. En 1992, Stoneking y col. repitieron esta calibración intraespecífica concentrándose en la evolución de la Región Control, utilizando esta vez secuencias completas para ambas RHV, y obteniendo una tasa promedio de 11.8 ± 3.1 %/Ma. Una tasa similar del 12 ± 5 %/Ma para la Región Control fue obtenida por Pesole y colaboradores (1992).

Torroni y col. (1994c) estimaron una tasa de sustitución nucleotídica de 2.2-2.9% por millón de años para todo el ADNmt humano utilizando una estrategia similar a la empleada por Stoneking y col. (1986): analizaron los linajes mitocondriales presentes en diferentes grupos étnicos centroamericanos estrechamente emparentados empleando PCR-RFLP de alta resolución. Tras calcular la divergencia acumulada desde un supuesto linaje ancestral común, y contando con una referencia temporal externa como la reconstrucción de la historia de estos pueblos basada en estudios lingüísticos, genéticos y arqueológicos, pudieron derivar la tasa evolutiva antes mencionada.

Basándose en el análisis de tres secuencias mitocondriales humanas completas, Horai y col. (1995) calcularon que la tasa promedio de sustitución nucleotídica en la Región Control es de 7% por millón de años, 1.8 veces mayor que la tasa de sustituciones sinónimas. Dado que la Región Control es muy heterogénea en su espectro mutacional (vide supra), los autores también calcularon las tasas para las RHV-I (378 pb, entre posiciones 16024 y 16401) y RHV-II (380 pb, entre 29 y 408), obteniendo valores de 10.3 y 7.39 % por millón de años, respectivamente.

Forster y col. (1996) analizaron la divergencia nucleotídica acumulada en la RHV-I de Esquimales y Na-dené, dos grupos étnicos que habitan regiones circumpolares americanas. Estimaron que para el fragmento comprendido entre las posiciones 16090 y 16365 la tasa de sustitución era de una transición cada 20180 ± 1000 años, equivalente a 18%/Ma.

Estimaciones basadas en el método genealógico

La primera aplicación del método genealógico al estudio de la tasa de evolución del ADNmt humano fue realizada por Howell y colaboradores (1996a), quienes informaron la aparición de dos mutaciones en la Región Control tras analizar un total de 81 eventos de transmisión materno-filial. En un estudio similar al anterior, que implicó la comparación de las RHV-I y II en 134 individuos que comprendían 327 eventos generacionales, Parsons y col. (1997) obtuvieron una tasa empírica de una sustitución cada 36 generaciones (para este cálculo no se tuvo en cuenta un evento de inserción en la posición hipervariable 309), notablemente similar a la derivada por Howell y col. (1996a).

Mumm y col. (1997) hallaron una mutación en 59 eventos de transmisión para la RHV-I, mientras que Sigurgardottir y col. (2000) obtuvieron las secuencias mitocondriales entre las posiciones 16012 y 394 para un total de 272 individuos relacionados a través de 705 eventos de transmisión, detectando 3 mutaciones, lo que les permitió derivar una tasa de 1 sustitución cada ~235 transmisiones para ambas RHV.

Los resultados detallados precedentemente son contrastantes con los presentados por Soodyall y col. (1997) para ambas RHV y Jazin y col. (1998) para la RHV-II, quienes no detectaron ninguna mutación de punto homoplásmica en el análisis de 108 y 228 eventos de transmisión, respectivamente. Queda claro, a partir de los resultados presentados antes, que existe una notable heterogeneidad en las estimaciones genealógicas de la tasa mutacional para la Región Control (o alguno de sus componentes). Ya que sería incorrecto elegir *a priori* cualquiera de ellas podemos hacer el ejercicio de combinar todos los estudios y derivar una tasa promedio. Aún cuando algunos trabajos sólo analizaron una de las regiones, la inclusión de todos nos permitirá calcular una tasa mínima, ya que se asume que ninguna otra mutación apareció en las regiones no analizadas. Así, un total de 18 mutaciones de punto fueron detectadas para 1738 eventos de transmisión, resultando en una tasa promedio mínima de aparición de 1 mutación cada ~ 97 transmisiones, equivalente a 67-86 %/Ma (con tiempos generacionales de 20 y 26 años, respectivamente).

Contraste entre las tasas filogenética y genealógica para la Región Control

Todas las tasas de sustitución determinadas genealógicamente han resultado mucho mayores que las inferidas a partir de estudios filogenéticos (para una opinión distinta ver Jazin y col. 1998), y a esta discrepancia se le han dado diferentes explicaciones. Es importante tener en cuenta que el método de pedigrí mide la tasa instantánea de aparición

de mutaciones, muchas de las cuales nunca alcanzan siquiera valores polimórficos para perderse por deriva, mientras que el método filogenético estaría midiendo, en la mayoría de los casos, las tendencias evolutivas a largo plazo. Si recordamos que la evolución nucleotídica tiene un componente mutacional y otro de fijación (ver apartado 2.6.5), entenderemos que el método del pedigrí sólo mide el componente mutacional mientras que el método filogenético, por el contrario, tiene en cuenta a ambos. Para una discusión sobre el origen y significado de estas diferencias, ver Pääbo (1996) y Macaulay y col. (1997), así como los trabajos originales donde se describen las tasas genealógicas, especialmente Sigurgardottir y col. (2000).

2.6.6- Naturaleza de la variación en la Región Control

Como ya ha sido señalado anteriormente, la Región Control es no-codificante y posee la mayor tasa relativa de sustitución dentro del ADNmt. Como también ha sido dicho, la variación en la Región Control no está distribuida homogéneamente, ya que un dominio central que presenta escasa variación se halla flanqueado por dos regiones que concentran la mayoría de las posiciones variables. Además, el patrón con que ocurren las sustituciones nucleotídicas es notablemente complejo (ver adelante).

Regiones Hipervariables y Regiones Conservadas

Aunque clásicamente se han reconocido dos regiones hipervariables, Lutz y col. (1997) han propuesto la existencia de una tercera, ubicada en el extremo 3' de la Región Control, tras analizar la distribución de sitios polimórficos en las secuencias completas de la RC de 200 individuos de origen alemán. La RHV-I (definida entre las posiciones 16024-16365) presentó 88 sitios variables sobre un total de 342 (26%), mientras que en la RHV-II el 24% de los sitios fueron polimórficos (65 sobre 168, posiciones 73 a 340). El dominio central de 276 pb entre las posiciones 16366-16569 y 1-72 sólo tuvo un 7% de posiciones mutables, mientras que el 18% de los sitios fue variante en la nueva región hipervariable propuesta por estos autores, que ocupa 137 pb entre las posiciones 438 y 574. El fragmento de 97 pb intercalado entre las RHV-II y RHV-III (posiciones 341 a 437) mostró solamente tres posiciones variables.

Heterogeneidad en la tasa sustitucional entre sitios

Además de la heterogeneidad debida a la existencia de regiones con alta o baja densidad de posiciones polimórficas, existe una segunda fuente de variación consistente en la existencia de tasas de sustitución muy variables para los diferentes sitios. Así, unos pocos “puntos calientes” presentan velocidades de cambio elevadas mientras que otras posiciones evolucionan lentamente o incluso permanecen inalteradas (Wakeley 1993, Hasegawa y col. 1993). Meyer y col. (1999) analizaron la variabilidad en las tasas de sustitución para ambas RHV utilizando una muestra de gran tamaño y étnicamente heterogénea. Para la RHV-I infirieron que aproximadamente una de cada cuatro posiciones no sufre mutaciones, que dos tercios de las posiciones mutan con una tasa cercana a la tasa promedio para esa región, y que una de cada doce es hipervariable, presentando una tasa \geq al doble de la tasa promedio. La RHV-II mostró mayor heterogeneidad en las tasas ya que más de la mitad de los sitios fueron invariables (54%) y aproximadamente el 10% tuvo una tasa \geq al doble de la tasa promedio. Finalmente, observaron que la tasa promedio de sustitución de la RHV-I duplica la de la RHV-II.

Patrón de sustituciones

Al comparar la frecuencia con que ocurren las diferentes sustituciones se pone en evidencia que las transiciones son aproximadamente 15 veces más frecuentes que las transversiones (Vigilant y col. 1991, Tamura y Nei 1993), y que la contribución de cada familia nucleotídica no es equivalente: dos tercios de las transiciones ocurren entre pirimidinas (Tamura y Nei 1993).

2.6.7- Heteroplasmia

“...when asking the question, ‘*Is this individual heteroplasmic?*’ one also has to ask, ‘*At what level of sensitivity?*’

Holland y Parsons (1999)

“Heteroplasmy is the inevitable transition state between the time a new allele arises, presumably by mutation of a single DNA molecule, and when it becomes fixed in the maternal line.”

Sykes (1999)

La presencia de un gran número de moléculas de ADNmt que se replican independientemente unas de otras con alta tasa de error explica la mayoría de los casos de

coexistencia de dos o más genotipos en una misma célula, tejido o individuo, condición denominada heteroplasma. Esta condición puede ya haber estado presente en las células germinales femeninas y ser por lo tanto hereditaria, o bien haberse establecido durante la ontogenia y ser entonces somática. Sólo excepcionalmente esta condición es constitutiva, apareciendo como consecuencia de la persistencia de los linajes mitocondriales materno y paterno en un mismo individuo, como en algunos bivalvos (Hoeh y col. 1991).

El primer intento de búsqueda de diferencias de secuencia entre tejidos de un mismo individuo en humanos fue realizado por Monnat y Reay en 1986. Los autores aislaron y secuenciaron un total de 121 clones conteniendo fracciones codificante y no codificante de ADNmt extraído de cerebro, corazón, hígado, riñón y músculo esquelético de dos personas. Tras analizar un total de 17.600 pb, sólo una diferencia intraindividual fue encontrada al comparar secuencias de diferentes tejidos: uno de diez clones obtenidos a partir de tejido hepático en uno de los individuos fue portador de la mutación G→A en la posición 94. Estos resultados y otros similares (Monnat y Loeb 1985, Bodenteich y col. 1991) establecieron la expectativa de que la mayoría de los individuos serían homoplásmicos. Como bien dicen Holland y Parsons (1999), la enorme cantidad de información nucleotídica generada para estudios genético-poblacionales y evolutivos fueron sistemáticamente interpretados asumiendo homoplasma, y las posiciones de composición dudosa fueron informadas como ambigüedades de origen desconocido. La aparición de nuevas tecnologías de secuenciación resolvió parcialmente esta situación al permitir una mejor distinción entre artefactos metodológicos y heteroplasma.

Unos de los primeros ejemplos de esta segunda etapa involucró un caso forense de gran repercusión: la identificación de los restos de la familia real rusa y sus acompañantes (Gill y col. 1994). Tras obtener evidencia de heteroplasma para la posición 16169 mediante secuenciación automática de un conjunto de moléculas mitocondriales obtenidas mediante RCP a partir de los presuntos restos del zar Nicolás II, la secuenciación individual de múltiples clones de la RHV-I permitió demostrar que las bases C y T estaban presentes en una proporción 4:1 en dicha posición. Aunque las secuencias control obtenidas a partir de muestras de dos parientes vivos por vía materna del Zar sólo mostraron T en el trabajo original (Gill y col. 1994), en otro posterior se informó la presencia de la misma heteroplasma C:T para esa posición en el Gran Duque de Rusia Georgij Romanov, hermano del Zar (Ivanov y col. 1996). En los últimos años varios ejemplos de heteroplasma para mutaciones de punto han sido informados (Comas y col. 1995, Bendall y col. 1996, Howell y col. 1996a, Jazin y col. 1996, Mumm y col. 1997, Bendall y col.

1997, Wilson y col. 1997, Parsons y col. 1997, Hühne y col. 1999, Grzybowski 2000, Calloway y col. 2000, Tully y col. 2000, Sigurgardottir y col. 2000).

La aplicación de técnicas experimentales muy sensibles ha permitido detectar niveles de heteroplasma de punto de hasta el 1% en la Región Control, y demostrar que entre el 11 y el 14 % de las muestras ensayadas eran portadoras de al menos dos variantes para alguna posición (Calloway y col. 2000, Tully y col. 2000).

ADN mitocondrial y evolución humana

3.1- Los primeros estudios: análisis de baja resolución mediante PLFR y electroforesis.

Los primeros estudios de la variabilidad nucleotídica del ADNmt en seres humanos se realizaron en 1980, utilizando Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (PLFR). El ADN total o la fracción mitocondrial era obtenido a partir de sangre, plaquetas o placentas, digerido con una o varias enzimas de restricción y luego analizado mediante electroforesis. Las variaciones en los tamaños de los fragmentos resultantes de la digestión eran interpretados como resultantes de la presencia o ausencia variable de sitios de reconocimiento para las enzimas, a su vez consecuencia de mutaciones de punto que podían crearlos o destruirlos. Dado que la posición de los sitios polimórficos no podía ser mapeada con precisión, y que el tamaño de los fragmentos era estimado aproximadamente, estos estudios son considerados de baja resolución.

Brown (1980) analizó 21 individuos de diversos orígenes geográficos y “raciales” (sic) mediante la técnica PLFR con 18 enzimas de restricción. Siete de estas dieron patrones de corte idénticos en todas las muestras, pero la combinación de los patrones para las restantes 11 permitió diferenciar cada uno de los individuos. Todos los patrones de digestión fueron compatibles con la pérdida o ganancia de un sitio de reconocimiento para las enzimas, y por ende las diferencias observadas pudieron interpretarse como mutaciones de punto que afectaron tales sitios.

Denaro y col. (1981) aplicaron PLFR utilizando sólo la enzima *HpaI* en una muestra de 235 individuos pertenecientes a 5 grupos étnicos, hallando un total de 6 patrones de restricción, llamados morfos. La observación más interesante provino del hallazgo de que uno de los patrones, el morfo I-3, estuvo presente con una frecuencia de 85.7 % entre los 133 africanos (Pigmeos, Bantu, y San) pero ausente en 48 Orientales y 54 Caucasoides de orígenes múltiples. El morfo I-3 había sido descrito por Brown (1980) en 2 de 4 afro-americanos de su muestra de 21 individuos, y hoy sabemos que se caracteriza por la ganancia de un sitio *HpaI* en posición 3592 de la Secuencia de Referencia de Cambridge (SRC).

Un protocolo normalizado utilizando **PLFR** con 5 o 6 enzimas fue utilizado en varios laboratorios a lo largo de los 1980s (v.g. Johnson y col. 1983, Scozzari y col. 1988, Santachiara-Benerecetti y col. 1988), resultando en la acumulación de un corpus de >3.000 individuos analizados, provenientes de 62 poblaciones.

Un enfoque más informativo fue empleado por Cann y col. (1987), quienes utilizaron una batería de 12 enzimas de restricción para analizar 147 muestras de ADNmt de múltiples orígenes étnico-geográficos. Sobre un total de 467 sitios de reconocimiento independientes, encontraron 195 polimórficos, que permitieron diferenciar 133 haplotipos. El análisis filogenético de estos haplotipos llevó a los autores a proponer un origen africano y reciente para el hombre moderno.

3.2- Amplificación enzimática: RCP-PLFR de alta resolución y secuenciación de regiones hipervariables.

El desarrollo de la **Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP)** contribuyó a los estudios de **PLFR** al permitir la amplificación de fragmentos de tamaño y ubicación conocidos. El empleo de fragmentos relativamente pequeños y de geles para electroforesis de muy buena resolución facilitó el mapeo de sitios polimórficos, de allí que estas técnicas suelen denominarse **PLFR** de alta resolución. La **RCP** también permitió el desarrollo de los marcadores mitocondriales más utilizados hasta la actualidad en estudios evolutivos y forenses: la secuencia de una o ambas Regiones Hipervariables (RHV). Al momento se han publicado y/o depositado en bancos de datos más de 25.000 secuencias de la RHV-I.

La descripción y primera aplicación de las RHV-I y RHV-II en estudios de poblaciones humanas involucró su secuenciación en 82 individuos de distinta procedencia, 61 de los cuales eran africanos (Vigilant y col. 1989). En un segundo trabajo, el mismo grupo de investigadores secuenció y analizó filogenéticamente ambas regiones en 189 individuos de todo el mundo (Vigilant y col. 1991), reeditando así el enfoque -y las conclusiones- de Cann y col. (1987) con una nueva estrategia experimental.

Douglas Wallace y su grupo utilizaron ampliamente la técnica de **RCP-PLFR** de alta resolución, combinándola en ocasiones con la secuenciación de la RHV-I en linajes seleccionados. Desarrollaron un protocolo que involucraba la amplificación del total del ADNmt en 9 fragmentos parcialmente superpuestos y su digestión con 14 enzimas, y lo aplicaron al estudio de individuos provenientes de poblaciones de todos los continentes: Asia (Ballinger y col. 1992, Torroni y col. 1993a, Torroni y col. 1994a, Schurr y col. 1999),

América (Torrioni y col. 1993b, Torrioni y col. 1994b, Torrioni y col. 1994c, Huoponen y col. 1997), Europa (Torrioni y col. 1994d, Torrioni y col. 1996), África (Chen y col. 1995, Chen y col. 2000) y Oceanía (Huoponen y col. 2001). La aplicación uniforme de un enfoque experimental a una gran cantidad de muestras de orígenes tan diversos permitió cuantificar la diversidad mitocondrial relativa existente en los diferentes continentes, revelar la existencia de una jerarquía de clados región- o población-específicos, definir haplogrupos (grupos de descendencia común), y apoyar la hipótesis de un origen africano del hombre moderno (Wallace y col. 1999).

3.3- Refinando la filogenia del ADNmt: de la secuenciación de algunas regiones codificantes a la secuenciación de genomas completos.

El protocolo de **RCP-PLFR** empleado por el grupo de Wallace en poblaciones de todos los continentes puso en evidencia la existencia de diferentes jerarquías de grupos monofiléticos de linajes mitocondriales. Los grupos de mayor jerarquía fueron denominados haplogrupos, y demostraron tener una distribución étnico-geográfica específica. Este método, aunque muy informativo, sólo analiza alrededor del 20% del genoma, por lo que no siempre se pudieron asignar todos los linajes de una población a algún haplogrupo definible en base a una combinación de sitios de restricción polimórficos. En los estudios iniciales de nativos americanos, por ejemplo, el 95 % de los linajes resultó asignable a uno de cuatro haplogrupos, designados A, B, C, y D (Torrioni y col. 1993b, 1994b, 1994c). Pero la aplicación de este enfoque a Europa permitió discriminar sólo dos tercios de los linajes mitocondriales en los cuatro haplogrupos H, I, J y K (Torrioni y col. 1994d). El estudio de una segunda muestra europea con el agregado de tan sólo cuatro **PLFRs** permitió a Torrioni y col. (1996) reconocer otros 5 haplogrupos (T, U, V, W y X) y asignar el 99% de los linajes a grupos monofiléticos.

Ha sido ampliamente demostrado que ciertas mutaciones del ADNmt son patogénicas (Wallace 1994), y se ha sospechado una etiología mitocondrial para numerosas enfermedades, lo que ha llevado a varios autores a secuenciar total o parcialmente el ADN mitocondrial en busca de variantes putativamente responsables de las patologías (por ejemplo Chagnon y col. 1999). Las secuencias así generadas han resultado ser una valiosa fuente de información para los investigadores interesados en la evolución del ADNmt humano. Una de las primeras aplicaciones de esta información fue en el refinamiento del árbol evolutivo de los linajes mitocondriales de Europa y Medio Oriente (Macaulay y col.

Figura 2. Reproducción de la figura 4 en Macaulay y col. (1999). Árbol coalescente esquemático del ADNmt enraizado con la secuencia neandertal de Krings y col. 1997. Las mutaciones se indican por la posición del nucleótido involucrado seguido de la base derivada (en caso de transiciones) o de la base ancestral y la derivada (en caso de transversiones). Las mutaciones que generan ganancias o pérdidas de sitios de restricción en el sistema de 14 enzimas “extendido” se indican entre paréntesis; si la mutación responsable es desconocida sólo se indica el **PLFR**. Las mutaciones recurrentes están subrayadas. Los nombres de los grupos naturales reconocidos (sub-haplogrupos, haplogrupos y súper-haplogrupos) se indican en la base de la figura.

1999). Correlacionando los polimorfismos de la Región Control y de las regiones codificantes secuenciados en una muestra de alemanes (Hofmann y col. 1997) con otras secuencias de la RHV-I (Richards y col. 1996), los análisis de PLFR de alta resolución (Torrioni y col. 1996) e información molecular generada durante ese trabajo, los autores pudieron resolver las relaciones filogenéticas entre los diferentes componentes de la diversidad mitocondrial de Eurasia occidental. Definieron haplogrupos y sub-haplogrupos en base a combinación de **PLFR** y mutaciones de punto de las RHV y de las regiones codificantes, y propusieron la primer filogenia del ADNmt humano basada simultáneamente en polimorfismos de las RHV y regiones codificantes, reproducida aquí en la Figura 2.

Entre 1988 y 1999 se publicaron 93 secuencias mitocondriales completas o casi completas en 29 trabajos (Tabla A1 en Anexo). Dos secuencias fueron obtenidas para estudios evolutivos (Horai y col. 1995, Arnason y col. 1996), y las demás correspondieron a pacientes o controles en estudios de patologías de presunta etiología mitocondrial. La obtención de secuencias completas para estudios en el campo de la Genética Médica ha continuado desde entonces, pero a partir del año 2000 comenzaron a publicarse trabajos en los que se analizaban gran cantidad de secuencias completas o casi completas obtenidas exclusivamente para estudios evolutivos y forenses, como las de los haplogrupo U-K (Finnilä y col. 2000) y T-J en fineses (Finnilä y Majamaa 2000), o las de múltiples orígenes como en Ingman y col. (2000), Maca-Meyer y col. (2001) y Herrnstadt y col. (2002), entre otros (Tabla 1).

La disponibilidad de gran cantidad de linajes mitocondriales completos permitió tanto reconstruir con precisión la genealogía de determinados sub-haplogrupos (por ejemplo Maca-Meyer y col. 2003), como definir la existencia de nuevos haplogrupos, sub-haplogrupos y súper-haplogrupos (por ejemplo Kivisild y col. 2002, Kong y col. 2003a). En poco más de 20 años hemos pasado de inferir la existencia de linajes mitocondriales específicos de una región geográfica o grupo étnico determinado mediante análisis de baja resolución (Denaro y col. 1981) a contar con una filogenia absoluta del ADNmt humano basada en más de 1000 secuencias completas (Ruiz-Pesini y col. 2004).

Tabla 1. Secuencias mitocondriales completas publicadas desde 2000 en estudios evolutivos, forenses y otros.

Haplogrupos	N	Origen	Cobertura	Referencia
varios	192	Finlandia	completa	Finnilä y col. 2000, 2001a-b, Finnilä y Majamaa 2001
varios	53	múltiple	completa	Ingman y col. 2000
L2	4	África	completa	Torrioni y col. 2001
varios	42	múltiple	completa	Maca-Meyer y col. 2001
varios	560	múltiple	sólo región codificante	Herrnstadt y col. 2002
D	37	Esquimales y Aleutianos	completa	Derbeneva y col. 2002
U6	11	África del Norte	completa	Maca-Meyer y col. 2003
varios	48	múltiple	completa	Mishmar y col. 2003
varios	48	Asia Oriental	completa	Kong y col. 2003a
varios	52	múltiple	completa	Ingman y col. 2003
X	5	múltiple	completa	Reidla y col. 2003
varios	241	múltiple	completa	Coble y col. 2004
Total	1293			

ADN mitocondrial y el Poblamiento Humano de América

Los estudios de ADNmt en nativos americanos han sido realizados con una gran variedad de enfoques y objetivos, y la literatura acumulada sobre el tema es extensa. En lo que sigue se revisan y discuten trabajos que han contribuido al conocimiento de la diversidad de haplogrupos mitocondriales presentes en el continente antes de las profundas transformaciones iniciadas en 1492.

4.1- De los estudios iniciales al primer consenso

El primer estudio poblacional de polimorfismos mitocondriales que incluyó una muestra de aborígenes americanos fue el de Johnson y col. (1983), quienes analizaron 30 Warao de Venezuela y otros 170 individuos de origen europeo, asiático y africano. Utilizando un protocolo de **PLFR** con las enzimas *HpaI*, *BamHI*, *HaeII*, *MspI* y *AvaII*, diferenciaron 35 haplotipos en los 200 individuos. Aunque los Warao no pudieron ser analizados para *HaeII* por razones metodológicas, el empleo de las otras 4 enzimas resultó en el hallazgo de un único haplotipo, que además fue el más común entre los europeos y asiáticos, reuniendo el 50% de la muestra. Con este temprano enfoque experimental, el ADNmt de los indígenas americanos resultó monomórfico e indistinguible del de la mayoría de los europeos y asiáticos.

Las afinidades asiáticas del ADNmt americano fueron expuestas por Wallace y col. (1985) al analizar una muestra de 74 individuos de la comunidad indígena de Río Gila (Arizona, E.U.A.). Empleando el mismo protocolo de **PLFR** que Johnson y col. (1983) con el agregado de *HincII*, informaron la presencia de un polimorfismo para esta enzima, llamado morfo 6, en el 43% de la muestra. Consistente en la pérdida de un sitio de reconocimiento para *HincII*, esta variante era desconocida en poblaciones europeas y africanas, y había sido previamente informada para sólo 1 de 55 asiáticos orientales por Blanc y col. (1983). Tan radical diferencia en las frecuencias para este marcador entre asiáticos y americanos llevó a los autores a proponer la existencia de un efecto fundador en

las poblaciones amerindias. Hoy sabemos que este marcador asiático-americano es **-13259o**², que define el haplogrupo C (Torrioni y col. 1992).

Schurr y col. (1990) confirmaron la presencia del haplogrupo C y describieron la existencia de otros marcadores asiáticos entre los Pima, Maya y Ticuna. Maya y Ticuna fueron analizados como en Wallace y col. (1985), y además las tres poblaciones fueron estudiadas mediante **RCP-PLFR**: se amplificaron 12 fragmentos del ADNmt, y se analizaron unos 60 sitios polimórficos para 11 enzimas, muchos de los cuales habían demostrado ser específicos de poblaciones asiáticas en estudios previos. La combinación de la delección de 9 pares de bases de la Región V con 11 sitios de restricción polimórficos permitió distinguir 14 haplotipos³ en los 99 individuos. Es este trabajo donde se informa por primera vez la existencia, en nativos americanos, de los marcadores asiáticos **+663e**² y **Del 9pb**², que definen lo que hoy conocemos como haplogrupos A y B, respectivamente.

En 1992, Douglas Wallace y su grupo aplicaron por primera vez el protocolo de **RCP-PLFR** de alta resolución en poblaciones asiáticas (con 18 enzimas, Ballinger y col. 1992) y americanas (con 14 enzimas, Torrioni y col. 1992). El análisis de 167 nativos americanos resultó en la descripción de 50 haplotipos, 48 de los cuales reunieron al 98% de los individuos y segregaron en cuatro grupos monofiléticos de linajes denominados haplogrupos A, B, C y D. Los otros dos haplotipos, presentes en tres individuos, fueron interpretados como introgresiones de probable origen europeo. Las mutaciones involucradas en los polimorfismos, y la combinación de estos que definen a los haplogrupos A-D se muestran en la Tabla 2. El haplogrupo A posee **+663e**, el haplogrupo B se caracteriza por la presencia de **Del 9pb**, el haplogrupo C es definido por la co-ocurrencia de **-13259o** y **+13262a** mientras que el haplogrupo D tiene **-5176a**. Los haplogrupos C y D se diferencian de A, B y la Secuencia de Referencia por la posesión de **+10394c** y **+10397a**.

Estos resultados fueron confirmados en un estudio más amplio del mismo grupo (Torrioni y col. 1993b), donde se analizaron 216 individuos mediante **RCP-PLFR** con 14 enzimas, y se secuenciaron las RHV-I de 38 aborígenes americanos y 11 asiáticos

² Los sitios polimórficos se señalan en negrita, con la abreviatura normalizada utilizada en la literatura (Cann y col. 1987). La delección de 9 pares de bases en la Región V es indicada como **Del 9pb**. Para los sitios de restricción un número indica la posición de la base 5' del sitio de reconocimiento para la enzima, el prefijo +/- indica la ganancia o pérdida del sitio respecto de la SRC, y la letra del sufijo refiere a la enzima de restricción involucrada. a=*AluI*; b=*AvaII*; c=*DdeI*; e=*HaeIII*; f=*HhaI*; g=*HinfI*; h=*HpaI*; i=*HpaII*; j=*MboI*; k=*RsaI*; l=*TaqI*; m=*BamHI*; n=*HaeII*; o=*HincII*; p=*PstI*; q=*PvuII*; r=*XbaI*; s=*XhoI*

³ El término **haplotipo** fue acuñado a partir del inglés *haploid genotype* por Ceppellini y col. (1967), y se aplica a toda combinación de posiciones polimórficas ligadas. En el caso del ADNmt puede designar tanto una secuencia de la RHV como a un conjunto de PLFR.

Tabla 2. Combinación de polimorfismos que definen los haplogrupos A-D, y mutaciones que los originan.

PLFR / Indel ¹	Mutación ²	Haplogrupos ³			
		A	B	C	D
663e	663*G	+	-	-	-
Del 9pb	delección 9 pb en Región V	-	+	-	-
13259o/13262a	13263*G	+	+	-	+
5176a	5178*A	+	+	+	-
10394c	10398*G	-	-	+	+
10397a	10400*T	-	-	+	+

(1) **PLFR** o **indel** involucrado en la definición de haplogrupos; (2) mutación que define los polimorfismos, se indican los alelos derivados respecto de SRC; (3) Presencia o ausencia de determinado polimorfismo se indican con + o -, respectivamente. Se resaltan los cambios respecto de la SRC.

orientales representativos de los haplogrupos A-D. La disponibilidad simultánea de haplotipos de **PLFR/indel** y secuencias de RHV-I permitió testear la utilidad de ambas fuentes de información para diferenciar haplogrupos, y puso en evidencia la correlación entre ambas. Tanto los haplotipos basados en sitios de restricción como las secuencias segregaron mayoritariamente en los cuatro haplogrupos A-D, con la excepción de las secuencias D, que no formaron un grupo definido (Fig. 4 en Torroni y col. 1993b). Tres haplotipos presentes en seis individuos no fueron atribuibles a alguno de los haplogrupos A-D en base a **PLFR**, y por ser similares a los descriptos previamente en Torroni y col. (1992) fueron considerados de probable origen europeo.

Una ratificación independiente de la existencia de cuatro haplogrupos que reúnen a la mayoría de los linajes maternos presentes en América provino de los estudios de Horai y col. (1993) y Ginther y col. (1993), quienes secuenciaron diferentes fragmentos de la Región Control y analizaron la **Del 9pb**. En el primero de los estudios se obtuvieron secuencias de la porción 5' de la Región Control mientras que en el otro se secuenciaron ambas RHVs. El análisis filogenético de las secuencias obtenidas para 72 individuos por Horai y su grupo permitió asignar 70 de ellos a uno de cuatro grupos distintos. Los dos individuos restantes fueron portadores de secuencias alóctonas, de afinidades europeas en un chileno, y africanas en un brasileño. Por otra parte, las secuencias de los 60 Mapuches estudiados por Ginther y col. también segregaron en cuatro grupos. En ambos trabajos, y

para los fragmentos comparables, los grupos de secuencias estuvieron definidos por las mismas posiciones polimórficas detectadas en los haplogrupos A-D de los nativos americanos por Torroni y col. (1993b).

Un primer consenso pareció emerger de los estudios de tres grupos de investigación independientes en varias poblaciones Na-dené y Amerindias: más del 98% de los individuos analizados eran asignables a uno de cuatro grupos monofiléticos de linajes mitocondriales con claras afinidades asiáticas, y el restante 2% podía ser interpretado como introgresión post-colombina de origen europeo o africano.

4.2- Un quinto haplogrupo mitocondrial en América

Los trabajos de secuenciación y análisis filogenético de la RHV-I realizados por el grupo de Ryk Ward con muestras de tres poblaciones norteamericanas también resultaron en la distinción de cuatro grupos de secuencias (Ward y col. 1991, 1993), más su definición molecular corresponde sólo parcialmente con la de los grupos detectados por Torroni y col. (1993b), Horai y col. (1993) y Ginther y col. (1993). Tres de los agrupamientos de secuencias son homólogos a los haplogrupos A, B y C; un cuarto grupo está formado por secuencias exclusivas de los estudios de Ward y su grupo (tabla 3). Al igual que en caso de Torroni y col. (1993b), el análisis filogenético empleado por Ward y col. impidió reconocer como un grupo válido a las numerosas secuencias del haplogrupo D presentes en las poblaciones estudiadas.

Bailliet y col. (1994) analizaron las cuatro mutaciones que definen los haplogrupos A-D en una muestra de 109 amerindios, hallando que 103 eran asignables a alguno de los haplogrupos A-D, y propusieron que algunos de los linajes no asignables a A-D en América podían ser de origen asiático, en oposición a las interpretaciones de Torroni y col. (1993). Además, en su reanálisis de la literatura notaron las analogías y discrepancias en la definición molecular de los haplogrupos en base a posiciones de la RHV-I (Tabla 3), y concluyeron que en América era posible detectar 5 haplogrupos mitocondriales en base a polimorfismos de la RHV-I. Esta temprana y acertada interpretación de la diversidad de haplogrupos presentes en América fue reconocida y validada en una crítica de la aplicación de métodos filogenéticos tradicionales al análisis de variabilidad mitocondrial intraespecífica por Bandelt y col. (1995).

Tabla 3. Haplotipos de la RHV-I y correlación entre las nomenclaturas para los haplogrupos mitocondriales en Amerindios.

	Torrioni	Horai	Ward	Ginther	RHV-I¹
haplogrupos	A	III	II	4	223 290 319 362
	B	I	IV	1	189 217
	C	IV	III	2	223 298 325 327
	D	II	no detectado ²	3	223 325 362
	Ausente ³	Ausente ³	I	Ausente ³	223 278

Referencias originales en el texto. (1) Posiciones variables en el fragmento 16129-16362 de la SRC. Todos los cambios son transiciones, las posiciones en SRC se indican restando "16.000"; (2) Secuencias presentes en el estudio pero no detectadas como un grupo en el análisis filogenético; (3) Secuencias del haplogrupo I *sensu* Ward no fueron halladas en los demás estudios.

El quinto haplogrupo reconocido por Bailliet y col. (1994) entre las secuencias obtenidas por Ward y sus colegas fue denominado X por Forster y col. (1996) y Torrioni y col. (1996), quienes además informaron que podía ser definido por la presencia del marcador **-1715c** en un contexto **-10394c /-10397a**. Esta definición de X permitió reinterpretar como autóctonos a la mayoría de los haplotipos non-A-D publicados en Torrioni y col. (1992, 1993b).

4.2.1- Distribución étnico-geográfica del haplogrupo X

Antes de su reconocimiento formal como un haplogrupo mediante **PLFR** y haplotipo de la RHV-I por Forster y col. (1996), el haplogrupo X había sido descrito en Navajos y dos poblaciones amerindias (Tabla 4). Su presencia en Europa había sido informada tempranamente (Torrioni y col. 1994d), aunque no fue reconocido como un grupo monofilético en esas poblaciones hasta el análisis de **PLFR** y secuencias de la RHV-I de Torrioni y col. (1996). Desde entonces ha sido informado en numerosas poblaciones americanas (Tabla A2 en Anexo), e incluso su presencia ha sido confirmada mediante estudios de ADN antiguo en amerindios de E.U.A (Stone y Stoneking 1998, Malhi y Smith 2002, Malhi y col. 2004). Hasta el momento, el haplogrupo X parece estar confinado a

Tabla 4. Distribución de haplotipos atribuibles al haplogrupo X en poblaciones americanas antes de 1996.

Población	N¹	X²	Nomenclatura³	Referencia
Nuu-Chah-Nulth	63	7	HVR # 1-4	Ward y col. 1991
Navajo	48	2	AM29	Torrioni y col. 1992
Ojibwa	28	7	AM29, AM74-AM76	Torrioni y col. 1993b
Yakima	42	2	HVR # 1	Shields y col. 1993

(1) Tamaño de la población analizada; (2) Cantidad de individuos asignables a X; (3) Designación del haplotipo en la referencia.

poblaciones norteamericanas.

Una distribución geográfica disyunta en Eurasia Occidental (Europa y Medio Oriente) y América, sumada a su aparente ausencia en poblaciones del este asiático y Siberia llevó a Brown y col. (1998) a proponer un probable origen euro-asiático, pero no-mongoloide, para el haplogrupo X en nativos americanos.

Mientras que Derenko y col. (2001) proveyeron la primera evidencia de X en poblaciones mongoloides al informar su presencia en 7 de 202 Altai de Siberia, Reidla y col. (2003) confirmaron la restringida presencia de X en poblaciones centro-asiáticas y siberianas, y expandieron el rango geográfico de X al demostrar que también se halla en poblaciones del norte y este africano.

Reidla y col. (2003) también suministraron una definición molecular de alta resolución al describir la coexistencia de cuatro mutaciones en la región codificante de 21 secuencias completas del haplogrupo X, y luego identificaron estas cuatro variantes en 175 individuos, sobre un total de >13.000 analizados para 66 poblaciones de Europa, Asia y África. Un análisis de alta resolución de estos linajes X, junto a los ya descritos en la literatura, permitió a los autores sugerir que las secuencias X presentes en poblaciones mongoloides del Viejo Mundo derivarían de introgresión reciente de origen euroasiático occidental. Contra lo esperado, las secuencias del haplogrupo X presentes en Siberia no estarían cercanamente emparentadas con las halladas en poblaciones americanas.

4.3- ¿Hay evidencia de más de 5 haplogrupos mitocondriales en América?

4.3.1- Linajes X6 y X7: un enfoque afilogenético y varios problemas metodológicos.

Tras analizar una población yanomama mediante **PLFR/indel** (N=83) y secuenciación de ambas RHV (N=50), D. Andrew Merriwether y sus colaboradores propusieron la existencia de dos nuevos haplogrupos denominados X6 y X7, tanto en América (Easton y col. 1996) como en Asia (Merriwether y col. 1996). Definieron X6 y X7 como aquellos linajes que presentan la combinación **+10394c/+10397a** en ausencia de los cuatro marcadores que caracterizan a los haplogrupos A-D. La presencia de **16517e** distingue X6 de X7. La coexistencia de **+10394c** y **+10397a** define el súper-haplogrupo M, al que pertenecen los haplogrupos C, D, G, Q, Z, M1, M7-M11 y otros (Ballinger y col. 1992, Torroni y col. 1994a, Forster y col. 2001, Kivisild y col. 2002, Kong y col. 2003a). Inicialmente considerado un marcador restringido a poblaciones de origen mongoloide (Wallace 1995), fue luego detectado en la India y el este africano (Passarino y col. 1996, Quintana-Murci y col. 1999).

La presencia de 10 linajes no asignables a A-D ni a X pero atribuibles a M entre los 83 Yanomama podría interpretarse como evidencia de la existencia, en América, de otros haplogrupos probablemente asiáticos, no detectados previamente. Sin embargo, al analizar las secuencias de las RHV sin tener en cuenta su *status* para los **PLFR** queda en evidencia que todos los linajes de los Yanomama caen dentro del rango de variación conocido para haplotipos de la RHV-I de los haplogrupos B, C o D (Tabla 3), lo que arroja dudas acerca de la validez experimental y filogenética de X6 y X7. Es importante destacar que las secuencias obtenidas por Easton y col. (1996) son excepcionales por varias razones:

a) muchas posiciones son indeterminadas;

b) para un total de 53 posiciones variables se informaron 25 con transversiones, siendo este conteo una subestimación ya que dos posiciones presentaron dos tipos de transversión, y varias transversiones se repiten en secuencias de diferentes haplogrupos. La razón 1:1 entre transiciones y transversiones informada en este trabajo se aleja del patrón 15:1 descrito para la Región Control (Vigilant y col. 1991, Tamura y Nei 1993);

c) para ninguna de las secuencias RHV-II del haplogrupo C se informa la delección del nucleótido 249, universal en el haplogrupo C, ni la doble delección de las posiciones 290-291, de presencia constante en secuencias C americanas.

Algunos de estos errores fueron advertidos y corregidos en una re-secuenciación de las muestras informada en Merriwether y col. (2000), donde también se reinterpreto el *status* de X6 y X7. En este segundo trabajo se analizaron otros 111 Yanomama, pero ninguno fue atribuido a X6 o X7.

Habiendo notado que las secuencias tipificadas como X6 (N=7) o X7 (N=3) en los Yanomama son muy afines o indistinguibles de secuencias C y D, presentes en Yanomama y otros Amerindios, los autores propusieron que X6 y X7 derivarían de linajes C (N=1) y D (N=9) que habrían sufrido reversiones de sus sitios de restricción específicos.

Esta interpretación es potencialmente aceptable sólo para el caso de la secuencia YanHap37 (Merriwether y col. 2000), asignada a X7 y atribuible a C, que habría sufrido reversión de la transición 13263 que define al marcador **-13259o/+13262a**. Otros trabajos han informado la presencia de linajes C con reversión del sitio diagnóstico. Torroni y col. (1993b) consideraron como un C revertiente para **-13259o/+13262a** al haplotipo AM83 presente en un Makiritare, que compartió otro polimorfismo con varios haplotipos C de diferentes poblaciones amazónicas, interpretación que se vio confirmada con la secuenciación de la RHV en ese individuo (resultados no publicados de Schurr y Brown, citados en Schurr y col. 1999). En varias poblaciones indígenas colombianas se han detectado linajes non-A-D mediante **RCP-PLFR/indel**, cuyas secuencias RHV-I han sido atribuidas mayoritariamente al haplogrupo C (resultados no publicados de Ruiz Linares, citados en Mesa y col. 2000). Y en un estudio de 681 individuos pertenecientes a 25 etnias de Colombia, Keyeux y col. (2002) hallaron que 661 (97%) eran atribuibles a ABCD en base a **PLFR/indel**, y que 18 de los 20 restantes eran portadores de la combinación **+10394c/+10397a**, por lo que probablemente también representen nuevos muestreos de un linaje C revertiente relativamente frecuente en grupos étnicos del norte de Sudamérica. Finalmente, la existencia de linajes C revertientes para **-13259o/+13262a** no está restringida a América del Sur, ya que Smith y col. (1999) han informado un Cherokee sin el sitio de restricción pero con la RHV-I típicos de C. En resumen, hay múltiples evidencias de la existencia de secuencias C revertientes para el sitio diagnóstico del haplogrupo en poblaciones norte- y sud-americanas.

Tabla 5. Secuencias del haplogrupo D en Yanomama.

#	Haplotipo ¹	RHV-I ²	PLFR ³	Referencia
1	YanHap 23	179A 223 256 325 353 362	D1	Merriwether y col. 2000
2	YanHap 25	179A 223 256 325 353	D1	Merriwether y col. 2000
3	YanHap 24	256 325 353 362	X7	Merriwether y col. 2000
4	D2	179A 223 325 353 362	indet.	Williams y col. 2002
4	S10	179A 223 325 353 362	D2	Santos y col. 1996
5	YanHap 26	104G 294 325 362	D2	Merriwether y col. 2000
6	YanHap 27	104A 294 325 362	D2, X6	Merriwether y col. 2000
7	YanHap 29	043 104G 294 325	X6	Merriwether y col. 2000
8	D1	104G 294 302 325 362	indet.	Williams y col. 2002
9	44	104A 294 362	D2	Torrioni y col. 1993b
10	YanHap 28	110 294 325 362	D2	Merriwether y col. 2000
11	YanHap 30	092 223 234 309 325 362	D2, X6	Merriwether y col. 2000
12	YanHap 32	092 223 309 325 362	X6	Merriwether y col. 2000
13	YanHap 31	223 234 309 325 362	D2	Merriwether y col. 2000
14	YanHap 33	223 325 355 362	D2	Merriwether y col. 2000
15	YanHap 34	223 325 362	D2	Merriwether y col. 2000
15	YanHap 35	223 325 362	D2	Merriwether y col. 2000

Las secuencias #15, YanHap 34 y YanHap 35, son indistinguibles en la referencia.

(1) Designación en la referencia; (2) Posiciones variables en la RHV-I, las mutaciones se indican por su posición en SRC restando "16.000", para las transversiones se especifica a continuación la base derivada; (3) *Status* para D1/D2/X6/X7; información no disponible para las secuencias de Williams y col. (2002); D1 se diferencia de D2 por poseer **16517e**.

Por otra parte, una reversión de la mutación que define el haplogrupo D es poco probable, ya que la pérdida del sitio de reconocimiento para *AluI* en posición 5176 es consecuencia de la transversión C→A en posición 5178. Para recuperar el sitio **5176a** sería necesario invocar la ocurrencia de una segunda transversión, esta vez A→C, en la misma posición. Si bien el grado de homoplasia en el ADNmt es alto, las transiciones son unas 10 veces más frecuentes que las transversiones (observaciones personales sobre 746 regiones codificantes completas), por lo que sería altamente improbable suponer que dos transversiones mutuamente cancelables ocurran en la misma posición.

Una inspección de las secuencias D disponibles para Yanomama en la literatura complica aún más la hipótesis de la reversión. En la Tabla 5 se listan estas secuencias, así

como el *status* D1/D2/X6/X7 cuando esa información está disponible. En este conjunto es posible distinguir 15 haplotipos (#1-15) en base a variantes de la RHV-I, que se reparten en tres grupos muy divergentes, quedando dos secuencias aisladas:

- a) la secuencia #15 es la nodal para el haplogrupo D en amerindios;
- b) la secuencia #14 está a un paso mutacional de la #15;
- c) las secuencias #1-4 divergen de la nodal compartiendo la mutación 353 y, en menor frecuencia, la transversión 179A y el cambio 256; en este grupo hay un haplotipo X7;
- d) las secuencias #5-10 comparten 294, la reversión en 223, y usualmente una transversión C→A o C→G en posición 104; este grupo incluye dos haplotipos X6;
- e) las secuencias #11-13 poseen en común 309, y en la mayoría de los casos también 234; dos haplotipos son X6.

Una representación gráfica de las relaciones filogenéticas entre estas secuencias se puede ver en la Figura 3. Las secuencias X6 y X7 están presentes en los tres grupos divergentes reconocibles en las secuencias D de los Yanomama, y cada uno de los haplotipos X6 o X7 se parece más a otros de su propio grupo que a las secuencias de los demás grupos. La interpretación más parsimoniosa de esta distribución sería que el *status* X6/X7 ha sido adquirido independientemente a partir de D por lo menos tres veces. Postular, como hacen Merriwether y col. (2000), que las secuencias X6/X7 afines a D serían consecuencia de la reversión del sitio diagnóstico para el haplogrupo D implicaría estar forzado a aceptar que tan improbable cambio haya ocurrido al menos tres veces, independientemente, al interior de una pequeña población amazónica. Otra explicación, igualmente improbable, sería la de postular una única reversión que luego se asoció a distintos haplotipos en por lo menos dos eventos de recombinación.

A todas luces, los datos experimentales de Merriwether y su equipo carecen de integridad, y no parece inadecuado sospechar de serios errores en la obtención, almacenamiento y/o interpretación de la información, un escenario lamentablemente frecuente en numerosos estudios de ADNmt humano (Bandelt y col. 2001, Röhl y col. 2001, Forster 2003, Yao y col. 2003b, Yao y col. 2004).

Figura 3. Red de haplotipos de las secuencias D en Yanomama.

Red obtenida mediante el algoritmo MJ en el programa NETWORK 4.1 (www.fluxus-engineering.com) sólo en base a la variación en la RHV-I. Cada círculo #1-15 representa una secuencia distinta. Las posiciones variables se indican sobre las barras que separan los círculos, las posiciones recurrentes se subrayan. Los rellenos indican *status* para D1/D2/X6/X7: D1, blanco; D2, negro, X6, rayado vertical; X7 gris; indeterminado, cuadriculado.

4.3.2- El linaje “Cayapa”, una variante del haplogrupo D.

Rickards y col. (1999) estudiaron secuencias de la Región Control y la **Del 9pb** en 150 individuos de la etnia Cayapa de Ecuador, secuenciando ambas RHV en 30 individuos, y sólo la RHV-I en otros 120. Mientras que el 77% (N=115) de las secuencias fueron atribuidas a los haplogrupos A-C, el restante 23% (N=35) mostró una combinación de polimorfismos desconocida en nativos americanos. La secuenciación de otros 20 individuos afro-americanos de la misma región, así como de 20 españoles y 40 africanos, permitió a los autores descartar un origen alóctono para estas secuencias. La combinación 223-241-291-342-362⁴ fue constante en los 35 linajes, 28 de los cuales fueron además portadores de 301. La ausencia de esta combinación en otras poblaciones americanas conocidas, su notable divergencia nucleotídica, y ambiguas relaciones filogenéticas, llevaron a Rickards y col. a postular que este linaje representaba una aparente evolución in situ, específica de los Cayapa.

Una distribución étnico-geográfica más amplia y la asociación definitiva de estas secuencias con el haplogrupo D mediante análisis de **PLFR** corrió por cuenta de Bravi y col. (1999), Green y col. (2000), Alves-Silva y col. (2000) y Moraga y col. (2000).

4.4- Grupos naturales vs. grupos polifiléticos: utilidad del marcador **16517e**.

Bailliet y col. (1994) propusieron que el sitio **16517e** permite distinguir subtipos dentro de los haplogrupos A, C y D. Denominaron A1, C1 y D1 a las variantes con **16517e**, y A2, C2 y D2 a las que carecen del sitio. Merriwether y col. expandieron esta clasificación al distinguir B1 y B2 (Merriwether y Ferrell 1996, Easton y col. 1996, Merriwether y col. 1996, Merriwether y col. 2000). El supuesto de estos autores es que los subtipos 1 y 2 de cada haplogrupo son grupos naturales. Este enfoque y nomenclatura han sido esporádicamente adoptados por algunos investigadores (Kolman y Bermingham 1997, Rodríguez Delfin y col. 2001, Martínez Cruzado y col. 2001), aunque la mayoría no lo

⁴ Transiciones en la RHV-I, posición en SRC indicada restando “16.000”.

utiliza, o incluso cuestionan su validez (Torrioni y Wallace 1995, Forster y col. 1996, Smith y col. 1999).

El análisis de varios cientos de secuencias mitocondriales publicadas permite establecer que un residuo C o T en la posición 16519 condiciona la presencia o ausencia, respectivamente, de un sitio de reconocimiento para *HaeIII* en 16517 (Horai y Hayasaka 1990, Horai y col. 1993, Horai y col. 1996, Abe y col. 1998, Brown y col. 1998, Schurr y col. 1999, Smith y col. 1999, Merriwether y col. 2000, Ingman y col. 2000, Fucharoen y col. 2001, Qian y col. 2001, Maca-Meyer y col. 2001, Derbeneva y col. 2002a-c, Yao y col. 2003a, Malhi y col. 2003, Bolnick y Smith 2003, Reidla y col. 2003, Tajima y col. 2004).

La información disponible permite aseverar que la posición 16519 es hipervariable, y que **16517e** es el más recurrente de todos los sitios de restricción ensayados para el sistema **PLFR** con 14 enzimas (Chen y col. 1995). La adquisición o pérdida de este sitio ha

Figura 4. Red filogenética de 37 secuencias completas del haplogrupo D.

Cada círculo #1-14 representa una secuencia distinta; los diámetros son proporcionales a las frecuencias y los círculos negros señalan secuencias con 16519. Las posiciones variables se indican sobre las barras que separan los círculos; las mutaciones recurrentes están subrayadas. Secuencias completas y demás información en Derbeneva y col. (2002b).

ocurrido repetidas veces al interior de cada haplogrupo (véase un caso en las secuencias del haplogrupo D de los Yanomama en la Figura 3 y la Tabla 5) .

Un ejemplo extremo de esta recurrencia queda en evidencia al analizar las 37 secuencias completas del haplogrupo D informadas para Esquimales y Aleutianos (Derbeneva y col. 2002b). En la Figura 4 se ilustra una red que relaciona las 14 secuencias distintas obtenidas. Para un total de >215.000 pares de bases secuenciadas, se observan 19 posiciones segregantes e infieren 21 eventos mutacionales. Todas las secuencias carecen de 16519, a excepción de la #3 y la #13. La secuencia #3 se diferencia de la nodal #1 por la presencia de 16519, mientras que la secuencia #13 se halla a dos pasos mutacionales de la #12. Aplicar el criterio de Bailliet y col. (1994) a estas secuencias resultaría en la generación del grupo difilético D1 con las secuencias #3 y #13, y un grupo parafilético D2 con las restantes.

La filogenia presentada en la Figura 4 desnuda el alto grado de homoplasia que sufre la posición 16519, para la que podemos inferir al menos una recurrencia en el

limitado muestreo de 37 individuos de un sub-haplogrupo de D. Nótese que la secuencia #3 se distingue de la nodal #1 en sólo una posición entre 16569 pares de bases: la transición 16519. El estudio de mayor cantidad de individuos y/o la inclusión de otras poblaciones no haría más que aumentar la cantidad de homoplasias detectables para 16519.

Estas observaciones son igualmente aplicables a los haplogrupos A, B y C, sea ya analizando secuencias completas, secuencias de la Región Control, haplotipos basados en PLFR o bien alguna combinación de las dos últimas fuentes de información. En resumen, la subdivisión de haplogrupos en base a **16517e** genera grupos para- y poli-filéticos, por lo que carece de todo valor filogenético.

4.5- Un poco de ruido en el sistema: reversiones de sitios diagnóstico y otras homoplasias.

En 4.3.1 se ha reseñado la existencia de linajes mitocondriales asignables a C que carecen de **-13259o/+13262a**, la combinación de sitios de restricción específicos del haplogrupo. Es fácil demostrar que esta ausencia es una novedad evolutiva y no la supervivencia de una combinación ancestral, ya que las secuencias C americanas son filogenéticamente derivadas respecto de la secuencia nodal para el haplogrupo, y en Asia está ampliamente demostrado la co-existencia de **-13259o/+13262a** y las transiciones en las posiciones diagnósticas 16223, 16298 y 16327 en la RHV-I.

En ausencia de recombinación en el ADNmt, la inexistencia de **-13259o/+13262a** en linajes americanos cuyas secuencias son de todos modos típicamente C implica que la transición que originalmente creara el marcador ha revertido a su estado ancestral. Este es el único cambio que permite recuperar un sitio de reconocimiento para *HincII* en 13259. Así, es posible inferir que en la posición 13263 de algunos linajes C se han sucedido, en el tiempo, los cambios mutuamente cancelables $A \rightarrow G \rightarrow A$.

Pero el haplogrupo C no es el único para el que se han comprobado reversiones del sitio de restricción diagnóstico. Smith y col. (1999) informaron de un individuo Creek⁵, y Santos y col. (1996)⁶ de dos aborígenes amazónicos cuyos *status* para los polimorfismos de restricción no fueron congruentes con las secuencias de la RHV-I: aunque carecieron de **+663e**, sus secuencias permiten asignarlos al haplogrupo A. Para estos casos no es

⁵ La secuencia RHV-I (111-223-290-319-362-390) de este individuo fue posteriormente informada como Creek64 en Bolnick y Smith 2003.

⁶ Las secuencias y haplotipos de PLRF/indel publicados por Santos y col. (1996) deben ser evaluados con precaución ya que hay no pocos errores graves (C. Bravi, observaciones sin publicar).

indispensable invocar una reversión de 663*G, la mutación que generó el sitio de reconocimiento para *Hae*III que define al haplogrupo A (AGCC→GGCC), ya que cualquier cambio en alguna de las cuatro posiciones entre 663 y 666 resultaría en la abolición de +663e.

4.5.1- ¿Heterogeneidad de linajes dentro del haplogrupo B americano o recurrencia para el marcador +10394c?

Rodríguez Delfin y col. (2001) realizaron un estudio de baja resolución en una muestra de 52 Quechuas de Perú, informando una alta frecuencia del haplogrupo B y la existencia de tres linajes non-ABCD, uno de cuales pudo ser caracterizado como africano. Los dos restantes compartieron la ausencia de los marcadores **10394c** y **10397a** pero no fueron analizados con más detalle. Dos de los 30 individuos asignados al haplogrupo B se diferenciaron de los restantes linajes B por presentar el sitio **10394c**, y uno de ellos además careció de **16517e**. La presencia de linajes con **Del 9pb** y **+10394c** en América también ha sido informada en uno de 15 Zapotecas por Torroni y col. (1994b), y en uno de 94 portorriqueños por Martínez Cruzado y col. (2001).

Dado que la combinación **Del 9pb/+10394c** también está presente en Asia, Rodríguez Delfin y col. (2001) interpretaron su hallazgo como prueba de la existencia de otro haplotipo fundador para el haplogrupo B. Sin embargo, la evidencia disponible permite discutir que las combinaciones **Del 9pb/+10394c** presentes en Asia y América correspondan a un mismo grupo monofilético.

Haplotipos con la combinación **Del 9pb/+10394c** fueron descritos inicialmente por Ballinger y col. (1992) en poblaciones del este y sudeste asiático, y luego en otras poblaciones de la región por Kolman y col. (1996), Abe y col. (1998), y Derenko y col. (2000), entre otros. Ya Ballinger y col. (1992) propusieron que los dos grupos de linajes asiáticos con **Del 9pb** pero divergentes para **10394c** debían tener un origen común, aunque hubo que esperar hasta 2002 para probarlo, cuando el análisis de polimorfismos de la RHV-I y regiones codificantes, así como de secuencias completas, permitió refinar la filogenia del ADNmt en poblaciones asiáticas (Kivisild y col. 2002, Kong y col. 2003a). A partir de estos estudios se propusieron varias redefiniciones de haplogrupos y otras divisiones jerárquicas. Para el haplogrupo B contamos ahora con una definición más inclusiva que la original: este haplogrupo se caracteriza por la coexistencia del marcador **Del 9pb** y la transición en 16189. Dentro de B se distinguen dos sub-haplogrupos: B4, con la transición

16217; y B5, con +**10394c** y la transición 16140. Al interior de B5 se distinguen las ramas B5a con la transversión C→A o C→G en 16266 y B5b con 16243. El haplogrupo B, tal cual fuera definido originalmente por Torroni y col. (1992) y usado universalmente en la literatura y en esta tesis, corresponde a la rama B4 del haplogrupo B *sensu* Kivisild y colegas. B4 y B5 son entonces clados hermanos dentro del haplogrupo B, confirmando la temprana hipótesis de Ballinger y col. (1992). Por razones de sencillez, en esta tesis seguimos utilizando la nomenclatura antigua, con la excepción del presente apartado.

La propuesta de Rodríguez Delfín y col. (2001), vista a la luz de la nueva nomenclatura, implicaría la presencia de B5 en nativos americanos. Sin embargo, la combinación de mutaciones que definen B5a (16140-16189-16266A/G) o B5b (16140-16189-16243) no está presente en 3164 secuencias de nativos americanos compiladas para esta tesis (Tabla A2 en Anexo), entre las que unas 713 son, en cambio, asignables a B4.

Por otra parte, está demostrado que el marcador +**10394c** es moderadamente recurrente, ya que aparece asociado a algunos linajes dentro de haplogrupos en los que su ausencia es la norma:

- a) en los haplotipos AM7-8, del haplogrupo A en América (Torroni y col. 1993b);
- b) en algunos linajes del sub-haplogrupo B4a de China (Kivisild y col. 2002);
- c) en el haplogrupo euroasiático K, parte a su vez del haplogrupo U (Finnilä y col. 2001);
- d) en el haplogrupo J, parte del *cluster* euroasiático JT (Finnilä y Majamaa 2001);
- e) en el haplogrupo I, parte del *cluster* euroasiático IWX (Herrnstadt y col. 2002).

La aparente ausencia de secuencias RHV-I atribuibles a B5 en América, sumado a la naturaleza homoplásica del marcador +**10394c**, permiten confrontar la opinión de Rodríguez Delfín y col. (2001) y proponer que la presencia de +**10394c** en algunos linajes B americanos no representa una combinación ancestral sino que constituye, en cambio, una novedad generada en el continente.

Linajes maternos autóctonos y alóctonos en poblaciones aborígenes americanas

Como hemos visto previamente, más del 99% de los linajes mitocondriales estudiados en poblaciones nativas americanas puede ser asignado a uno de los cinco haplogrupos ABCDX, sea ya en base a secuencias de la Región Control, ya en base a mutaciones de punto o polimorfismos de longitud ubicados en el resto de la molécula. Cuando son analizados adecuadamente, la mayoría de los linajes restantes se distribuyen en dos grupos: por un lado están aquellos de origen africano o europeo, de incorporación post-colombina en el acervo genético americano; por otro lado están los que, perteneciendo a los haplogrupos A o C, han sufrido la reversión de sus sitios de restricción específicos (ver apartados 4.3.1 y 4.5).

Con el objetivo de aumentar el conocimiento sobre el origen étnico-geográfico de los linajes maternos presentes en poblaciones americanas, en esta sección se presenta un estudio de 11 poblaciones nativas de E.U.A., México, Colombia, Paraguay y Argentina. Mediante una combinación de protocolos de alta y baja resolución, se generó y analizó información molecular para 439 individuos. Este análisis fue extendido a uno de los seis Mapuches non-ABCD publicados por Bailliet y col. (1994). Los otros cinco Mapuches, así como dos Wichí non-ABCD (Bianchi y col. 1995) no pudieron ser incluidos dado que sus muestras de ADN estaban agotadas.

5.1- Materiales y Métodos

5.1.1- Nomenclatura

El extensivo uso del ADNmt humano en estudios evolutivos se ha visto reflejado en la igualmente profusa coexistencia de esquemas de clasificación de los haplotipos y grupos de linajes reconocidos. Este problema ha sido exacerbado por el uso de métodos filogenéticos inapropiados para el estudio de la diversidad intra-específica del ADNmt (Bandelt y col. 1995), y por la heterogeneidad de la información molecular generada. Así, mientras algunos investigadores obtienen sólo secuencias de la Región Control, otros analizan todo el ADNmt mediante RCP-PLFR u obtienen secuencias parciales o totales de

la región codificante. Y si algunos se limitan a buscar marcadores haplogrupo-específicos, otros utilizan diferentes combinaciones de los enfoques experimentales antes mencionados. A modo de ejemplo de esta Babel de haplogrupos mitocondriales véase la Tabla 3, donde se muestran las equivalencias para las nomenclaturas de cuatro publicaciones dedicadas al estudio del ADNmt en América: el denominado haplogrupo **A** por Torroni y col. es reconocido como **III**, **II**, o **4** por los grupos de Horai, Ward y Ginther, respectivamente. En otros casos, una misma denominación es aplicada a diferentes linajes: el haplotipo **E** de Bailliet y col. (1994) descrito en el contexto de estudios en poblaciones americanas no es el mismo haplotipo **E** que identifican Kolman y col. (1996) en mongoles, y ninguno de ellos coincide con la definición de haplogrupo **E** dada por Torroni y col. (1994a) para poblaciones del este asiático.

La proliferación de nomenclaturas basadas en análisis filogenéticos imperfectos y diferentes fuentes de información llevó a Richards y col. (1998) a proponer un sistema cladístico de nominación para los diferentes grupos naturales⁷ distinguibles en la filogenia del ADNmt humano. Abandonando sus propias clasificaciones iniciales (por ejemplo Richards y col. 1996, Corte-Real y col. 1996), tomaron como base la nomenclatura propuesta por Douglas Wallace y sus colaboradores, quienes aplicaron un mismo enfoque experimental –el análisis del total del ADNmt mediante RCP-PLFR con 14 enzimas– al estudio de linajes mitocondriales provenientes de todos los continentes (ver revisión en Wallace y col. 1999).

En la propuesta de Richards y col. (1998) se preservan las designaciones y definiciones de los haplogrupos A-D (Torroni y col. 1992), E-G (Torroni y col. 1994a), H-K (Torroni y col. 1994d), L1-L2 (Chen y col. 1995) y T-X (Torroni y col. 1996). Se permiten, además, relaciones de inclusión: existen súper-haplogrupos que reúnen varios haplogrupos (por ejemplo M incluye C, D, E y G), y es posible reconocer sub-haplogrupos y otras divisiones menores dentro de un haplogrupo. Los sub-haplogrupos se distinguen añadiendo un número como sufijo a la letra mayúscula que designa el haplogrupo (por ejemplo J1 y J2 dentro de J); para divisiones menores se alternan letras y números en el sufijo (J1a y J1b dentro de J1; J1a1 y J1a2 dentro de J1a, etc.). Para una descripción más completa véase Richards y col. (1998), y Macaulay y col. (1999).

⁷ Por grupo natural se entiende a todo grupo monofilético. Siendo el ADNmt un bloque de ligamiento completo en el que las mutaciones se acumulan secuencialmente, sería idealmente posible reconocer tantos grupos monofiléticos como bi- o multi-furcaciones existieran en una filogenia libre de homoplasia. En la práctica, sólo reciben denominación aquellos grupos que los investigadores encuentran relevantes en el estudio de determinada/s poblacion/es.

En Richards y col. (1998) también se anticipa que el aumento en la cantidad y calidad de información disponible forzarán la redefinición tanto de grupos de linajes como de sus relaciones recíprocas. A modo de ejemplo, los autores utilizan las secuencias generadas por Hofmann y col. (1997) para reconocer que el haplogrupo K es de hecho un sub-haplogrupo del “haplogrupo” U, este último en realidad un grupo parafilético de linajes en su definición original por Torroni y col. (1996). Otro ejemplo de redefinición fue discutido en el apartado 4.5.1 para el caso del haplogrupo B.

Robusto y flexible a la vez, este sistema de nomenclatura ha sido universalmente adoptado por los investigadores que utilizan el ADNmt en estudios evolutivos y forenses, y es el que se utilizará lo largo de este trabajo. Aquellos individuos que no puedan ser atribuidos a un haplogrupo determinado mediante el estudio de una batería de marcadores haplogrupo-específicos serán reunidos en el grupo “**Otros**” (Tabla 7), denominación que reemplaza al haplotipo E empleado por Bailliet y col. (1994) y Bianchi y col. (1995); y al haplotipo N utilizado por Stone y Stoneking (1993). Se prefiere la designación “**Otros**” ya que preserva la incertidumbre acerca de la naturaleza de los haplotipos non-ABCD en poblaciones americanas.

5.1.2- Poblaciones estudiadas

Las muestras de sangre o ADN de poblaciones nativas fueron obtenidas del Banco de Muestras Biológicas del IMBICE (Instituto Multidisciplinario de Biología Celular, CIC-CONICET, La Plata).

Con el objeto de evitar el muestreo redundante de linajes que distorsionara el cálculo de las frecuencias relativas, fueron considerados elegibles para el presente estudio aquellos individuos no emparentados a través de la línea materna. Para las poblaciones originarias de la República Argentina y para los Lengua de Paraguay, la selección se basó en la información genealógica recolectada mediante entrevistas personales por los investigadores que donaron las muestras al IMBICE. Para la población Ayoreo fue imposible establecer las relaciones de parentesco durante el muestreo (J. Ferrer, comunicación personal), por lo que se utilizaron todas las muestras disponibles. Como se verá, la falta de información genealógica en los Ayoreo no provoca una distorsión significativa. Los individuos que componen las muestras de las poblaciones Chimila, Maya, Zuñi, Navajo y Sioux/Chippewa fueron seleccionados excluyendo personas emparentadas.

A continuación se detallan la procedencia geográfica, el número de individuos muestreados en cada población, y otros datos de interés.

Tehuelche

Las poblaciones de El Chalía y Loma Redonda, en el sudoeste de la provincia de Chubut, fueron contactadas por los investigadores Francisco Raúl Carnese y Alicia Goicoechea (Facultad de Filosofía y Letras, UBA). Un total 63 personas donaron voluntariamente muestras de sangre, y 31 de ellas fueron seleccionadas para el presente trabajo.

Mocoví

Un total de 73 muestras de ADN extraídas a partir de sangre total fueron donadas al IMBICE por el Dr. Zukas (Laboratorio de Inmunología e Histocompatibilidad, Centro Tipificador # 10, Santa Fe). Las muestras fueron obtenidas en la localidad de Colonia Dolores, provincia de Santa Fe, República Argentina; 64 individuos no relacionados por vía materna fueron elegidos para su inclusión en este trabajo.

Chorote

25 muestras de sangre fueron obtenidas por la Dra. Alicia Goicoechea (Facultad de Filosofía y Letras, UBA) y el Dr. Jorge Ferrer (University of Pennsylvania) en los alrededores de Santa Victoria Este, provincia de Salta, República Argentina. Del total disponible, 21 resultaron elegibles.

Jujuy

Un total de 41 donantes voluntarios de sangre en el Hospital Soria de San Salvador de Jujuy fueron seleccionados en base a su fenotipo y ascendencia indígena por los investigadores José Dipierri y Emma Alfaro.

Ayoreo

46 muestras de sangre fueron obtenidas por el Dr. Jorge Ferrer (University of Pennsylvania, E.U.A.) en el Gran Chaco paraguayo.

Lengua

37 individuos no relacionados a través de la vía materna fueron seleccionados sobre un total de 46 muestreados por el Dr. Jorge Ferrer (University of Pennsylvania, E.U.A.) en el Gran Chaco paraguayo.

Chimila

30 muestras de ADN de esta etnia, habitante de la Sierra Nevada en el Departamento Santa Marta, Colombia, fueron donadas por el Dr. René Herrera (Florida International University, E.U.A).

Maya

48 muestras de ADN de Mayas Yucatecos, de México, fueron donadas por el Dr. René Herrera (Florida International University, Miami, EUA).

Zuñi

41 muestras de ADN proveniente de poblaciones localizadas en New Mexico (EUA), fueron donadas por el Dr. René Herrera (Florida International University, E.U.A).

Sioux/Chippewa

Un total de 40 muestras de ADN obtenidas de individuos de ascendencia Sioux y/o Chippewa provenientes de Minnesota y South Dakota, EUA, fueron donadas por el Dr. René Herrera (Florida International University, E.U.A).

Navajo

El Dr. René Herrera donó 40 alícuotas de ADN extraído a partir de muestras de sangre colectadas en la Reserva Cañoncito, New Mexico, E.U.A.

5.1.3- Extracción de ADN genómico total

La obtención de ADN a partir de muestras de sangre se realizó utilizando dos protocolos: un método breve, basado en la utilización de la resina quelante Chelex® 100 (Walsh y col. 1991); y un procedimiento que involucra solventes orgánicos (John y col. 1991).

Extracción basada en Chelex® 100

Tres a cinco μL de sangre total fueron mezclados con agua destilada estéril en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL e incubados a temperatura ambiente durante 15-30 minutos, siendo agitados periódicamente por inversión. Luego fueron centrifugados durante 2 minutos en una microcentrífuga a $\sim 12000x$ g y el líquido sobrenadante fue descartado cuidadosamente. 200 μL de solución Chelex 5% (p/v en agua destilada estéril) fueron

agregados con una pipeta automática y una punta de gran capacidad (1 mL). Durante el agregado, la solución Chelex fue mantenida en agitación mediante un pequeño imán submarino en una plataforma giratoria, de modo tal que las partículas de resina mantuvieran una distribución homogénea. Los tubos con la mezcla del concentrado celular y la solución Chelex fueron incubados a 56°C durante 15-30 minutos en un baño termostático, para ser luego agitados violentamente durante 10 segundos e incubados en agua hirviendo durante 8 minutos. La exposición del concentrado celular a la alta alcalinidad de la solución Chelex (pH 10-11) y a temperaturas de 100°C resultan en la destrucción de las membranas celulares y la desnaturalización del ADN. Finalmente, los tubos son agitados violentamente en un vórtex durante 10 segundos, centrifugados a ~ 12000x g durante 2-3 minutos, rotulados y refrigerados a -20°C hasta su utilización.

Extracción orgánica basada en el protocolo de John y col. (1991)

a- 0.5-3 mL de sangre total son mezclados con igual volumen de solución 1 (10 mM Tris pH 7.6; 10 mM KCl; 10 mM MgCl₂) y 120 µL del detergente Nonidet P40 para lisar las células. Se mezcla varias veces por inversión.

b- El pellet nuclear es concentrado por centrifugación a 2000 rpm durante 10 minutos.

c- Se descarta el sobrenadante sin perturbar el concentrado y luego se lo resuspende con 800 µL de la solución 2 (10 mM Tris pH 7.6; 10 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 0.5 M NaCl; 0.5% SDS; 2 mM EDTA), que lisará los núcleos. Se transfiere cuidadosamente a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL.

d- Se agregan 400 µL de fenol (saturado con Tris pH 8.0 1 M) y se mezcla bien. Se centrifuga durante un minuto a 12.000 rpm y se transfiere la fase superior a otro tubo de microcentrífuga.

e- Se agregan 200 µL de fenol y 200 µL de Sevag (cloroformo:alcohol isoamílico 24:1) y se mezcla bien por inversión. Se centrifuga durante un minuto a 12.000 rpm y se transfiere la fase superior a otro tubo.

f- Se agregan 700 µL de Sevag y se extrae como en el paso anterior. Se transfiere la fase superior a otro tubo, cuidando de no remover la interfase, y se agregan dos volúmenes de etanol helado. Se mezcla para precipitar el ADN y se centrifuga durante un minuto a 12.000 rpm, descartándose cuidadosamente el líquido.

g- Se agrega 1 mL de etanol 70% y se agita para lavar el ADN, luego se centrifuga a 12.000 rpm durante 5 minutos, se descarta el etanol y se deja secar el ADN en el tubo

durante 12 hs en la heladera. Finalmente se resuspende el ADN en 100-200 μL de agua estéril.

5.1.4- Tipificación de haplogrupos mitocondriales

La asignación de un individuo a un haplogrupo determinado se realizó mediante una búsqueda jerárquicamente organizada de marcadores mitocondriales. Inicialmente, todos los individuos fueron analizados para los tres sitios de restricción y el polimorfismo de longitud que definen a los haplogrupos A-D (Tabla 2). Para ello se amplificaron cuatro fragmentos informativos mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa. Los estados de carácter para las mutaciones puntuales fueron establecidos mediante digestión con las enzimas apropiadas y posterior electroforesis de los fragmentos resultantes en geles de agarosa. El polimorfismo de longitud, consistente en la presencia de una o dos copias de una secuencia de nueve pares de bases en una región no codificante del ADN mitocondrial, fue analizado mediante electroforesis del fragmento amplificado en geles de agarosa de alta resolución.

Aquellos individuos no asignados a alguno de los haplogrupos A-D fueron estudiados para los sitios **10394c** y **10397a** (cuyas diferentes combinaciones muestran asociaciones más o menos específicas para cada haplogrupo), y para dos polimorfismos informativos en el haplogrupo X: la pérdida del sitio *DdeI* en 1715 y la ganancia de un sitio *EcoRV* en la posición 16274, esta última consecuencia de la mutación 16278*T. Los individuos no asignados a X en el paso anterior fueron analizados para la pérdida del sitio *DdeI* en 7025, característica del haplogrupo H, el más frecuente en poblaciones caucásicas. Debido a la limitada cantidad de ADN disponible, se procedió luego a obtener la secuencia de la RHV-I y finalmente, en algunos casos, se confirmó la asignación a un haplogrupo basada en secuencias mediante un ensayo de **PLFR** específico. Los iniciadores utilizados fueron obtenidos del Banco de Cebadores Mitocondriales del IMBICE, y han sido empleados en trabajos previos (Bailliet y col. 1994, Bravi y col. 1997, Martínez-Marignac y col. 1999) o bien fueron diseñados para el presente estudio (Tabla 6).

Amplificación de los fragmentos.

Las amplificaciones se llevaron a cabo en un volumen final de 25 μL , con 6 pmol de cada iniciador, 0.625 unidades de polimerasa Taq y ~ 100 ng de ADN o 3-5 μL de solución Chelex®. Las mezclas se realizaron utilizando la solución tampón recomendada por el

Tabla 6- Iniciadores y marcadores mitocondriales empleados.

Par	Designación ¹	Secuencia	Marcador	Haplog.
1	MiL 582	5'-TGTAGCTTACCTCCTCAAAGC-3'	+663e	A
	MiH 745	5'-TTGATCGTGGTGATTTAGAGG-3'		
2	MiL 8209	5'-CATCGTCCTAGAATTAATTCC-3'	Del 9pb	B
	MiH 8304	5'-CTTTACAGTGGGCTCTAGAGG-3'		
3	MiL 13209	5'-CGCCCTTACACAAAATGACATCAA-3'	-13259o	C
	MiH 13437	5'-AGGTATGGTTTTGAGTAGTCCTCC-3'		
4	MiL 5150	5'-CCTACTACTATCTCGCACCTG-3'	-5176a	D
	MiH 5281	5'-GTGAATTCTTCGATAATGGCC-3'		
5	MiL 10357	5'-TAAGTCTGGCCTATGAGTGA-3'	+/- 10394c	múltiple
	MiH 10507	5'-AGTATTCCTAGAAGTGAGATGG-3'		
6	MiL 1549	5'-GAGGAGACAAGTCGTAACATGG-3'	-1715c	X
	MiH 2583	5'-GTTAGGGTACCGCGCCGTTA-3'		
7	MiL 16108	5'-CAGCCACCATGAATATTGTAC-3'	+EcoRV 16278	X
	MiH 18	5'-GGTGATAGACCTGTGATCCAT-3'		
8	MiL 3266	5'-AAAACCTTACAGTCAGAGGTTCAA-3'	+3592	L
	MiH 3718	5'-GGGCTACTGCTCGCAGTG-3'		
9	MiL 6922	5'-GAGCCCTAGGATTCATCTTTC-3'	-7025a	H
	MiH 7168	5'-TTTACGCCGATGAATATGATAG-3'		
10	MiL 15905	5'-TAATACACCAGTCTTGTAACC-3'	RHV-I	múltiple
	MiH 16498	5'-CCTGAAGTAGGAACCAGATG-3'		
11	MiL 15978	5'-CACCATTAGCACCCAAAGCT-3'	RHV-I	múltiple
	MiH 16401	5'-TGATTTACGGAGGATGGTG-3'		

(1)- MiL y MiH se refieren a las cadenas liviana y pesada, respectivamente, del ADNmt. La numeración indica la posición 5' del iniciador en la SRC.

Figura 5. Verificación de la digestión del fragmento amplificado con el par de cebadores #4, para el marcador -5176a.

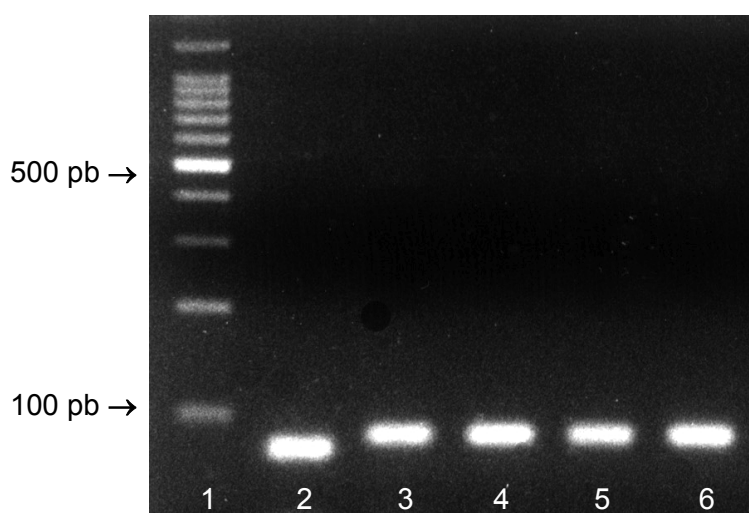
Calles 1, 2 y 4: individuos con presencia del sitio **5176a**; calle 3, individuo con ausencia del sitio **5176a**; calle 5, escalera de 100 pb utilizada como marcador de peso molecular.

proveedor (GIBCO-BRL™) con concentraciones finales de 1.5 mM de MgCl y 200 μM de desoxinucleótidos (New England Biolabs). Cada mezcla fue cubierta con ~ 30 μL de aceite mineral y sometida a 30 ciclos de desnaturalización, reasociación y extensión a 94°C, R⁸ y 72°C, respectivamente. Cada etapa del ciclado tuvo una duración de un minuto y se agregó un período final de extensión de 5 minutos a 72°C. Las amplificaciones fueron realizadas en un ciclador térmico Hybaid. La verificación del éxito de las reacciones se realizó mediante la electroforesis de una alícuota de 10 μl en geles de agarosa al 2 %.

Digestión enzimática.

15 μl del amplicón fueron digeridos durante 6 horas a 37°C, en un volumen final de 25 μL con 10 unidades de enzima, en la solución tampón recomendada por el proveedor (New England Biolabs).

Figura 6. Electroforesis de fragmento amplificado con el par de cebadores #2, para el marcador Del 9pb.



⁸ La temperatura de reasociación R varió según el par de iniciadores empleados: para los pares 1-4 y 8 fue de 53°C; para 5, 9 y 10 fue de 54°C; para 7, 11 y 12 fue de 55°C y para 6 fue de 59°C.

Calle 1, escalera de 100 pb utilizada como marcador de peso molecular; calle 2, fragmento de 87 pb en un individuo portador de **Del 9bp**; calles 3-6, fragmentos de 96pb, provenientes de individuos sin la **Del 9pb**.

Electroforesis. Verificación de las amplificaciones y de las digestiones

10 μ L de cada amplicón fueron mezclados con 1 μ L de solución de carga (0.25% azul de bromofenol, 0.25% cianol de xileno, 40% p/v sacarosa en agua) y sembrados en geles de agarosa al 2% (p/v), de 11 cm x 14 cm x 1 cm. Los geles fueron sometidos a un campo eléctrico de 3 V/cm sumergidos en solución tampón TBE (90 mM Tris-borato, 2 mM EDTA) con agregado de bromuro de etidio (0.5 μ g/mL). Como marcadores de peso molecular se sembraron 500 ng de una escalera de 100 pares de bases (Promega). Los fragmentos fueron visualizados en un transiluminador bajo radiación ultravioleta y documentados fotográficamente. Las reacciones de digestión fueron mezcladas con 3 μ L de la solución de carga y corridos en similares condiciones (ver ejemplo en Figura 5).

Electroforesis. Polimorfismo de la Región V

Los fragmentos amplificados para la Región V pueden ser portadores de 1 o 2 repetidos de la secuencia CCCCTCTA, por lo que pueden medir 87 o 96 pb. Para distinguir estas variantes fue necesario correr los amplicones en geles de alta resolución: el volumen total del PCR fue mezclado con 3 μ L de solución de carga y sembrado en un gel mixto al 4% (agarosa común 1%, Nu Sieve 3%).

Nu Sieve (FMC) es una agarosa de bajo punto de fusión que permite una mejor definición del tamaño de los fragmentos (Figura 6). Como marcadores de peso molecular se sembraron 500 ng de una escalera de 100 pb (Promega) y/o 1 μ g de una escalera de 10 pb (Promega). Las condiciones de electroforesis fueron similares a las ya descritas.

Secuenciación de la Región Hipervariable I

La Región Hipervariable I fue secuenciada manualmente mediante el método de fin de síntesis mediada por incorporación de di-desoxinucleótidos, conocido en forma abreviada como método de Sanger, en honor a uno de sus autores (Sanger y col. 1977). La secuencia de la RHV-I fue obtenida entre las posiciones 16038 y 16370, mediante un procedimiento que involucró dos etapas de amplificación: inicialmente se obtuvo un fragmento de doble cadena de 594 pb de longitud, que luego fue utilizado como templado para las reacciones de secuenciación propiamente dichas. La secuencia finalmente informada para cada

individuo resultó del ensamblado de dos secuencias parciales obtenidas a partir de ambas cadenas del templado. Cada una de las secuencias parciales provino de una u otra de las cadenas del templado, y fueron obtenidas utilizando iniciadores que hibridaron por fuera de la región de interés. A continuación se detalla el procedimiento completo empleado en la obtención de las secuencias.

Amplificación del templado

Se amplificó mediante **RCP** un fragmento de 594 pb utilizando los iniciadores MiL-15905 y MiH-16498 (par de iniciadores #11 en Tabla 6). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen de 30 μL , con las concentraciones de reactivos y ADN usuales (ver 4.1.3), con la excepción de que la concentración final de nucleótidos fue disminuida a 100 μM . Las mezclas de reacción fueron sometidas a 35 ciclos con temperaturas de 94°C, 55°C y 72°C para las etapas de desnaturalización, hibridación y extensión, respectivamente. La verificación de la calidad y rendimiento de la amplificación se realizó mediante la electroforesis de una alícuota de 7 μL del amplicón en un gel de agarosa al 2%, respetando las condiciones descritas para procesos de verificación.

Purificación y cuantificación del templado

En las reacciones de secuenciación es muy importante contar con un templado tan limpio como sea posible, libre de nucleótidos, iniciadores y dímeros de iniciadores, así como de cualquier otra sustancia que pudiera interferir en la reacción de secuenciación. Para obtener templados de calidad, los amplicones fueron extraídos de la mezcla de PCR mediante precipitación: el sobrenadante oleoso fue absorbido con una pipeta automática y descartado, mientras que el remanente acuoso fue mezclado con 40 μL de alcohol isoamílico y refrigerado durante una hora a -80°C. Luego, los tubos fueron centrifugados a 10.000g durante dos minutos para acumular el precipitado sobre el fondo del tubo, y la fase acuosa fue descartada. El remanente fue lavado con 60 μL de etanol 70%, nuevamente concentrado por centrifugación a 10.000g, y resuspendido en 40 μL de agua bidestilada. El tubo con el templado resuspendido, abierto al aire, fue calentado durante 30 minutos a 65°C en el termociclador, con el objeto de evaporar los residuos de etanol que pudieran conservarse.

Y como en las reacciones de secuenciación también es crítica la masa de templado que se utiliza, las concentraciones de ADN de las soluciones acuosas de resuspensión fueron estimadas. Para ello, alícuotas de 4 μL de cada solución fueron sometidas a electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%. En cada gel se ocuparon seis calles con

estándares de cuantificación (DNA Quantitation Standards, Life Technologies, E.U.A.), que proveyeron bandas de masa conocida de 7.5, 15, 31, 62, 125 y 250 ng totales. Las bandas correspondientes a cada templado fueron comparadas con aquellas de los estándares, de modo tal que la intensidad de fluorescencia bajo radiación UV, proporcional a la masa de ADN presente, permitiera estimar las concentraciones de las soluciones de templado.

Reacción de secuenciación

Para las reacciones de secuenciación se utilizó el *kit* comercial **Cyclist™ Exo- Pfu** (Stratagene, EUA) y los iniciadores MiL-15978 o MiH-16401 (par de iniciadores #12 en Tabla 6). Como nucleótido radioactivo se empleó desoxiadenosina-5'-trifosfato marcado con ³⁵S en el grupo fosfato proximal (NEG-734H dATP α-35S Easy Tide, New England Biolabs, E.U.A.), y el procedimiento siguió las recomendaciones del protocolo provisto con el *kit*, tal cual se describe abajo:

a- En un eppendorf mantenido sobre hielo se mezclaron los siguientes reactivos:

Templado	200 fmol
Iniciador	1 pmol
Solución tampón de secuenciación	4 μL
dATP α-35S	10 μCi
Polimerasa Exo- Pfu	1 μL (2.5U)
dimetil-sulfóxido	4 μL
Agua	hasta completar volumen final de 30 μL

b- En cada uno de cuatro eppendorfs mantenidos en hielo se colocaron 3 μL de uno de los cuatro di-desoxinucleótidos, y luego de agregaron 7 μL de la mezcla preparada en a-. Se mezcló mediante pipeteo, y se agregaron 15 μL de aceite mineral.

c- Las mezclas de reacción fueron sometidas a 30 ciclos con temperaturas de 94°C, 55°C y 72°C para las etapas de desnaturalización, hibridación y extensión, respectivamente. Cada etapa tuvo una duración de un minuto, y el ciclado se inició con una desnaturalización a 94°C durante cuatro minutos.

d- Tras el ciclado, los amplicones fueron mezclados con 7 μL de la solución de inactivación y los eppendorfs fueron depositados en un congelador a -80°C hasta su posterior electroforesis.

Electroforesis

Tres a cinco μL de los amplicones fueron sometidos a electroforesis en geles desnaturantes de acrilamida al 6%. Los geles tuvieron un tamaño de 35 cm x 45 cm y fueron preparados 2-14 hs antes de su utilización. Las calles de siembra fueron creadas mediante un peine “dientes de tiburón”, y la solución tampón utilizada para preparar y correr el gel fue TBE 1x (90 mM Tris-borato, 2 mM EDTA). La electroforesis se desarrolló bajo un voltaje de ~ 30 v/cm. Cada amplicón fue corrido dos veces, durante 3 y 7 hs cada vez, de modo tal de obtener una lectura proximal y otra distal, respecto del iniciador, de la misma secuencia.

Preparación del gel

1- Los vidrios son lavados cuidadosamente con agua y detergente, secados con toallas de papel y repasados con etanol. Para armar el gel son yuxtapuestos, permaneciendo aislados el uno del otro por la presencia de separadores laterales. Los laterales y el fondo son sellados con cinta adhesiva ancha (3M), y los vidrios son mantenidos en posición mediante el uso de broches.

2- Un volumen de 50 mL de la solución de trabajo de acrilamida 6%-urea, previamente preparada (ver luego), es mezclado con 80 μL de una solución de persulfato de amonio al 40% (p/v) y es agitado vigorosamente. Luego se agregan 40 μL de TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletildiamina), se mezcla vigorosamente y la solución se vuelca suavemente entre los vidrios y se deja reposar hasta su polimerización.

Soluciones utilizadas

1- Solución concentrada de acrilamida-bisacrilamida al 40 %.

acrilamida	380 gr
N, N'-metilenbisacrilamida	20 gr
Agua destilada	600 mL

La mezcla es calentada a 37°C hasta la disolución de los reactivos, y el volumen es ajustado a 1000 mL. La solución es guardada en frascos opacos y permanece en heladera a 4°C hasta su utilización.

2- Solución de trabajo de acrilamida-bisacrilamida 6%-urea

solución de acrilamida-bisacrilamida al 40 %	75 mL
--	-------

TBE 10x	50 mL
urea	230 g
Agua destilada hasta completar	500 mL

Esta solución es filtrada a través de filtros de nitrocelulosa con poros de 0.45 μ M y almacenada en frascos opacos en heladera a 4°C hasta su utilización.

Exposición y revelado

Una vez finalizada la electroforesis, el gel fue montado sobre una hoja de papel Whatman y, cubierto con un protector plástico, fue deshidratado en un desecador de geles durante 30 minutos a 80°C. Una vez seco, el gel permanece adherido al papel y el protector plástico es retirado. La exposición del gel es preparada en un cuarto oscuro: el conjunto papel-gel es montado en un chasis y sobre la superficie del gel se coloca una placa virgen para rayos X (AGFA Curix 100 Nif). El chasis es aplastado bajo un peso uniforme y la exposición se prolonga durante 48 a 96 hs a temperatura ambiente, tras la cual la placa es revelada mediante inmersión en revelador para placas AGFA durante 5 minutos y fijada por otros 5 minutos en fijador Ronfix.

5.2- Resultados y Discusión

La tipificación inicial mediante un protocolo de baja resolución permitió asignar 427 de los 439 individuos (97%) estudiados a alguno de los cuatro haplogrupos A-D (Tabla 7). Los restantes 12 individuos, provenientes de tres poblaciones, fueron analizados mediante una combinación de **RCP-PLFR** y secuenciación que permitió asignarlos al haplogrupo nativo X y a otros cuatro haplogrupos alóctonos (Tabla 8).

Los tres Navajo y seis de los ocho Sioux/Chippewa non-ABCD compartieron los marcadores **-10394c**, **-10397a**, **-1715c** y **+EcoRV 16274**, siendo por lo tanto asignables al haplogrupo X. Los restantes dos Sioux/Chippewa fueron analizados para **-7025a**, pero ninguno fue portador de este marcador que define al haplogrupo H.

El hallazgo de individuos non-ABCD/non-X en nuestra muestra de nativos americanos permitió inferir la presencia de linajes alóctonos, cuyos orígenes étnico-geográficos fueron establecidos mediante secuenciación y análisis de la Región Hipervariable I, en combinación con la búsqueda de **PLFR** haplogrupo-específicos. Esta estrategia fue preferida a la empleada por Bravi y col. (1997) y Martínez-Marignac y col. (1999), ya que un estudio exhaustivo de numerosos marcadores mitocondriales basados en **PLFR** podría haber agotado la existencia de ADN sin necesariamente otorgar resultados concluyentes. Una vez obtenidas y analizadas las secuencias, en la mayoría de los casos se confirmaron las asignaciones a haplogrupos mediante ensayos de restricción de sitios específicos. Este enfoque fue aplicado a los dos Sioux/Chippewa non-ABCDX y a un Tehuelche non-ABCD de este estudio, así como a uno de los seis Mapuches non-ABCD informados en Bailliet y col. 1994 (Tabla 8).

La muestra Sioux-49 tuvo el haplotipo 126-294-296-324 para la RHV-I⁹. La presencia de 126 y 294 permiten asignarla al haplogrupo T (Torroni y col. 1996), y la de 324 refinar la asignación al sub-haplogrupo T4 (Richards y col. 2000). La asignación a T fue confirmada mediante la búsqueda del sitio de reconocimiento para *Bam*HI en posición 13366. Secuencias idénticas a ésta han sido informadas en italianos de Sicilia y Toscana, alemanes, daneses, karelios, bosnios, vascos, turcos, judíos ashkenazi de Checoslovaquia y palestinos (Sajantila y col. 1995, Richards y col. 1996, Corte-Real y col. 1996, Comas y col. 1996, Francalacci y col. 1996, Richards y col. 2000, Cali y col. 2001, Forster y col.

⁹ El haplotipo para la RHV-I se indica como una combinación de cambios respecto de la SRC, cuyas posiciones sufren la sustracción de "16.000". Las mutaciones son transiciones a menos que un sufijo indique una transversión (A, G, C, T) o una deleción (D).

Tabla 7. Distribución de haplogrupos en 11 poblaciones americanas basada en el estudio de los marcadores mitocondriales para los haplogrupos A-D.

Población	Origen	N	Haplogrupos				
			A	B	C	D	Otros
Navajo	E.U.A.	40	32	5	0	0	3
Sioux/Chippewa	E.U.A.	40	19	2	8	3	8
Zuñi	E.U.A.	41	2	30	8	1	0
Maya	México	48	29	7	8	4	0
Chimila	Colombia	30	28	1	0	1	0
Ayoreo	Paraguay	46	0	0	43	3	0
Lengua	Paraguay	37	6	11	7	13	0
Chorote	Argentina	21	3	8	6	4	0
Mocoví	Argentina	64	28	12	0	24	0
Jujuy	Argentina	41	6	26	6	3	0
Tehuelche	Argentina	31	0	7	6	17	1
	TOTAL	439	153	109	92	73	12

En la columna N se indica el número total de individuos estudiados para cada población; en las columnas A-D se lista el número de individuos asignado a cada uno de los haplogrupos, en la columna **Otros** se indican aquellos que no fueron asignados a los haplogrupos A-D.

2002, Malyarchuk y col. 2003, Behar y col. 2004). Aunque de distribución eminentemente eurasiática-occidental, este linaje también tendría cierta presencia en África del Norte, donde ha sido informado en uno de 48 egipcios (mtDNA Population Database¹⁰).

El Sioux-45 tuvo la combinación 183del-189-249-294 para la RHV-I. La coexistencia de 189 y 249 en un contexto -10394c/-10397a/+7025a, y la ausencia de posiciones diagnósticas para otros haplogrupos, permite asignar este individuo al sub-haplogrupo U1a (Richards y col. 2000). Aunque no fue posible detectar en la literatura una secuencia idéntica a la aquí informada, otras afines del grupo U1a están representadas en poblaciones sirias, palestinas, drusas, turcas, georgianas, kurdas, armenias, y otras del Cáucaso. Aunque también presente en algunos europeos circun-mediterráneos (italianos,

¹⁰ Monson y col. 2002, <http://www.fbi.gov/hq/lab/fsc/backissu/april2002/mtDNA.exe>

Tabla 8. Haplogrupos y marcadores mitocondriales analizados en 13 nativos americanos non-ABCD

Individuo	Grupo ¹	Marcadores PLFR haplogrupo-específicos							Secuencias de la RHV-I ²	
		10394c	10397a	1715c	EcoRV 16274	7025a	13366m	3592h	Haplotipo	Rango
Navajo-9	X	-	-	-	+	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
Navajo-16	X	-	-	-	+	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
Navajo-41	X	-	-	-	+	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
Sioux-39	X	-	-	-	+	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
Sioux-50	X	-	-	-	+	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
Sioux-61	X	-	-	-	+	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
Sioux-65	X	-	-	-	+	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
Sioux-67	X	-	-	-	+	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
Sioux-74	X	-	-	-	+	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
Sioux-45	T4	-	-	+	n.a.	+	+	n.a.	126 294 296 324	038-370
Sioux-49	U1a	-	-	+	n.a.	+	n.a.	n.a.	183D 189 249 294	038-370
Tehuelche-7	H	-	-	+	n.a.	-	n.a.	n.a.	SRC	038-370
Mapuche-1	L2a1	+	-	+	n.a.	+	n.a.	+	189 223 278 294 309	038-370

(1)- Los linajes fueron asignados al grupo monofilético menos inclusivo que pudo ser reconocido en base a los marcadores analizados;

(2)- Las posiciones se indican restando “16.000”; n.a., no analizado.

griegos y albaneses), U1a es muy poco frecuente o inexistente en Escandinavia, la península ibérica y el resto del centro, norte y este de Europa (Richards y col. 2000).

La secuencia de la RHV-I del individuo Tehuelche-7 resultó indistinguible de la Secuencia de Referencia. Con una frecuencia de 0,124, este haplotipo es el más abundante en poblaciones de Europa y Asia Occidental (Richards y col. 2000), donde aparece asociado a los grupos H, HV, pre-HV, U y R*, aunque más del 96% de las secuencias corresponden al haplogrupo H. Una asignación a H fue confirmada tras analizar el marcador **-7025a**.

El individuo Mapuche-1, informado como non-ABCD en Bailliet y col. (1994), tuvo la combinación 189-223-278-294-309, que permite asignarlo al haplogrupo L2a1 (Salas y col. 2002). La asignación al para-haplogrupo L fue confirmada mediante la búsqueda del polimorfismo **+3592h** (Tabla 8). Secuencias RHV-I idénticas a la determinada para el Mapuche-1 tienen una amplia distribución en África, habiéndoselas descrito entre los Wolof y Manyake de Senegal (Rando y col. 1998), los Makonde y Sena de Mozambique (Salas y col. 2002), los Ewondo de Camerún (Destro-Bisol y col. 2004), los Yoruba, Hausa y Tuareg del noroeste africano (Watson y col. 1997), así como en Mauritania, Nubia y Cabo Verde (Rando y col. 1998, Krings y col. 1999, Brehm y col. 2002). También están presentes en poblaciones afro-americanas de República Dominicana (Torróni y col. 2001) y E.U.A. (mtDNA Population Database⁹).

La distribución de linajes non-ABCD en las poblaciones estudiadas es notablemente distinta cuando son analizados según sub-continente de origen: mientras que encontramos 11 individuos (9%) entre los 121 provenientes de las tres poblaciones norteamericanas, sólo hay uno (0,4%) entre los 270 nativos sudamericanos. Esta distribución es reflejo de dos fenómenos concurrentes: la existencia de un quinto haplogrupo autóctono restringido a poblaciones norteamericanas (que explica el 75% de los linajes non-ABCD hallados en este trabajo), y una historia de mezcla con poblaciones alóctonas menos pronunciada en el sur que en el norte del continente. Los tres Navajo, y seis de los ocho Sioux/Chippewa non-ABCD fueron atribuidos al haplogrupo X, mientras que los restantes Sioux/Chippewa resultaron portadores de linajes de origen “caucasoide”. El único nativo sudamericano non-ABCD encontrado en este estudio fue un Tehuelche, portador tanto de la secuencia RHV-I cuanto del haplogrupo más frecuentes en Europa.

El estudio de alta resolución de uno de los seis Mapuches, que resultara non-ABCD en un trabajo previo (Bailliet y col. 1994), permitió asignarlo al haplogrupo L2a1, constituyendo el primer caso de linaje mitocondrial africano informado en poblaciones

indígenas argentinas. Aunque inesperado, este hallazgo es congruente con la información disponible para otros marcadores moleculares estudiados en las mismas poblaciones de las que proviene el individuo aquí analizado. En un estudio de mezcla interétnica basado en 20 loci, Goicoechea y col. (2001) estimaron que los Mapuche de Río Negro presentaban un $18\pm 6\%$ de mezcla alóctona, el valor más alto en las cinco poblaciones estudiadas (las demás fueron Mataco, Toba, Chorotí y Tehuelche). Además, sólo los Mapuche presentaron evidencia de mezcla con africanos, estimada en un $7\pm 4\%$. Otros estudios, como el de los haplotipos del cromosoma Y (Bianchi y col. 1997) y los de la β -globina (Kaufman y col. 1998), han puesto en evidencia la existencia de introgresión de origen africano entre los Mapuche.

5.2.1- Origen de la introgresión europea y africana mediada por mujeres en Patagonia.

Hasta la década que se inicia en 1870, la presencia de población no-indígena en el actual territorio patagónico argentino estaba restringida al extremo norte y a una franja adyacente al litoral marítimo de esa región. El poblado de Carmen de Patagones, actual límite sur de la provincia de Buenos Aires, constituía por entonces el límite austral de la presencia del Estado argentino, con la excepción de un puesto de la Marina de Guerra en la boca del río Santa Cruz. Por último, una colonia de inmigrantes galeses en el actual territorio de Chubut constituía el único enclave no-indígena y puramente europeo en toda la Patagonia argentina.

La presencia de linajes maternos europeos y africanos en poblaciones nativas de Patagonia podría ser consecuencia del ingreso reciente, a lo largo del siglo XX, de mujeres provenientes de la población mestiza y/o europea de la zona. Sin embargo, la información histórica disponible nos permite proponer que este mestizaje habría ocurrido principalmente a lo largo de los dos siglos previos. Durante gran parte de los siglos XVIII y XIX, varios grupos araucanos, “pampas” y otros araucanizados de Pampa y Patagonia asolaron los poblados cercanos a la móvil frontera que separaba la “Civilización” del “Desierto” en raids destinados a obtener ganado, mujeres y niños. Las mujeres eran incorporadas laboral y reproductivamente a las poblaciones amén de, en muchos casos, constituirse en bienes de trueque a favor de réditos políticos y económicos en las negociaciones con representantes de la sociedad hispano-criolla (Rotker 1999).

La mayoría de las mujeres incorporadas por la fuerza en las poblaciones nativas habrían sido las esposas e hijas de gauchos, peones y soldados de pueblos, puestos, fortines y estancias fronterizas, poblaciones mestizas en las que el componente europeo seguramente no era mayor que el africano y el indígena. Refiriéndose transitivamente al origen “étnico” al describir el color de la piel de las fortineras que acompañaban a los soldados, Ebelot (1968) señala que “*estaban representados todos los matices, excepto el blanco. La escala de tonos empezaba en el agamuzado claro y terminaba en el chocolate*”. El mismo autor, ingeniero francés encargado de construir la Zanja de Alsina, ofrece otro comentario cargado de interpretación al señalar que las fortineras poseían “... *espesas cabelleras negras, semejantes a colas de caballo, lacias o rizadas, según que la propietaria tenga sangre india o sangre negra en las venas*” (Ebelot 1943).

Aunque es imposible establecer que fracción del total representaron los cautivos en las poblaciones indígenas, su número absoluto no fue menor. Tras una campaña militar de 13 meses, Juan Manuel de Rosas liberó 1.000 cautivos en 1834, y Lucio V. Mansilla, en *Una excursión a los Indios Ranqueles*, señala la existencia de entre 600 y 800 cautivos sólo en esa parcialidad, entre los cuales también identifica a varios líderes como mestizos, hijos de madres cautivas. Tras un ataque contra el grupo de Yanquetruz en 1833, el General Aldao recuperó una cautiva por cada tres mujeres, ancianos y niños indígenas apresados (citas varias en Rotker 1999). Estas y otras fuentes documentales permiten asegurar que, aunque difícil de cuantificar, el ingreso de mujeres no-aborígenes en las poblaciones indígenas pampeanas y nor-patagónicas habría sido demográficamente importante.

En resumen, la existencia de linajes mitocondriales non-ABCD/non-X ha sido documentada en varias poblaciones de Norte-, Centro- y Sud-América. Cuando estos linajes han sido analizados mediante secuenciación de la RHV-I y/o tipificación de marcadores haplogrupo-específicos, han podido ser atribuidos a haplotipos y haplogrupos comunes en poblaciones actuales de Eurasia Occidental y África (por ejemplo Horai y col. 1993, Smith y col. 1999, Rodríguez Delfin y col. 2001). La presencia de linajes non-ABCD/non-X en poblaciones nativas es entonces compatible con el flujo génico desde las poblaciones inmigrantes y/o criollas hacia las aborígenes. Aunque este flujo habría estado mediado principalmente por el ingreso de varones (Bianchi y col. 1997), los artículos antes citados y el presente trabajo documentan el ingreso, reproductivamente exitoso, de mujeres no-indígenas en las poblaciones nativas.

Diversidad de haplotipos fundadores para el haplogrupo D en América

Siendo el ADNmt una molécula de herencia uniparental que acumula sucesivas mutaciones a lo largo de linajes maternos segregantes, es dable inferir la existencia de múltiples ancestros comunes de diferente rango en una genealogía. En un extremo, todos los hijos de una mujer comparten el ADNmt que heredaron de su madre, también presente en su abuela y tíos maternos, así como en los hijos de sus tías maternas. En otro extremo, merced a la ausencia de recombinación, todos los seres humanos somos parte de una única genealogía mitocondrial que coalesce en el ancestro común más reciente, denominado usualmente “Eva” mitocondrial. Y entre ambos extremos es posible inferir la existencia de una jerarquía de ancestros comunes definibles por la más temprana ocurrencia de determinada mutación. De este modo, cada súper-haplogrupo, haplogrupo y sub-haplogrupo reúne en su interior a todos los descendientes por vía materna de ciertas mujeres en las que las mutaciones que definen cada clado ocurrieron por primera vez. Así, por ejemplo, todos los individuos asignables al súper-haplogrupo M están ligados por co-ancestría a una mujer en la que la transición en la posición 10400 ocurrió por primera vez. Y todos aquellos atribuibles al haplogrupo D, parte del súper-haplogrupo M, descienden de aquella en la que se estableció la mutación 5178*A.

¿Cuántos ancestros comunes más recientes se pueden postular para cada haplogrupo entre los linajes maternos encontrados en nativos americanos? O, dicho de otro modo, ¿a partir de cuántos haplotipos fundadores es posible inferir que se produjo la radiación de linajes mitocondriales observables en América? ¿Cuál es la definición molecular de los linajes cuya divergencia ocurrió previamente a la colonización de América, ya en Asia o en tránsito hacia el Nuevo Mundo?

La respuesta a la segunda de estas preguntas ha oscilado entre cuatro (Torroni y col. 1993b), cinco (Torroni y col. 1992), nueve (Merriwether y Ferrell 1996), diez (Easton y col. 1996) y no menos de trece (Bailliet y col. 1994, Bianchi y col. 1995) haplotipos fundadores para poblaciones amerindias y na-dené. Sin embargo, la mayoría de las definiciones moleculares de haplotipos fundadores provistas en los trabajos recién

mencionados han demostrado carecer de la resolución apropiada, ser incompletas o erróneas, o bien confundir linajes fundadores con otros autóctonos, revertientes o derivados (ver apartados 4.3.1, 4.4, 4.5 y 5.2 en esta Tesis; Bandelt y col. 2003).

En esta sección se discutirá el número y definición molecular de los haplotipos fundadores para el haplogrupo D presentes en poblaciones indígenas del continente americano, tanto en base a una revisión de la información disponible como de nueva evidencia experimental obtenida en el marco de esta tesis.

6.1- Antecedentes

Como fuera señalado en el apartado 4.1, Douglas Wallace y su grupo analizaron el ADNmt de 379 individuos pertenecientes a 18 poblaciones nativas mediante un protocolo de **RCP-PLFR** de alta resolución (Torrioni y col. 1992, 1993b). En base a sus resultados propusieron que los linajes mitocondriales autóctonos presentes en amerindios y na-denés podían reunirse en cuatro grupos monofiléticos, los haplogrupos A-D. Postularon además que la mayor parte de la diversidad observada era indígena del continente, ya que cada haplogrupo habría estado representado por un único haplotipo fundador en las poblaciones colonizantes.

En otro trabajo del mismo grupo, Jun y col. (1994) informaron la detección de una mutación patogénica en el ADN mitocondrial. Una sustitución en la posición 14459 de la subunidad 6 de la NADH deshidrogenasa co-segregaba con los síntomas de la neuropatía óptica hereditaria de Leber y distonía en una familia “hispana”. Una etiología mitocondrial para esta patología había sido inicialmente postulada por Novotny y col. (1986) en base a la transmisión de los síntomas clínicos en esta familia, donde estaban afectados 22 de los 79 miembros, distribuidos a lo largo de cinco generaciones. Un análisis mediante **RCP-PLFR** del total del ADNmt siguiendo el protocolo de Torrioni y col. (1993a,b), y la secuenciación de aproximadamente el 90% del ADN mitocondrial de un miembro afectado, pusieron en evidencia que ese linaje pertenecía al haplogrupo D, y que difería en 40 posiciones respecto de la secuencia Cambridge¹¹. Treinta y cinco de las variantes observadas fueron sustituciones silenciosas en genes codificantes para proteínas, o polimorfismos relativamente frecuentes, o errores en la secuencia de referencia (Andrews y col. 1999). Las cinco mutaciones restantes, siendo potencialmente responsables de la etiología observada,

¹¹ Una obvia versión completa y corregida –aunque no adecuadamente referida– del linaje mitocondrial de esta familia fue informada como secuencia D^{ca} en la figura 4 de Derbeneva y col. (2002b).

fueron analizadas en mas detalle. Una de ellas tiene relevancia para nuestros estudios, ya que fue hallada exclusivamente, y con alta frecuencia, en nativos americanos. La sustitución C→T en la posición 2092 estuvo presente en 35 de los 37 nativos americanos pertenecientes al haplogrupo D utilizados como controles sanos. Este hallazgo contradice la interpretación de Torroni y col. (1993b) respecto del número de haplotipos fundadores para el haplogrupo D, ya que mientras que en este último trabajo se propone la existencia de un único fundador, en el de Jun y col. (1994) queda en evidencia la existencia de por lo menos dos grupos de linajes: un grupo monofilético mayoritario, definido por la presencia de la sustitución 2092*T, y un grupo de linajes menos frecuente, con el estado ancestral C para aquella posición.

Una confirmación de la heterogeneidad de haplotipos fundadores para el haplogrupo D fue provista por Forster y col. (1996), quienes compararon 472 secuencias de la RHV-I publicadas para nativos americanos con otras 309 provenientes de asiáticos. En su análisis filogeográfico, los autores detectaron dos secuencias fundadoras para D, con frecuencias y distribuciones muy dispares: D1, definida por la combinación 223-325-362, estuvo presente en 62 amerindios de Norte, Centro y Sud América así como también en dos individuos nadené; y D2, con el motivo 129-223-271-362, estuvo restringida a un único apache. Notablemente, secuencias atribuibles a D2 pero no a D1 fueron detectadas en Asia, entre los esquimales siberianos (Shields y col. 1993).

Un tercer haplotipo fundador estaba presente entre los individuos analizados por Forster y col. (1996), pero en ausencia de toda información que no fuera la propia secuencia RHV-I, los autores atribuyeron preliminarmente esos linajes al haplogrupo A. En efecto, la combinación 093-173-223-319-362 había sido descripta en esquimales de ambos continentes (Shields y col. 1993, Voevoda y col. 1994), y su asociación con el haplogrupo D fue posteriormente informada en otras poblaciones siberianas y centro-asiáticas por Starikovskaya y col. (1998), Schurr y col. (1999) y Bermisheva y col. (2002). Esta tercer variante fue denominada D3 por Saillard y col. (2000).

Un cuarto grupo de secuencias muy divergentes reúne a los así llamados linajes “Cayapa” (Rickards y col. 1999, ver apartado 4.3.2), derivados de la secuencia consenso 223-241-301-342-362. Alves-Silva y col. (2000) postularon la posibilidad de que este grupo derivase de una secuencia que, habiendo sufrido una reversión en la posición 325, perteneciera al nodo D1.

Tabla 9. Haplotipos nodales para el haplogrupo D en nativos americanos, su *status* como fundador, y correlación con variantes para la posición 2092.

Haplotipo	status	RHV-I ¹	2092
D1	fundador	223 325 362	T
D2	fundador	129 223 271 362	C
D3	fundador	93 173 223 319 362	C
"Cayapa"	desconocido	223 241 301 342 362	?

(1) las posiciones se indican restando "16.000"

La publicación de secuencias mitocondriales completas (ver Tablas 1 y A1¹²) permite establecer el desequilibrio de ligamiento entre las variantes alélicas para la posición 2092 en los tres linajes fundadores reconocibles para D en América: la forma derivada 2092*T es hallada en los linajes D1 (Ingman y col. 2000, Derbeneva y col. 2002b) mientras que el alelo ancestral 2092*C está presente en todas las demás secuencias D conocidas, incluyendo aquellas atribuibles a D2 (Ingman y col. 2000, Derbeneva y col. 2002b), y en una filogenéticamente afin a D3 (Ozawa y col. 1991b).

En la Tabla 9 se presenta un resumen de la información discutida en esta sección: las definiciones, en base a variantes de la RHV-I, de las secuencias fundadoras conocidas para el haplogrupo D, así como su correlación con las variantes C/T en la posición 2092. También se incluye el linaje "Cayapa", cuyo *status* como fundador es desconocido y para el que tampoco existe información para la posición 2092.

6.2- Enfoque experimental

Como ya fue explicado en 6.1, en América es posible distinguir al menos tres grupos de linajes D que habrían ingresado al continente tras haberse diferenciado en el Viejo Mundo. También se ha demostrado la utilidad de la transición C/T en la posición 2092 para distinguir el sub-haplogrupo D1 -la forma mas abundante del haplogrupo D- de los grupos D2 y D3, que presentan una distribución étnico-geográfica mas restringida. Con el objetivo de contribuir al conocimiento de la distribución continental de las diferentes variantes del haplogrupo D, decidí analizar el polimorfismo en la posición 2092 y su

¹² Las tablas Ax corresponden al Anexo.

relación con los haplotipos detectables en la RHV-I en individuos asignados al haplogrupo D disponibles en el Banco de Muestras Biológicas del IMBICE. Los resultados obtenidos fueron incluidos en un análisis filogeográfico global basado en la recopilación de >15.000 secuencias HVR-I de poblaciones americanas y asiáticas.

6.3- Materiales y Métodos

6.3.1- Poblaciones analizadas para la posición 2092

Para el análisis del polimorfismo de la posición 2092 se utilizaron todas las muestras de ADN de nativos americanos, pertenecientes al haplogrupo D, que se hallaban disponibles en el Banco de Muestras Biológicas del IMBICE. Sobre un total de 652 individuos pertenecientes a 17 poblaciones que fueron tipificados para los haplogrupos mitocondriales A-D (Tabla 10), 139 habían sido atribuidos al haplogrupo D siguiendo los protocolos descritos en el apartado 5.1.4. Un 81% (N=113) de los individuos caracterizados como D pudieron ser tipificados para la posición 2092, mientras que el 19% restante (N=26) no pudo ser analizado porque las muestras de ADN se hallaban agotadas, o bien porque las amplificaciones no fueron exitosas.

Las poblaciones analizadas son las ya descritas en 5.1.2, a las que se agregaron algunas previamente publicadas, a saber:

- las muestras de las poblaciones Mapuche y Huilliche son las descritas en Bailliet y col. (1994), mientras que las poblaciones Wichí, Toba y Chorote fueron analizadas en Bianchi y col. (1995), aunque para este trabajo se ha aumentado el número de individuos estudiados;
- los individuos que componen la población jujeña corresponden a los 41 descritos en el apartado 5.1.2 de esta tesis, mas otros 24 provistos por el Dr. José Dipierri y la Lic. Emma Alfaro (Dipierri y col. 1998);
- las muestras de las poblaciones Suruí y Karitiana fueron cedidas por el Dr. Cavalli-Sforza (Stanford University, Estados Unidos de América) al Dr. Sergio Pena (Univerdidade Federal de Minas Gerais, Brasil), quien las donó al IMBICE (Pena y col. 1995).

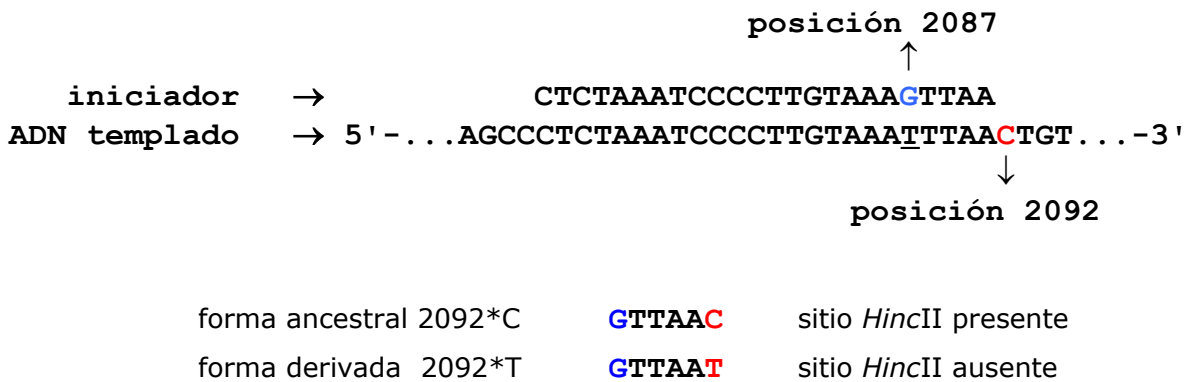
6.3.2- Tipificación de la mutación C→T 2092

La genotipificación para la posición 2092 se realizó mediante un ensayo de **RCP-PLFR**. Dado que la mutación de interés no crea ni destruye un sitio de reconocimiento

enzimático, fue necesario introducir artificialmente uno durante el proceso de amplificación mediante la **RCP**.

Para ello se diseñó un iniciador 5' con una base no complementaria en la posición 2087, de modo que la presencia de un residuo G en vez del correspondiente T permitiera la creación de un sitio de reconocimiento *HincII* o *HpaI* en dicha posición, en presencia del alelo 2092*C (Figura 7).

Figura 7. Diseño del iniciador MiL-2069/mismatch. La secuencia ubicada entre los símbolos "5'" y "-3'" corresponde a la de la cadena liviana del ADN mitocondrial humano (Anderson y col. 1981) alrededor de la zona de interés. Nótese el reemplazo del nucleótido **T** en la posición 2087 del templado por **G** en el iniciador.



Amplificación del fragmento de interés.

Para obtener un fragmento que pudiera ser analizado mediante digestión enzimática se utilizaron dos protocolos diferentes: la *amplificación directa* bastó cuando se emplearon muestras de ADN de buena calidad, mientras que se diseñó un protocolo de *amplificación semi-anidada* para tratar aquellas muestras que, por su concentración o calidad del ADN, se mostraron refractarias ante el procedimiento de amplificación directa.

Amplificación directa.

Para este procedimiento se utilizaron los iniciadores MiL-2069/mism (5'-CTCTAAATCCCCTTGTAAGTTAA-3') y MiH-2583 (5'-GTTAGGGTACCGCGGCCGTTA-3'). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen de 25 µl, con las concentraciones de reactivos y ADN especificadas previamente (ver 5.1.4). En cada ronda de amplificación se incluyeron un control negativo (mezcla de RCP sin agregado de

ADN) y uno o más controles positivos (mezcla de RCP con ADN de individuos de origen europeo o amerindio, portadores de linajes non-D).

Las mezclas de reacción fueron sometidas a 40 ciclos de amplificación, consistiendo cada ciclo de una etapa de desnaturalización a 94°C durante un minuto, seguida de una de hibridación a 55°C durante un minuto y finalmente otra de extensión a 72°C durante un minuto. Un período inicial de desnaturalización de 4 minutos a 94°C precedió al ciclado, mientras que una extensión final a 72°C durante 4 minutos completó el proceso de amplificación. La verificación del éxito de la reacción se realizó tal como se describe en 5.1.4.

Amplificación semi-anidada.

El método descrito en el apartado precedente permitió la amplificación del fragmento a digerir, en una única ronda de RCP, en un total de 74 muestras. Las restantes muestras de ADN fueron sometidas a un proceso de amplificación semi-anidado. Algunas de estas muestras habían fallado por lo menos dos veces cuando se intentó amplificarlas mediante el sistema directo, mientras que otras eran muestras de mala calidad y/o baja concentración. El método semi-anidado consiste en someter una muestra de ADN a una doble ronda de RCP. En la primera reacción se obtiene un fragmento de mayor tamaño que el fragmento de interés, que se halla incluido en aquél. Y este fragmento mayor es a su vez utilizado como templado para la segunda RCP, en la que se amplifica el fragmento de interés.

La primera amplificación se realizó utilizando los iniciadores MiL-1549 (5'-GAGGAGACAAGTCGTAACATGG -3') y MiH-2583 en un volumen final de 10 µl, con las concentraciones usuales de reactivos. El ciclado aplicado fue similar al descrito para la amplificación directa, con la excepción de que el número total de ciclos fue disminuido a 30 y el período de hibridación se prolongó durante dos minutos a 60°C. La segunda RCP se realizó tal como fue descrita para la amplificación directa, utilizando 0.5-1.5 µl del producto de la primera reacción como templado y disminuyendo el número de ciclos a 30. Como controles de contaminación, también fueron sometidos a la segunda RCP los controles negativos de la primera.

Digestión y electroforesis.

Con el objetivo de lograr fragmentos polimórficos cuyo tamaño pudiera resolverse en geles de agarosa, el amplicón fue digerido simultáneamente con *HincII* y *HaeIII*. 15 µl

del producto de amplificación fueron llevados a 25 µl finales con 3-5 unidades de cada enzima, agua, y la solución tampón # 2 recomendada por el proveedor (New England Biolabs). Las mezclas de digestión permanecieron en estufa a 37°C durante 4-12 hs.

Los fragmentos obtenidos fueron separados mediante electroforesis de una alícuota de 20 µl de la mezcla de digestión en un gel mixto de agarosa común 2% y Nu Sieve 1%, en condiciones similares a las ya descritas (véase 5.1.4). La co-digestión del amplicón utilizando *HincII* y *HaeIII* resultó en tres fragmentos constantes de 248, 146 y 16 pares de bases; y uno (104 pb) o dos fragmentos (86 y 18 pb) según el genotipo fuera T o C para la posición 2092, respectivamente.

La asignación de genotipos se realizó mediante la comparación de patrones de digestión. Dado que el genotipo 2092*T sólo ha sido hallado en Nativos americanos del haplogrupo D (Jun y col., 1994), en cada gel se incluyó por lo menos un control positivo digerido. Los controles positivos fueron amplificados a partir de ADN de origen europeo o nativos americanos no pertenecientes al haplogrupo D. El patrón de digestión de estas muestras fue considerado el del genotipo 2092*C. Los geles fueron examinados bajo radiación ultravioleta en un transiluminador y documentados fotográficamente.

6.3.3- Secuenciación de la Región Hipervariable I

La RHV-I fue secuenciada manualmente entre las posiciones 16038 y 16370 en 26 individuos, tal como fuera descrito en 5.1.4. Se obtuvieron las secuencias de la RHV-I en todos los individuos con genotipo 2092*C (un Huilliche, cinco Lengua y ocho Tehuelches), y en otros doce portadores de la forma derivada 2092*T. Estos fueron seleccionados siguiendo dos criterios: la pertenencia a una población en la que se hubiera detectado el genotipo 2092*C (dos Tehuelches y cinco Lengua), o bien a poblaciones étnica/geográficamente diversas. En este último grupo se incluyeron muestras de América del Norte (un Sioux), América Central (un Maya) y América del Sur (un Chimila, un Wichí y un Toba).

6.3.4- Análisis filogeográfico de los linajes “Cayapa”

Compilación de secuencias RHV-I de origen asiático y americano.

Se recopilaron las secuencias de la RHV-I disponibles para nativos americanos, poblaciones del centro, este y sudeste asiático, Siberia y el Pacífico, tanto publicadas como

inéditas -pero disponibles en bancos de datos como GenBank- (Tablas A2-A4). También se incluyeron en esta compilación secuencias de origen americano presentes en poblaciones criollas, mestizas, “hispanas” y afroamericanas.

Identificación de haplotipos “Cayapa” y linajes relacionados.

Fueron identificados como linajes “Cayapa” aquellas secuencias RHV-I derivables de la combinación 223-241-301-342-362. En la búsqueda de linajes asiáticos filogenéticamente emparentados con los “Cayapa”, se analizaron diferentes combinaciones del haplotipo nodal para el haplogrupo D (223-362) con al menos una o dos de las otras tres mutaciones que aparecen en el haplotipo Cayapa (241, 301, 342).

La probable presencia de linajes “Cayapa” también fue analizada entre los nativos americanos estudiados mediante el método de RCP-PLFR por el grupo de D. Wallace (Torrioni y col. 1992, 1993b, 1994b, 1994c; Huoponen y col. 1997), aprovechando que la transición 16241 es constante en los linajes Cayapa hasta ahora identificados en América, y que ésta crea un sitio de reconocimiento para *AluI* entre otros dos ubicados en las posiciones 15994 y 16476 de la SRC. La presencia de nuevo sitio *AluI* en 16240 divide un fragmento de 482 pb en otros de 237+245 pb, un cambio fácil de notar mediante el ensayo de RCP-PLFR con 14 enzimas aplicado por Wallace y colaboradores.

Construcción de redes de haplotipos.

Las secuencias identificadas en la literatura y las obtenidas en esta Tesis fueron empleadas en la construcción de una red de haplotipos utilizando el algoritmo MJ en el programa “NETWORK” versión 4.1.0 (copyright Fluxus Technology Ltd., http://www.fluxus-technology.com/share_net.htm). Tras una inspección ocular de los resultados iniciales obtenidos, la matriz de datos fue modificada de modo tal que las reversiones de la posición 301 fueron consideradas como tres mutaciones independientes, para facilitar la lectura de la red de haplotipos resultante.

6.4- Resultados y Discusión

6.4.1- Distribución de variantes para la posición 2092

Sobre un total de 652 individuos pertenecientes a 17 poblaciones y tipificados para los haplogrupos mitocondriales A-D (Tabla 10), 139 habían sido atribuidos al haplogrupo D siguiendo los protocolos descritos en el apartado 5.1.4 u otros similares (Bailliet y col.

1994, Bianchi y col. 1995, Pena y col. 1995). Un 81% (N=113) de los individuos caracterizados como D pudieron ser tipificados para la posición 2092, mientras que el 19% restante (N=26) no pudo ser analizado porque las muestras de ADN se hallaban agotadas, o bien porque las amplificaciones no fueron exitosas pese a la realización de repetidos intentos de amplificación directa y semi-anidada.

Todas las poblaciones analizadas, con la excepción de los Navajo, fueron portadoras de linajes del haplogrupo D. El genotipo derivado 2092*T estuvo presente en noventa y nueve (88%) de los ciento trece individuos analizados, y fue el único en catorce de las dieciséis poblaciones (Tabla 10). Fue, además, el más frecuente en las tres poblaciones restantes. La forma 2092*C sólo fue hallada en uno de trece Huilliches de Chile, ocho de diecisiete Tehuelches de Argentina y cinco de trece Lengua de Paraguay. Cuando expresadas respecto de número total de individuos analizados para cada población, las frecuencias de 2092*C fueron de 0.0263, 0.2581 y 0.1351, respectivamente. Estos resultados son similares a los descritos por Jun y col. (1994), quienes encuentran la forma derivada 2092*T en treinta y cinco de los treinta y siete individuos del haplogrupo D analizados. Lamentablemente, los resultados no son directamente comparables ya que estos autores no informan la procedencia étnica de las muestras analizadas.

6.4.2- Correlación entre RHV-I y polimorfismos para la posición 2092.

En la Tabla 11 se muestran las secuencias obtenidas para la RHV-I en 26 nativos americanos, y su relación con el polimorfismo para la posición 2092. Las secuencias fueron reunidas en tres grupos según sus afinidades filogenéticas. El grupo 1 reúne las catorce secuencias obtenidas a partir de los únicos individuos que resultaron atribuidos a 2092*C en el presente trabajo (Tabla 10), mientras que los otros dos grupos, portadores del alelo 2092*T, están conformados por ocho y cuatro secuencias cada uno.

Tabla 10- Individuos analizados para el polimorfismo de la posición 2092.

Población	Origen	N ¹	ND ²	posición 2092		
				Nexper ³	2092*T	2092*C
Huilliche	Chile	38	18	13	12	1
Mapuche	Argentina	63	16	13	13	0
Tehuelche	Argentina	31	17	17	9	8

Jujeños	Argentina	65	4	3	3	0
Wichí	Argentina	74	21	12	12	0
Chorote	Argentina	21	4	4	4	0
Toba	Argentina	9	5	5	5	0
Mocoví	Argentina	64	24	16	16	0
Ayoreo	Paraguay	46	3	3	3	0
Lengua	Paraguay	37	13	13	8	5
Karitiana	Brasil	2	2	2	2	0
Suruí	Brasil	3	3	3	3	0
Chimila	Colombia	30	1	1	1	0
Maya	México	48	4	4	4	0
Zuñi	E.U.A.	41	1	1	1	0
Sioux	E.U.A.	40	3	3	3	0
Navajo	E.U.A.	40	0	0	0	0
TOTALES		652	139	113	99	14

(1) **N**, total de individuos tipificados para los haplogrupos mitocondriales en cada población; (2) **ND**, total de individuos asignados al haplogrupo D en cada población; (3) **Nexper**, total de individuos del haplogrupo D tipificados para la posición 2092.

Las secuencias del grupo 1 comparten un haplotipo consenso idéntico al presente en el único Huilliche secuenciado (secuencia #1, Tabla 11), que no es otro que el inferido como nodal para los linajes “Cayapa” (223-241-301-342-362). Dos secuencias distintas fueron obtenidas en cada una de las poblaciones restantes. Las presentes en los ocho individuos tehuelches se distinguieron de la consenso por presentar una transición en 051, mientras que dos individuos de esa etnia mostraron además una reversión en 301 (#8 y #9). Los Lengua, por su parte, se diferenciaron del consenso por una inserción entre las posiciones 282 y 283: en cuatro de las secuencias la base insertada fue T, mientras que en la quinta fue C.

Las restantes doce secuencias co-segregaron con el alelo 2092*T y estuvieron divididas entre el étnicamente heterogéneo grupo 2a, formado por ocho individuos que comparten la secuencia consenso del haplotipo fundador D1 (223-325-362), y un grupo restringido a cuatro Lengua que comparten el consenso 223-291-362 (denotado como 2b en la Tabla 11). Aunque podría postularse que 2a y 2b constituyen grupos monofiléticos derivados independientemente de un linaje ancestral con una RHV-I 223-362 que adquirió

2092*T, es más parsimonioso proponer que las secuencias del grupo 2b en realidad pertenecen a D1 y carecen de 325 como consecuencia de una reversión. Secuencias claramente atribuibles a D1 pese a carecer de 325 han sido descritas en Mapuches (Ginther y col. 1993) y Pehuenches (Moraga y col. 2000), entre otros ejemplos. La interpretación anterior se ve reforzada con el hallazgo de una secuencia RHV-I exactamente intermedia - en este escenario evolutivo- entre D1 (223-325-362) y la nodal para 2b (223-291-362): el individuo cuya secuencia casi completa fue informada por Jun y col. (1994) y corregida en Derbeneva y col. (2002b) es portador de la combinación 223-291-325-362.

Los resultados aquí descriptos confirman la asociación entre D1 y el alelo 2092*T, y permiten otorgar *status* de fundador al linaje “Cayapa”. Contra la opinión de Alves-Silva y col. (2000), quienes lo consideran como posible revertante para la posición 325 (y por lo tanto atribuible a D1), los resultados aquí descriptos permiten proponer que el haplotipo “Cayapa” define un cuarto sub-haplogrupo de D. Al igual que los otros fundadores como D1, D2 y D3, el haplotipo “Cayapa” habría arribado a América tras haberse diferenciado en algún lugar del Viejo Mundo.

6.4.3- Filogeografía del linaje “Cayapa”

La compilación y análisis de 3164 secuencias RHV-I provenientes tanto de poblaciones indígenas del continente como de otras criollas, mestizas, “hispanas” y afro-americanas (Tablas 12 y A2), permitió detectar 45 individuos portadores de linajes “Cayapa”. Otros 14 casos fueron informados entre los 652 aborígenes estudiados en esta Tesis mientras que, en cambio, ninguno estaría presente entre los 478¹³ na-dené y amerindios analizados mediante RCP-PLFR de alta resolución (Torrioni y col. 1992, 1993b, 1994b-c; Huoponen y col. 1997), ya que ningún individuo del haplogrupo D fue portador de un sitio *AluI* 16240, cuya presencia se infiere constante entre los “Cayapa” americanos.

¹³ En los trabajos citados se analizaron un total de 520 individuos mediante RCP-PLFR de alta resolución, pero 42 de ellos, que también fueron secuenciados, ya fueron incluidos en la Tabla A2.

Tabla 11- Secuencias de la RHV-I y su relación con el polimorfismo para la posición 2092 en 26 nativos americanos. Para la RHV-I se muestran sólo los sitios variantes respecto de la secuencia Referencia (Anderson y col. 1981); los puntos indican identidad con dicha secuencia. La numeración de las posiciones variables se corresponde con la secuencia Referencia, y para la RHV-I se indican sin el prefijo “16”. En la primer columna se consignan los tres grupos a los que se hace referencia en el texto, mientras que en la segunda columna se otorga a cada individuo un número para facilitar su referencia en el texto. “Teh Cha” y “Teh LR” son Tehuelches de las localidades El Chaliá y Loma Redonda, respectivamente.

#	Referencia	Región Hipervariable I																			posición
		51	174	183	187	189	209	223	241	245	260	263	282.1	291	301	303	325	342	361	362	2092
		A	C	A	C	T	T	C	A	C	C	T	-	C	C	G	T	T	G	T	C
Grupo 1	1 Huilliche 28	•	•	•	•	•	•	T	G	•	•	•	•	•	T	•	•	C	•	C	C
	2 Teh Cha 27	G	•	•	•	•	•	T	G	•	•	•	•	•	T	•	•	C	•	C	C
	3 Teh Cha 30	G	•	•	•	•	•	T	G	•	•	•	•	•	T	•	•	C	•	C	C
	4 Teh Cha 33	G	•	•	•	•	•	T	G	•	•	•	•	•	T	•	•	C	•	C	C
	5 Teh Cha 39	G	•	•	•	•	•	T	G	•	•	•	•	•	T	•	•	C	•	C	C
	6 Teh Cha 52	G	•	•	•	•	•	T	G	•	•	•	•	•	T	•	•	C	•	C	C
	7 Teh Cha 54	G	•	•	•	•	•	T	G	•	•	•	•	•	T	•	•	C	•	C	C
	8 Teh Cha 14	G	•	•	•	•	•	T	G	•	•	•	•	•	•	•	•	C	•	C	C
	9 Teh LR 9	G	•	•	•	•	•	T	G	•	•	•	•	•	•	•	•	C	•	C	C
	10 Lengua 253	•	•	•	•	•	•	T	G	•	•	•	T	•	T	•	•	C	•	C	C
	11 Lengua 294	•	•	•	•	•	•	T	G	•	•	•	T	•	T	•	•	C	•	C	C
	12 Lengua 317	•	•	•	•	•	•	T	G	•	•	•	T	•	T	•	•	C	•	C	C
	13 Lengua 260	•	•	•	•	•	•	T	G	•	•	•	T	•	T	•	•	C	•	C	C
	14 Lengua 335	•	•	•	•	•	•	T	G	•	•	•	C	•	T	•	•	C	•	C	C
Grupo 2a	15 Sioux 42	•	•	•	•	•	•	T	•	•	•	•	•	•	•	A	C	•	•	C	T
	16 Maya D8	•	•	C	•	C	•	T	•	•	•	•	•	•	•	•	C	•	•	C	T
	17 Chimila 25	•	•	•	•	•	•	T	•	•	•	•	•	•	•	•	C	•	•	C	T
	18 Lengua 292	•	•	•	•	•	•	T	•	•	T	•	•	•	•	•	C	•	•	C	T
	19 Wichí 151	•	T	•	•	•	•	T	•	•	•	C	•	•	•	•	C	•	A	C	T
	20 Toba 76	•	•	•	•	•	•	T	•	•	•	•	•	•	•	•	C	•	•	C	T
	21 Teh Cha 13	•	•	•	T	•	•	T	•	T	•	•	•	•	•	•	C	•	•	C	T
	22 Teh LR 3	•	•	•	T	C	C	T	•	•	•	•	•	•	•	•	C	•	•	C	T
Grupo 2b	23 Lengua 248	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	C	•	T	•	•	•	•	•	C	T
	24 Lengua 259	•	•	•	•	•	•	T	•	•	•	•	•	T	•	•	•	•	•	C	T
	25 Lengua 333	•	•	•	•	•	•	T	•	•	•	•	•	T	•	•	•	•	•	C	T
	26 Lengua 339	•	•	•	•	•	•	T	•	•	•	•	•	T	•	•	•	•	•	C	T

Tabla 12- Compilación de secuencias RHV-I de origen americano

Poblaciones	N	Haplogrupo					
		A	B	C	D	X	Otros
Esquimales/Aleutianos	297	157	0	0	139	0	1
Na-dené	411	263	101	35	5	2	5
Amerindios	1572	403	539	334	268	18	10
Poblaciones cosmopolitas y otras	781	40	57	34	14	0	0
Poblaciones extinguidas	103	19	16	40	22	4	2
TOTAL	3164	882	713	443	448	24	18

Que el sitio *AhuI* 16240 es detectable mediante el método de RCP-PLFR de alta resolución queda demostrado por su hallazgo en tres Kraho del haplogrupo B (haplotipo AM69, Torroni y col. 1993b). En suma, sobre un total de 4294 individuos analizados, los linajes “Cayapa” fueron detectados en tan sólo 59, constituyendo así apenas el 1,4% de los linajes maternos presentes en nativos americanos y sus poblaciones derivadas (Tabla 13).

El haplotipo nodal 223-241-301-342-362 fue hallado en dos Mapuches, un Huilliche y dos hispanos de E.U.A. (tipo 1 en Tabla 14 y Figura 8), mientras que los demás linajes se ubican a 1-3 pasos mutacionales de aquél. En las poblaciones donde la frecuencia absoluta de los linajes “Cayapa” es $N \geq 2$ -con la excepción de los Mapuches e hispanos señalados previamente-, todos los individuos comparten al menos una mutación privada.

Tabla 13- Poblaciones americanas analizadas en busca de linajes “Cayapa”.

Método experimental	N ¹	Cayapa ²	Referencias
Secuenciación de la RHV-I	3164	45	ver Tabla A2 en Anexo
RCP-PLFR de alta resolución	478	0	Torroni y col. 1992, 1993b, 1994b-c; Huoponen y col. 1997
RCP-PLFR + secuenciación RHV-I	652	14	esta Tesis
TOTAL	4294	59	

(1) total de individuos analizados; (2) total de casos detectados

Así, la transición 51 está presente en los Tehuelches, la mutación 291 en los Cayapa, y los cambios 234 y 311 coexisten en los Yámana. Cuatro Lengua comparten la inserción de un residuo T en la posición 282.1, mientras que en el quinto Lengua la inserción se presenta como una C, obvia transición respecto de la primera si atendemos a sus frecuencias relativas. Finalmente, el único mexicano y el tercer “hispano” comparten la presencia de la transversión 234C→G. Otro rasgo peculiar de variabilidad nucleotídica de los linajes “Cayapa” americanos es la alta frecuencia de reversión para la posición 301: en la muestra de 59 individuos analizada en este estudio es posible inferir que este cambio ocurrió independientemente en al menos tres ocasiones, existiendo haplotipos “Cayapa” sin 301 en los Tehuelches, Cayapa y Yámana (tipos 3, 9, 10 y 13 en Tabla 14 y Figura 8).

Figura 8- Red de haplotipos “Cayapa”.

Red obtenida mediante el algoritmo MJ en el programa NETWORK 4.1. Cada círculo azul representa un haplotipo distinto, numerado como en la columna **Tipo** de la Tabla 14. Las posiciones variables se indican sobre las barras que separan los círculos, las posiciones recurrentes se subrayan. El haplotipo NODAL es el ancestral para el todo haplogrupo D, con la secuencia 223-362. Los círculos blanco y rojo no fueron muestreados, este último –señalado con una flecha- es el hipotético ancestro común (223-301-342-362) entre los linajes “Cayapa” americanos y la secuencia #14 hallada en Asia.

Tabla 15- Frecuencia de linajes “Cayapa” en poblaciones aborígenes.

Población	N¹	Cayapa²	frecuencia	Referencia
Tehuelche	31	8	0,2581	esta tesis
Cayapa	150	35	0,2333	Rickards y col. 1999
Lengua	37	5	0,1351	esta tesis
Yámana	15	2	0,1333	Moraga y col. 2000
Mapuche	34	2	0,0588	Moraga y col. 2000
Huilliche	38	1	0,0263	esta tesis
Quechua Tayacaja	61	1	0,0164	Fuselli y col. 2003

(1) total de individuos analizados; (2) total de casos detectados

Distribución étnico-geográfica

Ausentes en las poblaciones esquimales, aleutianas y na-denés, los haplotipos “Cayapa” fueron hallados en poblaciones amerindias de Ecuador (Rickards y col. 1999), Perú (Fuselli y col. 2003), Chile (Moraga y col. 2000), Paraguay y Argentina (esta tesis). También estuvieron presentes en las poblaciones cosmopolitas del norte de México (Green y col. 2000) y sudeste de Brasil (Alves-Silva y col. 2000), así como en la fracción “hispana” de la población cosmopolita de Estados Unidos de América. Con valores de alrededor del 25%, las frecuencias más elevadas se dieron entre los Tehuelches y los Cayapa, mientras que valores menores al 6% prevalecieron en Mapuches, Huilliches y Quechuas (Tabla 15). Para los Yámana y Lengua la incidencia osciló alrededor del 13%.

La mayor concentración de linajes “Cayapa” a nivel continental ocurre en Patagonia y Tierra del Fuego, ámbito en que habitan Mapuches, Huilliches, Tehuelches y Yámana, cuatro de las siete poblaciones indígenas en las que se ha informado este haplotipo. Las restantes poblaciones portadoras de estos linajes no presentan especial proximidad geográfica o identidad lingüística: los Cayapa habitan las tierras bajas de Ecuador, Los Lengua viven en el Chaco paraguayo y por último los Quechua de Tayacaja residen en un sector serrano de Perú.

Además del notable sesgo en su distribución geográfica, es en los Tehuelches donde se ha descrito la mayor frecuencia de linajes “Cayapa”. Aunque los valores hallados en la población Cayapa son similares, es de destacar que la población de Tehuelches analizada en este trabajo poseería un importante componente de mestizaje con Mapuches, con los que cohabitan en el sud-oeste de Chubut (Pinotti 2001). Desde los comienzos de la “araucanización de Pampa y Patagonia” en el siglo XVII, las poblaciones pampeano-patagónicas cis-andinas se mestizaron con los inmigrantes “araucanos” de origen trans-andino. Dado que algunas de las fracciones “araucanas” carecen de linajes “Cayapa” (Mapuches de Río Negro en Ginther y col. 1993, esta tesis; “aborígenes chilenos” en Horai y col. 1993; Pehuenches en Moraga y col. 2000) o los poseen en baja frecuencia (Mapuches de Valdivia, Chile, en Moraga y col. 2000; Huilliches de Chile, en esta tesis), es razonable interpretar que su presencia en tal alta frecuencia entre los Tehuelches no sería consecuencia de la introgresión femenina araucana reciente (en los últimos 350 años) sino un reflejo de su condición ancestral. Aún siendo muy elevada, la actual frecuencia del 26%

para los haplotipos “Cayapa” en los Tehuelches debió ser mayor en el pasado, hacia fines del siglo XVI, antes del ingreso masivo de “araucanos” a la zona de los Andes.

Linajes asiáticos filogenéticamente afines a los “Cayapa” americanos.

El análisis de bases de datos y de la literatura disponible resultó en la compilación de 12194 secuencias de la RHV-I provenientes de poblaciones asiáticas y de otras derivadas de Asia. Un total de 7886 secuencias fueron obtenidas en poblaciones del este y sudeste asiático, y en regiones vecinas de Oceanía -incluyendo Australia- (Tabla A3 en Anexo) mientras que otras 4308 derivaron de poblaciones del Asia Central y Siberia (Tabla A4 en Anexo). Se consideró como potencialmente emparentada con los linajes “Cayapa” americanos a toda secuencia que, siendo atribuible al haplogrupo D, poseyera alguna/s de la/s tres mutaciones 241, 301 y/o 342. Sobre un total de ~600 secuencias D revisadas, sólo dos cumplieron con el requisito: la muestra SD10377 tuvo la combinación 223-241-362 (Yao y col. 2003) mientras que para el individuo QD8153 se informó el haplotipo 148-223-249-301-342-362 (Yao y col. 2002a). Ambos individuos provienen de la provincia Shangdon, en el centro-este de China. Paradójicamente, en una de las secuencias está el cambio 241 y en la otra la combinación 301-342. Esta última puede ser interpretada como filéticamente relacionada con los linajes “Cayapa” americanos, dada la co-ocurrencia de dos de las tres transiciones que definen el haplotipo nodal 223-241-301-342-362. La interpretación alternativa, con 301 y 342 recurriendo en el linaje asiático, parece un escenario evolutivo menos probable, especialmente si se tiene en cuenta que las transiciones 301 y 342 son cambios por demás infrecuentes, y no aparecen –solos o combinados- en ningún otro de los ~600 linajes D asiáticos analizados.

La comparación del haplotipo nodal “Cayapa” (tipo 1 en Tabla 14 y Figura 8) con la secuencia QD8153 (tipo 14, ídem) permite deducir que la combinación 223-301-342-362 (círculo rojo señalado con una flecha en la Figura 8) sería la forma ancestral para este nuevo sub-haplogrupo de D con representantes a ambos lados del estrecho de Bering. En este escenario, y a la vista de la información disponible, puede también postularse que la posición 241 diferencia las formas americanas de este sub-haplogrupo. Sin embargo, las inferencias antes mencionadas deben ser consideradas preliminares, ya que se basan en el análisis de una única secuencia asiática putativamente relacionada con las americanas. El hallazgo de otros linajes asiáticos y/o la obtención de información nucleotídica de regiones codificantes en muestras asiáticas y americanas de este linaje permitirá contrastar el escenario evolutivo antes mencionado.

Tabla 14- Linajes “Cayapa” de América, y afines de Asia.

Tipo¹	Frec.	Población	Designación	N	RHV-I	secuencia entre		Referencia
1	5	Mapuche	HUI10	2	223 241 301 342 362	16086?	16390?	Moraga y col. (2000)
		Huilliche	Hui 28	1	223 241 301 342 362	16038	16370	esta Tesis
		Hispanos E.U.A.	USA.HIS.000292	1	223 241 301 342 362	16024	16365	Monson y col. (2002)
		Hispanos E.U.A.	USA.HIS.000419	1	223 241 301 342 362	16024	16365	Monson y col. (2002)
2	6	Tehuelche	varios	6	51 223 241 301 342 362	16038	16370	esta Tesis
3	2	Tehuelche		2	51 223 241 342 362	16038	16370	esta Tesis
4	4	Lengua	varios	4	223 241 282+T 301 342 362	16038	16370	esta Tesis
5	1	Lengua		1	223 241 282+C 301 342 362	16038	16370	esta Tesis
6	1	México cosmopolita	C75	1	223 234G 241 301 342 362	16023	16370	Green y col. (2000)
7	1	Hispanos E.U.A.	USA.HIS.000532	1	189 223 234G 241 301 342 362	16024	16365	Monson y col. (2002)
8	28	Cayapa	C10	9	223 241 291 301 342 362	16111?	16362?	Rickards y col. (1999)
		Cayapa	CAYAPA12	19	223 241 291 301 342 362	16189?	16362?	Rickards y col. (1999)
9	6	Cayapa	CAYAPA11	6	223 241 291 342 362	16189?	16362?	Rickards y col. (1999)
10	1	Cayapa	CAYAPA13	1	223 241 291 342 359 362	16189?	16362?	Rickards y col. (1999)
11	1	Brasil cosmopolita	BR 53	1	114A 179 223 241 301 342 362	16060	16362	Alves-Silva y col. (2000)
12	1	Tayacaja Quechua	AND62	1	223 241 255 301 342 362	16024	16383	Fuselli y col. (2003)
13	2	Yámana	YA3	2	223 234 241 311 342 362	16086?	16390?	Moraga y col. (2000)
14	1	Chino Han	QD 8153	1	148 223 249 301 342 362	16001	16497	Yao y col. (2002a)

(1) cada Tipo es una haplotipo distinto.

6.4.4- Filogeografía de los sub-haplogrupos D a ambos lados del Estrecho de Bering.

El caso americano.

La compilación de secuencias mitocondriales provenientes de poblaciones “mongoloides” del Viejo y el Nuevo Mundo permitió comparar la distribución y abundancia relativa de los cuatro sub-haplogrupos de D reconocibles en América (Tabla 16). En América, D3 es el menos frecuente y está restringido a las poblaciones esquimales de Alaska (N=1) y Groenlandia (N=1), según informaran Shields y col. (1993). El grupo D2 representa el 71% de los linajes maternos descritos en Aleutianos (Derbeneva y col. 2002b, Rubicz y col. 2003), habiendo también sido informado con baja frecuencia en na-denés (dos navajos en Budowle y col. 2002; un apache en Torroni y col. 1993b). Con la excepción de dos individuos Haida portadores de la secuencia nodal 223-325-362 (Ward y col. 1993), los linajes D1 y Cayapa tienen una distribución estrictamente pan-amerindia. La presencia en baja frecuencia de linajes D1 y D2 entre los na-denés probablemente refleje la interacción de estos pueblos con sus vecinos lingüísticamente divergentes, un escenario ya postulado para explicar otros hallazgos (por ejemplo Smith y col. 2000). Navajo y apaches constituyen un aislado lingüístico na-dené en un área -el sudoeste de E.U.A- donde prevalecen poblaciones de lenguas amerindias, a la que habrían llegado desde algún lugar del noroeste del sub-continente norteamericano apenas 100-500 años antes que hicieran lo propio los europeos (Brugge 1983). Inicialmente cazadores y recolectores, ya en tiempos históricos adoptaron la economía agricultora –y muchos genes- de los pueblos sedentarios a los que antes acosaban militarmente, con algunos de los cuales terminaron mestizándose en grado notable. Un buen ejemplo de esta introgresión lo provee la alta frecuencia del haplogrupo B en Navajo y Apaches –el haplogrupo mas abundante en amerindios del sudoeste americano-, ausente por completo en otras comunidades na-dené del noroeste de E.U.A. y Canadá.

En suma, la ocurrencia de sub-haplogrupos de D en poblaciones americanas muestra una clara relación con la división genético-lingüístico-dental propuesta por Greenberg y col. (1986): con D3 presente en esquimales, D2 en Aleutianos, y D1 plus Cayapa en amerindios, las distribuciones étnico-geográficas son mutuamente excluyentes, siempre que se acepte que los na-dené carecerían de linajes D propios y habrían recibido las formas D1 y D2 por flujo genético desde las poblaciones vecinas.

Tabla 16- Distribución de sub-haplogrupos D1-D3 y Cayapa en Asia y América. Solo se indican aquellas poblaciones asiáticas para las que se ha informado alguna secuencia perteneciente a los sub-haplogrupos D1-D3 o Cayapa.

América	N	D2 129-271	D3 93-173-319	D1 325	Cayapa 241-301-342	Referencia
Aleutianos	193	137	0	0	0	ver Tabla A2
Esquimales	104	0	2	0	0	ver Tabla A2
Na-Denés	411	3	0	2	0	ver Tabla A2
Amerindios	1572	0	0	228	40	ver Tabla A2
Total	2280	140	2	230	40	

Asia	N	D2	D3	D1	Cayapa	Referencia
Chukchi	111	7	1	0	0	ver Tabla A4
Esquimales Siberianos	105	15	6	0	0	ver Tabla A4
Yakuts	418	2	0	0	0	ver Tabla A4
Koryaks	292	0	2	0	0	ver Tabla A4
Bashkirs	221	0	3	0	0	ver Tabla A4
Mordvinians	110	0	1	0	0	ver Tabla A4
†Cultura Escito-Siberiana	4	0	1	0	0	ver Tabla A4
Chinos Han	1284	0	0	0	1	Yao y col. (2002a)
Total	2545	24	14	0	1	

Al oeste de Bering: sub-haplogrupos de D en Asia.

Los representantes asiáticos de los sub-haplogrupos D1-D3 son muy poco frecuentes, sumando apenas 38 sobre un total de 12194 individuos analizados, y concentrados en sólo 6 de las 36 poblaciones siberianas y centro-asiáticas estudiadas (y en una población arqueológica). Linajes atribuibles a D2 están presentes tanto en poblaciones del litoral beringio como los Chukchi y Esquimales siberianos (Shields y col. 1993, Starikovskaya y col. 1998, Ingman y col. 2000) cuanto en otras de hábitat mas continental, como los Yakuts (Fedorova y col. 2003). D3 tiene una clara distribución disyunta, con un foco en el área peri-beringia (Chukchis, Starikovskaya y col. 1998; Esquimales, Voevoda y col. 1994; y Koryaks, Schurr y col. 1999) y otro geográficamente muy distante en Asia Central, entre los Bashkirs y Mordvinians (Bermisheva y col. 2002). También en Asia Central se ha descrito un individuo con linaje D3 atribuido a la cultura arqueológicamente definida como escito-siberiana (Ricaud y col. 2004b).

Ya hemos descrito en 6.3.3 la existencia de un único linaje asiático emparentado con los Cayapa americanos, en un chino Han (Yao y col. 2002a), y resta decir que el linaje D más frecuente en América carecería de representantes asiáticos conocidos. La secuencia HVR-I nodal para D1 (223-325-362) y otras separadas por 1-3 pasos mutacionales han sido descritas para numerosas poblaciones asiáticas (por ejemplo Yoshii y col. 1995, Oota y col. 1995, Horai y col. 1996, Takada y col. 1996, Seo y col. 1998, Pfeiffer y col. 1998, Yao y col. 2000, Koyama y col. 2002, etc.), pero cuando también se han analizado algunos polimorfismos para regiones codificantes en los mismos individuos, ha quedado al descubierto que esos linajes no pertenecen al haplogrupo D (Abe y col. 1998) sino al haplogrupo G (Snall y col. 2002, Yao y col. 2002a, Bandelt y col. 2003). No deja de ser paradójico que el sub-haplogrupo D más frecuente en América carezca aparentemente de representantes actuales en Asia.

6.5- Comentarios finales.

Un origen híbrido para Esquimales y Aleutianos.

En esta sección he demostrado que para América es posible distinguir cuatro haplotipos fundadores dentro del haplogrupo D, con distribuciones étnico-geográficas recíprocamente excluyentes y cuyos representantes asiáticos -cuando detectables- tienen una distribución disyunta, estando algunos en áreas inmediatamente adyacentes a la supuesta vía de poblamiento continental, y otros a miles de kilómetros de allí, en el corazón del Asia Central. Los haplotipos más frecuentemente detectables en Asia son también aquellos que tienen una dispersión geográfica más limitada en América.

Atendiendo a la filogeografía de D en este continente, se puede postular que D1 y Cayapa son formas que habrían arribado al continente más tempranamente que D2 y D3. Aunque algunos autores han postulado o apoyado un origen independiente para los grupos esquimo-aleutiano, na-dené y amerindio en base a rasgos dentales, genéticos y lingüísticos (por ejemplo Turner II 1984, Greenberg y col. 1986, Cavalli-Sforza y col. 1994), la evidencia mitocondrial disponible permite postular un escenario menos radical, en el que las poblaciones peri-árticas (putativamente ancestrales a los actuales esquimales, Aleutianos y na-denes) y proto-amerindias tendrían un común origen geográfico y temporal, tras el cual se habrían diferenciado manteniendo escaso flujo genético recíproco. Las poblaciones peri-beringias habrían conservado sólo una fracción de la diversidad mitocondrial fundadora –básicamente

haplogrupo A-, y diferentes fracciones se habrían mestizado con nuevos migrantes llegados al área, portadores de los linajes D2 y D3. Esto explicaría la restringida distribución de estos sub-haplogrupos, así como la aparente divergencia lingüística y morfológica entre los tres grandes grupos.

Un Nuevo Mundo para ¿pocos? fundadores.

Con sólo cinco haplogrupos mitocondriales presentes en sus poblaciones aborígenes, América es el continente mas pobre en diversidad filética de linajes maternos. En las poblaciones del este y centro de Asia y Siberia es posible distinguir al menos 17 grupos de linajes de alta jerarquía: los compartidos entre ambos continentes (A, B, C, D y X) coexisten con otros 12 no descritos para poblaciones americanas, a saber: E, F, G, M7, M8a, M9, M10, M11, M12, R9b, R11 y N9a (Kivisild y col. 2002, Kong y col. 2003, Tanaka y col. 2004). El contraste es aún mas profundo si se toma en cuenta la variedad de sub-haplogrupos existentes al interior de cada haplogrupo. El haplogrupo D, con cuatro sub-haplogrupos, es sin dudas el más diverso de los cinco presentes en América, ya que los demás sólo contarían con una (A, B y C) o quizá dos variantes (X) fundadoras (Bandelt y col. 2003). Así y todo, la diversidad americana de D es menos que pobre comparada con la asiática, donde Tanaka y col. (2004) describen recientemente la existencia de 17 sub-haplogrupos, entre los que no están contados D1 y Cayapa. Dicho de otro modo, en una pequeña muestra de 100 japoneses, chinos o coreanos tomados al azar se encontrará mayor variedad de haplogrupos y sub-haplogrupos mitocondriales que en todas las poblaciones nativas del continente americano juntas, desde Alaska a Tierra del Fuego (ver Maruyama y col. 2003). El ejemplo anterior también es válido si se comparan americanos versus la mayoría de las poblaciones siberianas.

Esta evidencia mitocondrial es compatible con un profundo efecto de cuello de botella al momento de la colonización del continente –o algún tiempo después. Sólo una pequeña parte de la diversidad mitocondrial asiática llegó a Beringia o sobrevivió luego en el continente, llegando hasta la actualidad. La escasez o inexistencia de formas asiáticas de linajes D1 y Cayapa -así como de los haplotipos fundadores para los restantes haplogrupos- también apunta en la dirección de que una población relativamente poco diversa habría sido ancestral a los primeros americanos. Esta interpretación de la evidencia mitocondrial tiene su espejo en los estudios de variabilidad del cromosoma Y (Pena y col. 1995; Bianchi y col. 1997, Lell y col. 1997, 2002; Karafet y col. 1999, Ruiz-Linares y col. 1999) y de marcadores moleculares

clásicos (Salzano y Callegari-Jacques 1988, Cavalli-Sforza y col. 1994), que también han demostrado una pérdida relativa de diversidad en las poblaciones americanas.

Bibliografía

Abe S, Usami S, Shinkawa H, Weston MD, Overbeck LD, Hoover DM y otros. (1998) "Phylogenetic analysis of mitochondrial DNA in Japanese pedigrees of sensorineural hearing loss associated with the A1555G mutation" **Eur J Hum Genet** 6:563-9

Adovasio J, Pedler D, Donhaue J, Stuckenrath R. (1998) "Two decades of debate on Meadowcroft Rockshelter" **North Amer Archaeol** 19:317-341

Alberts, Bruce, Bray, Dennis, Lewis, Julian, Raff, Martin, Roberts, Keith, and Watson, James D. (1994) "Molecular Biology of the Cell" : Garland Publishing, New York and London

Altmann, R. (1890) "Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen zu den Zellen" , Leipzig

Alves-Silva J, da Silva Santos M, Guimaraes PE, Ferreira AC, Bandelt HJ, Pena SD y otros. (2000) "The ancestry of Brazilian mtDNA lineages" **Am J Hum Genet** 67:444-61

Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J y otros. (1981) "Sequence and organization of the human mitochondrial genome" **Nature** 290:457-65

Andersson SG, Zomorodipour A, Andersson JO, Sicheritz-Ponten T, Alsmark UC, Podowski RM y otros. (1998) "The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria" **Nature** 396:133-40

Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. (1999) "Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA" **Nature Genet** 23:147

Ankel-Simons F y Cummins JM. (1996) "Misconceptions about mitochondria and mammalian fertilization: implications for theories on human evolution" **Proc Natl Acad Sci USA** 93:13859-63

Aquadro CF y Greenberg BD. (1983) "Human mitochondrial DNA variation and evolution: analysis of nucleotide sequences from seven individuals" **Genetics** 103:287-312

Arnason U, Xu X, Gullberg A. (1996) "Comparison between the complete mitochondrial DNA sequences of *Homo* and the common chimpanzee based on nonchimeric sequences" **J Mol Evol** 42:145-52

Avery OT, MacLeod CM, McCarty M. (1944) "Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* type III." **J Exp Med** 79:137 -158

Bailliet G, Rothhammer F, Carnese FR, Bravi CM, Bianchi NO. (1994) "Founder mitochondrial haplotypes in Amerindian populations" **Am J Hum Genet** 55:27-33

- Ballinger SW, Schurr TG, Torroni A, Gan YY, Hodge JA, Hassan K y otros. (1992) "Southeast Asian mitochondrial DNA analysis reveals genetic continuity of ancient mongoloid migrations" **Genetics** 130: 139-52
- Bamshad M, Kivisild T, Watkins WS, Dixon ME, Ricker CE, Rao BB y otros. (2001) "Genetic evidence on the origins of Indian caste populations" **Genome Res** 11:994-1004
- Bandelt HJ, Forster P, Sykes BC, Richards MB. (1995) "Mitochondrial portraits of human populations using median networks" **Genetics** 141:743-53
- Bandelt HJ, Lahermo P, Richards M, Macaulay V. (2001) "Detecting errors in mtDNA data by phylogenetic analysis" **Int J Legal Med** 115:64-9
- Bandelt HJ, Alves-Silva J, Guimaraes PE, Santos MS, Brehm A, y otros. (2001) "Phylogeography of the human mitochondrial haplogroup L3e: a snapshot of African prehistory and Atlantic slave trade" **Ann Hum Genet** 65:549-63
- Bandelt HJ, Herrnstadt C, Yao YG, Kong QP, Kivisild T, Rengo C y otros. (2003) "Identification of Native American founder mtDNAs through the analysis of complete mtDNA sequences: some caveats" **Ann Hum Genet** 67:512-24
- Batista O, Kolman CJ, Bermingham E. (1995) "Mitochondrial DNA diversity in the Kuna Amerinds of Panama" **Hum Mol Genet** 4:921-9
- Behar DM, Hammer MF, Garrigan D, Villems R, Bonne-Tamir B y otros. (2004) "MtDNA evidence for a genetic bottleneck in the early history of the Ashkenazi Jewish population" **Eur J Hum Genet** 12:355-64.
- Benda C. (1897) " Uber die Spermatogenese der Vertebraten und hoherer Evertebraten" **Verhandl. Physiol Ges.**
- Bendall KE, Macaulay VA, Baker JR, Sykes BC. (1996) "Heteroplasmic point mutations in the human mtDNA control region" **Am J Hum Genet** 59:1276-87
- Bendall KE, Macaulay VA, Sykes BC. (1997) "Variable levels of a heteroplasmic point mutation in individual hair roots" **Am J Hum Genet** 61:1303-8
- Bermisheva M, Tambets K, Villems R, Khusnutdinova E. (2002) "Diversity of mitochondrial DNA haplotypes in ethnic populations of the Volga-Ural region of Russia" **Mol Biol** 36:802-812
- Bert F, Corella A, Gene M, Perez-Perez A, Turbon D. (2004) "Mitochondrial DNA diversity in the Llanos de Moxos: Moxo, Movima and Yuracare Amerindian populations from Bolivia lowlands" **Ann Hum Biol** 31:9-28
- Betty DJ, Chin-Atkins AN, Croft L, Sraml M, Eastal S. (1996) "Multiple independent origins of the COII/tRNA(Lys) intergenic 9-bp mtDNA deletion in aboriginal Australians" **Am J Hum Genet** 58: 428-33
- Bianchi NO, Bailliet G , Bravi CM (1995) "Peopling of the Americas as inferred through the analysis of mitochondrial DNA" **Brazilian Journal of Genetics** 14:661-668

- Bianchi NO, Bailliet G, Bravi CM, Carnese RF, Rothhammer F, Martinez-Marignac VL y otros. (1997) "Origin of Amerindian Y-chromosomes as inferred by the analysis of six polymorphic markers" **Am J Phys Anthropol** 102:79-89
- Birky CW Jr. (1995) "Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes: mechanisms and evolution" **Proc Natl Acad Sci USA** 92:11331-8
- Blanc H, Chen KH, D'Amore MA, Wallace DC. (1983) "Amino acid change associated with the major polymorphic Hinc II site of Oriental and Caucasian mitochondrial DNAs" **Am J Hum Genet** 35:167-76
- Bodenteich A, Mitchell LG, Merrill CR. (1991) "A lifetime of retinal light exposure does not appear to increase mitochondrial mutations" **Gene** 108:305-9
- Bogenhagen DF. (1999) "Repair of mtDNA in vertebrates" **Am J Hum Genet** 64:1276-81
- Boles TC, Snow CC, Stover E. (1995) "Forensic DNA testing on skeletal remains from mass graves: a pilot project in Guatemala" **J Forensic Sci** 40:349-55
- Bolnick DA y Smith DG. (2003) "Unexpected patterns of mitochondrial DNA variation among Native Americans from the southeastern United States" **Am J Phys Anthropol** 122:336-54
- Boore JL. (1999) "Animal mitochondrial genomes" **Nucleic Acids Res** 27:1767-80
- Borst P y Kroon AM. (1969) "Mitochondrial DNA: physicochemical properties, replication, and genetic function" **Int Rev Cytol** 26:107-90
- Bortolini MC, Zago MA, Salzano FM, Silva-Junior WA, Bonatto SL, da Silva MC y otros. (1997) "Evolutionary and anthropological implications of mitochondrial DNA variation in African Brazilian populations" **Hum Biol** 69:141-59
- Bravi CM, Sans M, Bailliet G, Martinez-Marignac VL, Portas M, Barreto I y otros. (1997) "Characterization of mitochondrial DNA and Y-chromosome haplotypes in a Uruguayan population of African ancestry" **Hum Biol** 69:641-52
- Bravi, CM, Peral Garcia, P, and Bianchi, NO. (1999) "Correlación entre los polimorfismos de las regiones codificante y no codificante del ADNmt: identificación de un nuevo linaje mitocondrial para las Américas". IV Jornadas Nacionales de Antropología Biológica, San Salvador de Jujuy, Argentina
- Brehm A, Pereira L, Bandelt HJ, Prata MJ, Amorim A. (2002) "Mitochondrial portrait of the Cabo Verde archipelago: the Senegambian outpost of Atlantic slave trade" **Ann Hum Genet** 66:49-60
- Bridge D, Cunningham CW, Schierwater B, DeSalle R, Buss LW. (1992) "Class-level relationships in the phylum Cnidaria: evidence from mitochondrial genome structure" **Proc Natl Acad Sci USA** 89:8750-3
- Brown MD, Voljavec AS, Lott MT, Torroni A, Yang CC, Wallace DC. (1992a) "Mitochondrial DNA complex I and III mutations associated with Leber's hereditary optic neuropathy" **Genetics** 130:163-73
- Brown MD, Voljavec AS, Lott MT, MacDonald I, Wallace DC. (1992b) "Leber's hereditary optic neuropathy: a model for mitochondrial neurodegenerative diseases" **FASEB J** 6:2791-9

Brown MD, Shoffner JM, Kim YL, Jun AS, Graham BH, Cabell MF y otros. (1996) "Mitochondrial DNA sequence analysis of four Alzheimer's and Parkinson's disease patients" **Am J Med Genet** 61:283-9

Brown MD, Hosseini SH, Torroni A, Bandelt HJ, Allen JC, Schurr TG y otros. (1998) "mtDNA haplogroup X: An ancient link between Europe/Western Asia and North America?" **Am J Hum Genet** 63:1852-61

Brown WM, George M Jr, Wilson AC. (1979) "Rapid evolution of animal mitochondrial DNA" **Proc Natl Acad Sci USA** 76:1967-71

Brown WM. (1980) "Polymorphism in mitochondrial DNA of humans as revealed by restriction endonuclease analysis" **Proc Natl Acad Sci USA** 77:3605-9

Brugge, DM. (1983) "Navajo Prehistory and History to 1850" **En:** W.C. Sturtevant, editor, *Handbook of the North American Indians*, Vol. 10 Southwest, Smithsonian Institution.

Budowle B, Allard MW, Fisher CL, Isenberg AR, Monson KL, Stewart JE y otros. (2002) "HVI and HVII mitochondrial DNA data in Apaches and Navajos" **Int J Legal Med** 116:212-5

Cali F, Le Roux MG, D'Anna R, Flugy A, De Leo G, Chiavetta V y otros. (2001) "MtDNA control region and RFLP data for Sicily and France" **Int J Legal Med** 114:229-31

Calloway CD, Reynolds RL, Herrin GL Jr, Anderson WW. (2000) "The frequency of heteroplasmy in the HVII region of mtDNA differs across tissue types and increases with age" **Am J Hum Genet** 66:1384-97

Campbell, Lyle. (1998) *American Indian Languages. The Historical Linguistics of Native America.* " Oxford University Press, New York

Cann RL, Brown WM, Wilson AC. (1984) "Polymorphic sites and the mechanism of evolution in human mitochondrial DNA" **Genetics** 106:479-99

Cann RL, Stoneking M, Wilson AC. (1987) "Mitochondrial DNA and human evolution" **Nature** 325:31-6

Cantatore P y Attardi G. (1980) "Mapping of nascent light and heavy strand transcripts on the physical map of HeLa cell mitochondrial DNA" **Nucleic Acids Res** 8:2605-25

Carvajal-Carmona LG, Ophoff R, Service S, Hartiala J, Molina J, Leon P y otros. (2003) "Genetic demography of Antioquia (Colombia) and the Central Valley of Costa Rica" **Hum Genet** 112:534-41

Case JT y Wallace DC. (1981) "Maternal inheritance of mitochondrial DNA polymorphisms in cultured human fibroblasts" **Somatic Cell Genet** 7:103-8

Cavalli-Sforza, L. L, Menozzi, Paolo, and Piazza, Alberto. (1994) *The History and Geography of Human Genes*" Princeton University Press, Princeton, New Jersey

Ceppellini, R., Curtoni, E., Mattiuz, P., Miggiano, V., Scudeller, G., Serra, A. (1967) "Genetics of leucocyte antigens. A family study of segregation and linkage" **En:** Curtoni, ES, Mattiuz, PL, and Tosi, RM, ed(s). *Histocompatibility Testing, 1967*, Munksgaard, Copenhagen

Chagnon P, Gee M, Filion M, Robitaille Y, Belouchi M, Gauvreau D. (1999) "Phylogenetic analysis of the mitochondrial genome indicates significant differences between patients with Alzheimer disease and controls in a French-Canadian founder population" **Am J Med Genet** 85:20-30

Chen MH, Lee HM, Tzen CY. (2002) "Polymorphism and heteroplasmy of mitochondrial DNA in the D-loop region in Taiwanese" **J Formos Med Assoc** 101:268-76

Chen X, Prosser R, Simonetti S, Sadlock J, Jagiello G, Schon EA. (1995) "Rearranged mitochondrial genomes are present in human oocytes" **Am J Hum Genet** 57:239-47

Chen YS, Torroni A, Excoffier L, Santachiara-Benerecetti AS, Wallace DC. (1995) "Analysis of mtDNA variation in African populations reveals the most ancient of all human continent-specific haplogroups" **Am J Hum Genet** 57:133-49

Chen YS, Olckers A, Schurr TG, Kogelnik AM, Huoponen K, Wallace DC. (2000) "mtDNA variation in the South African Kung and Khwe-and their genetic relationships to other African populations" **Am J Hum Genet** 66:1362-83

Chevremont S, Firket H, Chevremont M, Frederic J. (1957) "[Contribution to the study of the preparation for mitosis; mitotic activity, synthesis of desoxyribonucleic acids and mitochondrial modifications in tissue cultures subjected to subnormal temperatures then rewarmed.]" **Acta Anat (Basel)** 30:175-93

Coble MD, Just RS, O'Callaghan JE, Letmanyi IH, Peterson CT, Irwin JA y otros. (2004) "Single nucleotide polymorphisms over the entire mtDNA genome that increase the power of forensic testing in Caucasians" **Int J Legal Med**

Comas D, Paabo S, Bertranpetit J. (1995) "Heteroplasmy in the control region of human mitochondrial DNA" **Genome Res** 5: 89-90

Comas D, Calafell F, Mateu E, Perez-Lezaun A, Bertranpetit J. (1996) "Geographic variation in human mitochondrial DNA control region sequence: the population history of Turkey and its relationship to the European populations" **Mol Biol Evol** 13:1067-77

Comas D, Calafell F, Mateu E, Perez-Lezaun A, Bosch E, Martinez-Arias R y otros. (1998) "Trading genes along the silk road: mtDNA sequences and the origin of central Asian populations" **Am J Hum Genet** 63:1824-38

Corte-Real HB, Macaulay VA, Richards MB, Hariti G, Issad MS, Cambon-Thomsen A y otros. (1996) "Genetic diversity in the Iberian Peninsula determined from mitochondrial sequence analysis" **Ann Hum Genet** 60 (Pt 4):331-50

Crawford, M H. (1998) *"The Origins of Native Americans. Evidence from anthropological genetics"* Cambridge University Press, Cambridge, UK

Cruse, M. y Lewis, R. (2001) "Landsteiner, Karl" **En: Encyclopedia of Life Sciences**, Nature Publishing Group,

Daniels, G. (2001) "Blood Group Genetics" **En: Encyclopedia of Life Sciences**, Nature Publishing Group,

Dawid IB y Blackler AW. (1972) "Maternal and cytoplasmic inheritance of mitochondrial DNA in *Xenopus*" **Dev Biol** 29:152-61

Denaro M, Blanc H, Johnson MJ, Chen KH, Wilmsen E, Cavalli-Sforza LL y otros. (1981) "Ethnic variation in Hpa I endonuclease cleavage patterns of human mitochondrial DNA" **Proc Natl Acad Sci USA** 78:5768-72

Derbeneva OA, Starikovskaya EB, Wallace DC, Sukernik RI. (2002a) "Traces of early Eurasians in the Mansi of northwest Siberia revealed by mitochondrial DNA analysis" **Am J Hum Genet** 70:1009-14

Derbeneva OA, Sukernik RI, Volodko NV, Hosseini SH, Lott MT, Wallace DC. (2002b) "Analysis of mitochondrial DNA diversity in the Aleuts of the commander islands and its implications for the genetic history of Beringia" **Am J Hum Genet** 71:415-21

Derbeneva OA, Starikovskaia EB, Volod'ko NV, Wallace DC, Sukernik RI. (2002c) "Mitochondrial DNA variation in Kets and Nganasans and Its Implications for the Initial Peopling of Northern Eurasia" **Russian J Genet** 38:1316-1321

Derenko MV y Shields GF. (1997) "Mitochondrial DNA Diversity in three North Asian Aboriginal Population Groups" **Mol Biol** 31:665-9

Derenko MV, Malyarchuk BA, Dambueva IK, Shaikhaev GO, Dorzhu CM, Nimaev DD y otros. (2000) "Mitochondrial DNA variation in two South Siberian Aboriginal populations: implications for the genetic history of North Asia" **Hum Biol** 72:945-73

Derenko MV, Grzybowski T, Malyarchuk BA, Czarny J, Miscicka-Sliwka D, Zakharov IA. (2001) "The presence of mitochondrial haplogroup X in Altaians from South Siberia" **Am J Hum Genet** 69:237-41

Derenko MV, Grzybowski T, Malyarchuk BA, Dambueva IK, Denisova GA, Czarny J y otros. (2003) "Diversity of mitochondrial DNA lineages in South Siberia" **Ann Hum Genet** 67:391-411

Destro-Bisol G, Coia V, Boschi I, Verginelli F, Caglia A, Pascali V y otros. (2004) "The analysis of variation of mtDNA hypervariable region I suggests that Eastern and Western Pygmies diverged before the Bantu expansion" **Am Nat** 163:212-26

Dipierri JE, Alfaro E, Martinez-Marignac VL, Bailliet G, Bravi CM, Cejas S y otros. (1998) "Paternal directional mating in two Amerindian subpopulations located at different altitudes in northwestern Argentina" **Hum Biol** 70:1001-10

Dixon, E. James. (1999) "*Bones, Boats & Bison: Archeology and the First Colonization of western North America*" The University of New Mexico Press, Albuquerque, New Mexico.

Easton RD, Merriwether DA, Crews DE, Ferrell RE. (1996) "mtDNA variation in the Yanomami: evidence for additional New World founding lineages" **Am J Hum Genet** 59:213-25

Ebelot, Alfredo. (1943) "*La Pampa. Costumbres argentinas*", Ciordia y Rodríguez Ed., Buenos Aires.

Ebelot, Alfredo. (1968) "*Relatos de la Frontera*", Solar, Buenos Aires.

Ernster L y Schatz G. (1981) "Mitochondria: a historical review" **J Cell Biol** 91:227s-255s

- Feagin JE. (1994) "The extrachromosomal DNAs of apicomplexan parasites" **Annu Rev Microbiol** 48:81-104
- Fedorova SA, Bermisheva MA, Villems R, Maksimova NR, Khusnutdinova EK. (2003) "Analysis of Mitochondrial DNA Lineages in Yakuts" **Mol Biol** 37:544-553
- Finnila S, Hassinen IE, Ala-Kokko L, Majamaa K. (2000) "Phylogenetic network of the mtDNA haplogroup U in Northern Finland based on sequence analysis of the complete coding region by conformation-sensitive gel electrophoresis" **Am J Hum Genet** 66:1017-26
- Finnila S y Majamaa K. (2001) "Phylogenetic analysis of mtDNA haplogroup TJ in a Finnish population" **J Hum Genet** 46:64-9
- Finnila S, Hassinen IE, Majamaa K. (2001a) "Phylogenetic analysis of mitochondrial DNA in patients with an occipital stroke. Evaluation of mutations by using sequence data on the entire coding region" **Mutat Res** 458:31-9
- Finnila S, Lehtonen MS, Majamaa K. (2001b) "Phylogenetic network for European mtDNA" **Am J Hum Genet** 68:1475-84
- Forster P, Harding R, Torroni A, Bandelt HJ. (1996) "Origin and evolution of Native American mtDNA variation: a reappraisal" **Am J Hum Genet** 59:935-45
- Forster P, Torroni A, Renfrew C, Rohl A. (2001) "Phylogenetic star contraction applied to Asian and Papuan mtDNA evolution" **Mol Biol Evol** 18:1864-81
- Forster P, Cali F, Rohl A, Metspalu E, D'Anna R, Mirisola M y otros. (2002) "Continental and subcontinental distributions of mtDNA control region types" **Int J Legal Med** 116:99-108
- Forster P. (2003) "To err is human " **Ann Hum Genet** 67 :2-4
- Francalacci P, Bertranpetit J, Calafell F, Underhill PA. (1996) "Sequence diversity of the control region of mitochondrial DNA in Tuscany and its implications for the peopling of Europe" **Am J Phys Anthropol** 100:443-60
- Frédéric J. (1958) **Arch Biol (Liege)** 69:167
- Fucharoen G, Fucharoen S, Horai S. (2001) "Mitochondrial DNA polymorphisms in Thailand" **J Hum Genet** 46:115-25
- Fuselli S, Tarazona-Santos E, Dupanloup I, Soto A, Luiselli D, Pettener D. (2003) "Mitochondrial DNA diversity in South America and the genetic history of Andean highlanders" **Mol Biol Evol** 20:1682-91
- Garcia-Bour J, Perez-Perez A, Alvarez S, Fernandez E, Lopez-Parra AM, Arroyo-Pardo E y otros. (2004) "Early population differentiation in extinct aborigines from Tierra del Fuego-Patagonia: Ancient mtDNA sequences and Y-Chromosome STR characterization" **Am J Phys Anthropol** 123:361-70
- Ghose C, Perez-Perez GI, Dominguez-Bello MG, Pride DT, Bravi CM, Blaser MJ. (2002) "East Asian genotypes of *Helicobacter pylori* strains in Amerindians provide evidence for its ancient human carriage" **Proc Natl Acad Sci USA** 99:15107-11

Giles RE, Blanc H, Cann HM, Wallace DC. (1980) "Maternal inheritance of human mitochondrial DNA" **Proc Natl Acad Sci USA** 77:6715-9

Gill P, Ivanov PL, Kimpton C, Piercy R, Benson N, Tully G y otros. (1994) "Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis" **Nat Genet** 6:130-5

Ginther C, Corach D, Penacino GA, Rey JA, Carnese FR, Hutz MH y otros. (1993) "Genetic variation among the Mapuche Indians from the Patagonian region of Argentina: mitochondrial DNA sequence variation and allele frequencies of several nuclear genes" En: SD Pena, R Chakraborty, J Eppelen y A Jeffreys (eds). *DNA Fingerprinting: the State of the Science*. Birkhauser, Basel, pp 211-9

Goicoechea AS, Carnese FR, Dejean C, Avena SA, Weimer TA, Franco MH y otros. (2001) "Genetic relationships between Amerindian populations of Argentina" **Am J Phys Anthropol** 115:133-43

Gray MW. (1999) "Evolution of organellar genomes" **Curr Opin Genet Dev** 9:678-87

Green LD, Derr JN, Knight A. (2000) "mtDNA affinities of the peoples of North-Central Mexico" **Am J Hum Genet** 66:989-98

Greenberg BD, Newbold JE, Sugino A. (1983) "Intraspecific nucleotide sequence variability surrounding the origin of replication in human mitochondrial DNA" **Gene** 21:33-49

Greenberg J, Turner II C, Zegura S. (1986) "The Settlement of the Americas: a comparison of the linguistic, dental and genetic evidence" **Current Anthropology** 4:477-497

Greenberg J y Ruhlen M. (1992) "Linguistic Origins of Native Americans" **Scientific American** 267:60-65

Grzybowski T. (2000) "Extremely high levels of human mitochondrial DNA heteroplasmy in single hair roots" **Electrophoresis** 21:548-53

Guidon N y Delibrias G. (1986) "Carbon-14 dates point to man in the Americas 32000 years ago." **Nature** 321:769-771.

Gyllensten U, Wharton D, Josefsson A, Wilson AC. (1991) "Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice see comments]" **Nature** 352:255-7

Hagelberg E, Kayser M, Nagy M, Roewer L, Zimdahl H, Krawczak M y otros. (1999) "Molecular genetic evidence for the human settlement of the Pacific: analysis of mitochondrial DNA, Y chromosome and HLA markers" **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci** 354:141-52

Han JS, Lee DH, Rho HM. (1998) "Characteristics of Hypervariable Regions of Mitochondrial DNA in Korean Population" **Journal of Biochemistry and Molecular Biology** 31:604-606

Handt O, Krings M, Ward RH, Paabo S. (1996) "The retrieval of ancient human DNA sequences" **Am J Hum Genet** 59:368-76

Hanihara, K. (1968) "*Mongoloid dental complex in the permanent dentition*, Proceedings of the VIIth International Congress of Anthropological and Ethnological Sciences, Science Council of Japan, Tokyo

Hasegawa M, Di Rienzo A, Kocher TD, Wilson AC. (1993) "Toward a more accurate time scale for the

human mitochondrial DNA tree" **J Mol Evol** 37:347-54

Hauswirth WW, Dickel CD, Rowold DJ, Hauswirth MA. (1994) "Inter- and intrapopulation studies of ancient humans" **Experientia** 50:585-91

Hayashi J, Takemitsu M, Goto Y, Nonaka I. (1994) "Human mitochondria and mitochondrial genome function as a single dynamic cellular unit" **J Cell Biol** 125:43-50

Hayashi JI, Yonekawa H, Gotoh O, Watanabe J, Tagashira Y. (1978) "Strictly maternal inheritance of rat mitochondrial DNA" **Biochem Biophys Res Commun** 83:1032-8

Hecht NB, Liem H, Kleene KC, Distel RJ, Ho SM. (1984) "Maternal inheritance of the mouse mitochondrial genome is not mediated by a loss or gross alteration of the paternal mitochondrial DNA or by methylation of the oocyte mitochondrial DNA" **Dev Biol** 102:452-61

Herrnstadt C, Elson JL, Fahy E, Preston G, Turnbull DM, Anderson C y otros. (2002) "Reduced-median-network analysis of complete mitochondrial DNA coding-region sequences for the major African, Asian, and European haplogroups" **Am J Hum Genet** 70:1152-71

Hirschfeld L y Hirschfeld H. (1919) "Serological differences between the blood of different races: the result of researches on the Macedonian front" **The Lancet** 194: 675-679

Hoeh WR, Blakley KH, Brown WM. (1991) "Heteroplasmy suggests limited biparental inheritance of Mytilus mitochondrial DNA" **Science** 251:1488-90

Hofmann S, Jaksch M, Bezold R, Mertens S, Aholt S, Paprotta A y otros. (1997) "Population genetics and disease susceptibility: characterization of central European haplogroups by mtDNA gene mutations, correlation with D loop variants and association with disease" **Hum Mol Genet** 6:1835-46

Hogeboom GH y Kupp EL. (1955) "Relation between cell structure and cell chemistry" **Fed Proc** 14:633-8

Hogeboom G, Schneider W, Palade G. (1948) **J Biol Chem** 172:619-635

Holland MM y Parsons TJ. (1999) "Mitochondrial DNA Sequence Analysis - Validation and Use for Forensic Casework." **Forensic Sci Rev** 11:21-50

Horai S y Hayasaka K. (1990) "Intraspecific nucleotide sequence differences in the major noncoding region of human mitochondrial DNA" **Am J Hum Genet** 46:828-42

Horai S, Kondo R, Murayama K, Hayashi S, Koike H, Nakai N. (1991) "Phylogenetic affiliation of ancient and contemporary humans inferred from mitochondrial DNA" **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci** 333:409-16; discussion 416-7

Horai S, Kondo R, Nakagawa-Hattori Y, Hayashi S, Sonoda S, Tajima K. (1993) "Peopling of the Americas, founded by four major lineages of mitochondrial DNA" **Mol Biol Evol** 10:23-47

Horai S, Hayasaka K, Kondo R, Tsugane K, Takahata N. (1995) "Recent African origin of modern humans revealed by complete sequences of hominoid mitochondrial DNAs" **Proc Natl Acad Sci USA** 92:532-6

- Horai S, Murayama K, Hayasaka K, Matsubayashi S, Hattori Y, Fucharoen G y otros. (1996) "mtDNA polymorphism in East Asian Populations, with special reference to the peopling of Japan" **Am J Hum Genet** 59:579-90
- Howell N, Kubacka I, Mackey DA. (1996a) "How rapidly does the human mitochondrial genome evolve?" **Am J Hum Genet** 59:501-9
- Howell N. (1996b) "Mutational analysis of the human mitochondrial genome branches into the realm of bacterial genetics" **Am J Hum Genet** 59:749-55
- Howells, W. W. (1989) "*Skull Shapes and the Map. Craniometric Analyses and the Dispersion of Modern Man.*" Harvard University Press, Cambridge
- Hrdlicka A. (1920) "Shovel-shaped teeth" **Am J Phys Anthropol** 3:429-465
- Huhne J, Pfeiffer H, Brinkmann B. (1999) "Heteroplasmic substitutions in the mtDNA control region in mother and child samples" **Int J Legal Med** 112:27-30
- Huoponen K, Torroni A, Wickman PR, Sellitto D, Gurley DS, Scozzari R y otros. (1997) "Mitochondrial DNA and Y chromosome-specific polymorphisms in the Seminole Tribe of Florida" **Eur J Hum Genet** 5:25-34
- Huoponen K, Schurr TG, Chen Y, Wallace DC. (2001) "Mitochondrial DNA variation in an aboriginal Australian population: evidence for genetic isolation and regional differentiation" **Hum Immunol** 62:954-69
- Hutchinson C, Newbold J, Potter S, Edgell M. (1974) "Maternal inheritance of mammalian mtDNA" **Nature** 251:536-538
- Imaizumi K, Parsons TJ, Yoshino M, Holland MM. (2002) "A new database of mitochondrial DNA hypervariable regions I and II sequences from 162 Japanese individuals" **Int J Legal Med** 116:68-73
- Ingman M, Kaessmann H, Paabo S, Gyllensten U. (2000) "Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans" **Nature** 408:708-13
- Ingman M y Gyllensten U. (2003) "Mitochondrial genome variation and evolutionary history of Australian and New Guinean aborigines" **Genome Res** 13:1600-6
- Isashiki Y, Sonoda S, Izumo S, Sakamoto T, Tachikui H, Inoue I. (2003) "Phylogenetic assessment of the mitochondrial DNA displacement loop haplotype in Japanese patients with Leber's hereditary optic neuropathy harboring the mitochondrial DNA G11778A mutation" **Ophthalmic Res** 35:224-31
- Ishida H. (1993) "Population affinities of the Peruvian with Siberians and North Americans: a nonmetric cranial approach." **Anthropological Science** 101:47-64
- Ivanov PL, Wadhams MJ, Roby RK, Holland MM, Weedn VW, Parsons TJ. (1996) "Mitochondrial DNA sequence heteroplasmy in the Grand Duke of Russia Georgij Romanov establishes the authenticity of the remains of Tsar Nicholas II" **Nature Genet** 12:417-20
- Jazin E, Soodyall H, Jalonon P, Lindholm E, Stoneking M, Gyllensten U. (1998) "Mitochondrial mutation rate revisited: hot spots and polymorphism" **Nature Genet** 18:109-10

John SW, Weitzner G, Rozen R, Scriver CR. (1991) "A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes" **Nucleic Acids Res** 19:408

Johnson MJ, Wallace DC, Ferris SD, Rattazzi MC, Cavalli-Sforza LL. (1983) "Radiation of human mitochondria DNA types analyzed by restriction endonuclease cleavage patterns" **J Mol Evol** 19:255-71

Jun AS, Brown MD, Wallace DC. (1994) "A mitochondrial DNA mutation at nucleotide pair 14459 of the NADH dehydrogenase subunit 6 gene associated with maternally inherited Leber hereditary optic neuropathy and dystonia" **Proc Natl Acad Sci USA** 91:6206-10

Kaessmann H, Zollner S, Gustafsson AC, Wiebe V, Laan M, Lundeberg J y otros. (2002) "Extensive linkage disequilibrium in small human populations in Eurasia" **Am J Hum Genet** 70:673-85

Kalman B, Lublin FD, Alder H. (1996) "Characterization of the mitochondrial DNA in patients with multiple sclerosis" **J Neurol Sci** 140:75-84

Kamboh MI y Ferrell RE. (1987) "Human transferrin polymorphism" **Hum Hered** 37:65-81

Kaneda H, Hayashi J, Takahama S, Taya C, Lindahl KF, Yonekawa H. (1995) "Elimination of paternal mitochondrial DNA in intraspecific crosses during early mouse embryogenesis" **Proc Natl Acad Sci USA** 92:4542-6

Kaufman L, Carnese FR, Goicoechea A, Dejean C, Salzano FM, Hutz MH. (1998) "Beta-globin gene cluster haplotypes in the Mapuche Indians of Argentina" **Genet Mol Biol** 21:435-437

Kaufmann, T. y Golla, V. (2000) "Language groupings in the New World: their reliability and usability in cross-disciplinary studies" **En: Renfrew, Colin, ed(s). *America Past, America Present: Genes and Languages in the Americas and Beyond*, McDonald Intitute for Archaeological Research, Cambridge, UK**

Karafet TM, Zegura SL, Posukh O, Osipova L, Bergen A, Long J y otros. (1999) "Ancestral Asian source(s) of new world Y-chromosome founder haplotypes" **Am J Hum Genet** 64:817-31

Kennedy E y Lehninger A. (1949) **J Biol Chem** 179:957-972

Keyeux G, Rodas C, Gelvez N, Carter D. (2002) "Possible migration routes into South America deduced from mitochondrial DNA studies in Colombian Amerindian populations" **Hum Biol** 74:211-33

Keyser-Tracqui C, Crubezy E, Ludes B. (2003) "Nuclear and mitochondrial DNA analysis of a 2,000-year-old necropolis in the Egyin Gol Valley of Mongolia" **Am J Hum Genet** 73:247-60

Kingsbury B. (1912) **Anat Record** 6:39-52

Kittles RA, Bergen AW, Urbanek M, Virkkunen M, Linnoila M, Goldman D y otros. (1999) "Autosomal, mitochondrial, and Y chromosome DNA variation in Finland: evidence for a male-specific bottleneck" **Am J Phys Anthropol** 108:381-99

Kivisild T, Tolk HV, Parik J, Wang Y, Papiha SS, Bandelt HJ y otros. (2002) "The emerging limbs and twigs of the East Asian mtDNA tree" **Mol Biol Evol** 19:1737-51

- Kobayashi Y, Momoi MY, Tominaga K, Shimoizumi H, Nihei K, Yanagisawa M y otros. (1991) "Respiration-deficient cells are caused by a single point mutation in the mitochondrial tRNA-Leu (UUR) gene in mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes (MELAS)" **Am J Hum Genet** 49:590-9
- Kolman CJ, Bermingham E, Cooke R, Ward RH, Arias TD, Guionneau-Sinclair F. (1995) "Reduced mtDNA diversity in the Ngobe Amerinds of Panama" **Genetics** 140:275-83
- Kolman CJ, Sambuughin N, Bermingham E. (1996) "Mitochondrial DNA analysis of Mongolian populations and implications for the origin of New World founders" **Genetics** 142:1321-34
- Kolman CJ y Bermingham E. (1997) "Mitochondrial and nuclear DNA diversity in the Choco and Chibcha Amerinds of Panama" **Genetics** 147:1289-302
- Kondo R, Satta Y, Matsuura ET, Ishiwa H, Takahata N, Chigusa SI. (1990) "Incomplete maternal transmission of mitochondrial DNA in *Drosophila*" **Genetics** 126:657-63
- Kondo R, Matsuura ET, Chigusa SI. (1992) "Further observation of paternal transmission of *Drosophila* mitochondrial DNA by PCR selective amplification method" **Genet Res** 59:81-4
- Kong QP, Yao YG, Sun C, Bandelt HJ, Zhu CL, Zhang YP . (2003a) "Phylogeny of east Asian mitochondrial DNA lineages inferred from complete sequences" **Am J Hum Genet** 73:671-6
- Kong QP, Yao YG, Liu M, Shen SP, Chen C, Zhu CL y otros. (2003b) "Mitochondrial DNA sequence polymorphisms of five ethnic populations from northern China" **Hum Genet** 113:391-405
- Koyama H, Iwasa M, Maeno Y, Tsuchimochi T, Isobe I, Seko-Nakamura Y y otros. (2002) "Mitochondrial sequence haplotype in the Japanese population" **Forensic Sci Int** 125:93-6
- Krings M, Stone A, Schmitz RW, Krainitzki H, Stoneking M, Paabo S. (1997) "Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans" **Cell** 90:19-30
- Krings M, Salem AE, Bauer K, Geisert H, Malek AK, Chaix L y otros. (1999) "mtDNA analysis of Nile River Valley populations: A genetic corridor or a barrier to migration?" **Am J Hum Genet** 64:1166-76
- Krings M, Capelli C, Tschentscher F, Geisert H, Meyer S, von Haeseler A y otros. (2000) "A view of Neandertal genetic diversity" **Nature Genet** 26:144-6
- Kroon AM. (1963) "Protein synthesis in heart mitochondria. I. Amino acid incorporation into the protein of isolated beefheart mitochondria and fractions derived from them by sonic oscillation" **Biochim Biophys Acta** 72:391-402
- Kunkel TA y Loeb LA. (1981) "Fidelity of mammalian DNA polymerases" **Science** 213:765-7
- Lalueza Fox C. (1996) "Mitochondrial DNA Haplogroups in Four Tribes from Tierra del Fuego-Patagonia: Inferences about the Peopling of the Americas" **Hum Biol** 68:853-71
- Lalueza-Fox C, Gilbert MT, Martinez-Fuentes AJ, Calafell F, Bertranpetit J. (2003) "Mitochondrial DNA from pre-Columbian Ciboneys from Cuba and the prehistoric colonization of the Caribbean" **Am J Phys Anthropol** 121:97-108

Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J y otros. (2001) "Initial sequencing and analysis of the human genome" **Nature** 409:860-921

Landsteiner K. (1901) "Ueber Agglutinationserscheinungen normalen menschlichen Blutes." **Wiener Klinische Wochenschrift** 14:1132-1134

Lang BF, Burger G, O'Kelly CJ, Cedergren R, Golding GB, Lemieux C y otros. (1997) "An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature" **Nature** 387:493-7

Lang BF, Gray MW, Burger G. (1999) "Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes" **Annu Rev Genet** 33: 351-97

Layrisse M y Arends T. (1956) "High incidence Blood Group found in Venezuelan Indians" **Science** 123:633

Layrisse, M and Wilbert, J. (1999) "*The Diego Blood Group System and the Mongoloid Realm*" Fundación La Salle de Ciencias Naturales. Instituto Caribe de Antropología y Sociología, Caracas.

Lederberg J. (1952) "Cell genetics and hereditary symbiosis" **Physiol Rev** 32:403-30

Lee SD, Shin CH, Kim KB, Lee YS, Lee JB. (1997) "Sequence variation of mitochondrial DNA control region in Koreans " **Forensic Sci Int** 87:99-116

Lell JT, Brown MD, Schurr TG, Sukernik RI, Starikovskaya YB, Torroni A y otros. (1997) "Y chromosome polymorphisms in native American and Siberian populations: identification of native American Y chromosome haplotypes" **Hum Genet** 100:536-43

Lell JT, Sukernik RI, Starikovskaya YB, Su B, Jin L, Schurr TG y otros. (2002) "The dual origin and Siberian affinities of Native American Y chromosomes" **Am J Hum Genet** 70:192-206

Lleonart R, Riego E, Rodríguez-Suárez R y otros (1999) "Analyses of DNA from ancient bones of a pre-Columbian Cuban woman and a child." **Genet Mol Biol** 22:285-289

Genet Mol Biol 22:285-289 Lertrit P, Noer AS, Jean-Francois MJ, Kapsa R, Dennett X, Thyagarajan D y otros. (1992) "A new disease-related mutation for mitochondrial encephalopathy lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS) syndrome affects the ND4 subunit of the respiratory complex I" **Am J Hum Genet** 51:457-68

Levine P, Koch EA, McGee R, Hill GH. (1954) "Rare human isoagglutinins and their identification" **Amer J Clin Pathol** 24:292-303

Lewis M y Lewis W. (1914) **Am J Anat** 17:339-401

Lindholm E, Cavelier L, Howell WM, Eriksson I, Jalonen P, Adolfsson R y otros. (1997) "Mitochondrial sequence variants in patients with schizophrenia" **Eur J Hum Genet** 5:406-12

Lorenz JG y Smith DG. (1997) "Distribution of sequence variation in the mtDNA control region of Native North Americans" **Hum Biol** 69:749-76

Luck DJ. (1963) "Formation of mitochondria in *Neurospora crassa*. A quantitative radioautographic study" **J Cell Biol** 16:483-99

- Luck DJ y Reich E. (1964) "DNA in mitochondria of *Neurospora crassa* " **Proc Natl Acad Sci USA** 52:931-8
- Lum JK, Rickards O, Ching C, Cann RL. (1994) "Polynesian mitochondrial DNAs reveal three deep maternal lineage clusters" **Hum Biol** 66:567-90
- Lum JK, Cann RL, Martinson JJ, Jorde LB. (1998) "Mitochondrial and nuclear genetic relationships among Pacific Island and Asian populations" **Am J Hum Genet** 63:613-24
- Lutz S, Weisser HJ, Heizmann J, Pollak S. (1997) "A third hypervariable region in the human mitochondrial D-loop" **Hum Genet** 101:384
- Maca-Meyer N, Gonzalez AM, Larruga JM, Flores C, Cabrera VM. (2001) "Major genomic mitochondrial lineages delineate early human expansions" **BMC Genet** 2:13
- Maca-Meyer N, Gonzalez AM, Pestano J, Flores C, Larruga JM, Cabrera VM. (2003) "Mitochondrial DNA transit between West Asia and North Africa inferred from U6 phylogeography" **BMC Genet** 4:15
- Macaulay V, Richards M, Hickey E, Vega E, Cruciani F, Guida V y otros. (1999) "The emerging tree of West Eurasian mtDNAs: a synthesis of control-region sequences and RFLPs" **Am J Hum Genet** 64:232-49
- Macaulay VA, Richards MB, Forster P, Bendall KE, Watson E, Sykes B y otros. (1997) "mtDNA mutation rates--no need to panic" **Am J Hum Genet** 61:983-90
- Malhi RS, Schultz BA, Smith DG. (2001) "Distribution of mitochondrial DNA lineages among Native American tribes of Northeastern North America" **Hum Biol** 73:17-55
- Malhi RS y Smith DG. (2002) "Brief communication: Haplogroup X confirmed in prehistoric North America" **Am J Phys Anthropol** 119:84-6
- Malhi RS, Mortensen HM, Eshleman JA, Kemp BM, Lorenz JG, Kaestle FA y otros. (2003) "Native American mtDNA prehistory in the American Southwest" **Am J Phys Anthropol** 120:108-24
- Malhi RS, Breece KE, Shook BA, Kaestle FA, Chatters JC, Hackenberger S y otros. (2004) "Patterns of mtDNA diversity in northwestern North America" **Hum Biol** 76:33-54
- Malyarchuk BA, Grzybowski T, Derenko MV, Czarny J, Drobic K, Miscicka-Sliwka D. (2003) "Mitochondrial DNA variability in Bosnians and Slovenians" **Ann Hum Genet** 67:412-25
- Margulis, L. (1970) "Origin of Eukaryotic Cells " Yale University Press, New Haven, USA.
- Margulis L. (1971) "The origin of plant and animal cells" **Am Sci** 59:230-5
- Marr A. (1960) "Enzyme localization in bacteria" **Annu Rev Microbiol** 14:241-60
- Martin EM y Morton RK. (1956) "The chemical composition of microsomes and mitochondria from silver beet" **Biochem J** 64:221-35
- Martinez-Cruzado JC, Toro-Labrador G, Ho-Fung V, Estevez-Montero MA, Lobaina-Manzanet A, Padovani-Claudio DA y otros. (2001) "Mitochondrial DNA analysis reveals substantial Native

American ancestry in Puerto Rico" **Hum Biol** 73:491-511

Martinez-Marignac VL, B ravi C.M. , Bianchi N.O. (1999) "Estudio del ADN mitocondrial de una muestra de la ciudad de La Plata" **Rev Arg Antropol Biol** 2:281-300

Maruyama S, Minaguchi K, Saitou N. (2003) "Sequence polymorphisms of the mitochondrial DNA control region and phylogenetic analysis of mtDNA lineages in the Japanese population" **Int J Legal Med** 117:218-25

Marzuki S, Noer AS, Lertrit P, Thyagarajan D, Kapsa R, Utthanaphol P y otros. (1991) "Normal variants of human mitochondrial DNA and translation products: the building of a reference data base" **Hum Genet** 88:139-45

Mazza S y Francke I. (1927) "Grupos sanguíneos de indios y autóctonos del norte argentino" **Prensa Médica Argentina** 14:408-9

Melton T, Clifford S, Martinson J, Batzer M, Stoneking M. (1998) "Genetic evidence for the proto-Austronesian homeland in Asia: mtDNA and nuclear DNA variation in Taiwanese aboriginal tribes" **Am J Hum Genet** 63:1807-23

Meltzer, D.J. (1994) "The discovery of deep time: a history of views on the peopling of the Americas. " **En:** R. Bonnichsen, R. and Steele, D. G., ed(s). *Method and theory for investigating the peopling of the Americas*, Center for the Study of the First Americans, Corvallis, OR

Merriwether DA y Ferrell RE. (1996) "The four founding lineage hypothesis for the New World: a critical reevaluation" **Mol Phylogenet Evol** 5:241-6

Merriwether DA, Hall WW, Vahlne A, Ferrell RE. (1996) "mtDNA variation indicates Mongolia may have been the source for the founding population for the New World" **Am J Hum Genet** 59:204-12

Merriwether, D.A., Kemp, B.M., Crews, D.E., Neel, J.V. (2000) "Gene flow and genetic variation in the Yanomama as revealed by mtDNA" **En:** Renfrew, Colin, ed(s). *America Past, America Present: Genes and Languages in the Americas and Beyond*, McDonald Intitute for Archaeological Research, Cambridge, UK

Mesa NR, Mondragon MC, Soto ID, Parra MV, Duque C, Ortiz-Barrientos D y otros. (2000) "Autosomal, mtDNA, and Y-chromosome diversity in Amerinds: pre- and post-Columbian patterns of gene flow in South America" **Am J Hum Genet** 67:1277-86

Meyer S, Weiss G, von Haeseler A. (1999) "Pattern of nucleotide substitution and rate heterogeneity in the hypervariable regions I and II of human mtDNA" **Genetics** 152:1103-10

Michaelis L. (1900) **Arch Mikrobiol Anat Entwicklungsmech** 55: 558-575

Michaels GS, Hauswirth WW, Laipis PJ. (1982) "Mitochondrial DNA copy number in bovine oocytes and somatic cells " **Dev Biol** 94:246-51

Miotti L y Salemme M. (2003) "When Patagonia was colonized: people mobility at high latitudes during Pleistocene/Holocene transition" **Quat Int** 109-110:95-111

Mishmar D, Ruiz-Pesini E, Golik P, Macaulay V, Clark AG, Hosseini S y otros. (2003) "Natural

- selection shaped regional mtDNA variation in humans" **Proc Natl Acad Sci USA** 100:171-6
- Monnat RJ Jr y Loeb LA. (1985) "Nucleotide sequence preservation of human mitochondrial DNA" **Proc Natl Acad Sci USA** 82:2895-9
- Monnat RJ Jr y Reay DT. (1986) "Nucleotide sequence identity of mitochondrial DNA from different human tissues" **Gene** 43:205-11
- Monsalve MV, Cardenas F, Guhl F, Delaney AD, Devine DV. (1996) "Phylogenetic analysis of mtDNA lineages in South American mummies" **Ann Hum Genet** 60 (Pt 4):293-303
- Monsalve MV, Stone AC, Lewis CM, Rempel A, Richards M, Straathof D y otros. (2002) "Brief communication: molecular analysis of the Kwaday Dan Ts'finchi ancient remains found in a glacier in Canada" **Am J Phys Anthropol** 119:288-91
- Monson KL, Miller KWP, Wilson MR, DiZinno JA, Budowle B. (2002) "The mtDNA Population Database: an integrated software and database resource for forensic comparison" **Forensic Science Communications** 4, http://www.fbi.gov/hq/lab/fsc/back_issu/april2002/miller1.htm
- Moraga ML, Rocco P, Miquel JF, Nervi F, Llop E, Chakraborty R y otros. (2000) "Mitochondrial DNA polymorphisms in Chilean aboriginal populations: implications for the peopling of the southern cone of the continent" **Am J Phys Anthropol** 113:19-29
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. (1986) "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction" **Cold Spring Harb Symp Quant Biol** 51 Pt 1:263-73
- Mumm S, Whyte MP, Thakker RV, Buetow KH, Schlessinger D. (1997) "mtDNA analysis shows common ancestry in two kindreds with X-linked recessive hypoparathyroidism and reveals a heteroplasmic silent mutation" **Am J Hum Genet** 60:153-9
- Murray-McIntosh RP, Scrimshaw BJ, Hatfield PJ, Penny D. (1998) "Testing migration patterns and estimating founding population size in Polynesia by using human mtDNA sequences" **Proc Natl Acad Sci USA** 95 :9047-52
- Nagai A, Nakamura I, Shiraki F, Bunai Y, Ohya I. (2003) "Sequence polymorphism of mitochondrial DNA in Japanese individuals from Gifu Prefecture" **Leg Med (Tokyo)** 5 Suppl 1:S210-3
- Nass MM, Nass S, Afzelius BA. (1965) "The general occurrence of mtDNA" **Exp Cell Res** 37:516-39
- Nass S y Nass MM. (1963) "Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. II. Enzymatic and other hydrolytic treatments" **J Cell Biol** 19:613-29
- Nata M, Adachi N, Hashiyada M, Kanetake J, Ji G, Mimasaka S y otros. (1999) "Sequence Polymorphism of the D-loop of Mitochondrial DNA in Japanese and Chinese Populations" **Acta Crim. Japon.** 65:244-254
- Nettle D. (1999) "Linguistic diversity of the Americas can be reconciled with a recent colonization" **Proc Natl Acad Sci USA** 96 :3325-9
- Neves WA y Pucciarelli HM. (1989) "Extracontinental biological relationships of early South American human remains: a multivariate analysis." **Ciencia e Cultura** 41:566-575

- Neves WA y Pucciarelli HM. (1991) "Morphological affinities of the first Americans: an exploratory analysis based on early South American human remains." **J Hum Evol** 21:261-273
- Neves WA, Powell JF, Ozolins EG. (1999) "Modern human origins as seen from the peripheries" **J Hum Evol** 37:129-33
- Nichols J. (1990) "Linguistic evidence and the First Settlement of the New World" **Language** 66:475-521
- Nichols J. (1997) "Modelling ancient population structures and movement in Linguistics" **Annu Rev Anthropol** 26:359-384
- Nishino I, Seki A, Maegaki Y, Takeshita K, Horai S, Nonaka I y otros. (1996) "A novel mutation in the mitochondrial tRNA(Thr) gene associated with a mitochondrial encephalomyopathy" **Biochem Biophys Res Commun** 225:180-5
- Noer AS, Sudoyo H, Lertrit P, Thyagarajan D, Utthanaphol P, Kapsa R y otros. (1991) "A tRNA(Lys) mutation in the mtDNA is the causal genetic lesion underlying myoclonic epilepsy and ragged-red fiber (MERRF) syndrome" **Am J Hum Genet** 49:715-22
- Novotny EJ Jr, Singh G, Wallace DC, Dorfman LJ, Louis A, Sogg RL y otros. (1986) "Leber's disease and dystonia: a mitochondrial disease" **Neurology** 36:1053-60
- Ohira H y Yamada Y. (1999) "Advantages of dental mitochondrial DNA for detection and classification of the sequence variation using restriction fragment length polymorphisms" **Am J Forensic Med Pathol** 20:261-8
- Ohlenbusch A, Wilichowski E, Hanefeld F. (1998a) "Characterization of the mitochondrial genome in childhood multiple sclerosis. I. Optic neuritis and LHON mutations" **Neuropediatrics** 29:175-9
- Ohlenbusch A, Wilichowski E, Hanefeld F. (1998b) "Characterization of the mitochondrial genome in childhood multiple sclerosis. III. Multiple sclerosis without optic neuritis and the non-LHON-associated genes" **Neuropediatrics** 29:313-9
- Ojala D, Montoya J, Attardi G. (1981) "tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria" **Nature** 290:470-4
- Oota H, Saitou N, Matsushita T, Ueda S. (1995) "A genetic study of 2,000-year-old human remains from Japan using mitochondrial DNA sequences" **Am J Phys Anthropol** 98:133-45
- Oota H, Saitou N, Matsushita T, Ueda S. (1999) "Molecular genetic analysis of remains of a 2,000-year-old human population in China-and its relevance for the origin of the modern Japanese population" **Am J Hum Genet** 64:250-8
- Oota H, Settheetham-Ishida W, Tiwawech D, Ishida T, Stoneking M. (2001) "Human mtDNA and Y-chromosome variation is correlated with matrilineal versus patrilineal residence" **Nature Genet** 29:20-1
- Oota H, Kitano T, Jin F, Yuasa I, Wang L, Ueda S y otros. (2002) "Extreme mtDNA homogeneity in continental Asian populations" **Am J Phys Anthropol** 118:146-53
- Ovchinnikov I, Buzhilova A, Mednikova M, Goodwin W, Curry G. (1999) "Ethnic affinities of the

ancient human Jety-Asar population by mitochondrial DNA analysis" **Electrophoresis** 20:1729-32

Owen R. (2000) "Karl Landsteiner and the first human marker locus" **Genetics** 155:995-8

Ozawa T, Tanaka M, Ino H, Ohno K, Sano T, Wada Y y otros. (1991a) "Distinct clustering of point mutations in mitochondrial DNA among patients with mitochondrial encephalomyopathies and with Parkinson's disease" **Biochem Biophys Res Commun** 176:938-46

Ozawa T, Tanaka M, Sugiyama S, Ino H, Ohno K, Hattori K y otros. (1991b) "Patients with idiopathic cardiomyopathy belong to the same mitochondrial DNA gene family of Parkinson's disease and mitochondrial encephalomyopathy" **Biochem Biophys Res Commun** 177:518-25

Ozawa T. (1994) "Mitochondrial cardiomyopathy" **Herz** 19:105-18, 125

Ozawa T, Katsumata K, Hayakawa M, Tanaka M, Sugiyama S, Tanaka T y otros. (1995) "Genotype and phenotype of severe mitochondrial cardiomyopathy: a recipient of heart transplantation and the genetic control" **Biochem Biophys Res Commun** 207:613-20

Ozawa T. (1995a) "Mitochondrial DNA mutations associated with aging and degenerative diseases" **Exp Gerontol** 30:269-90

Ozawa T. (1995b) "Mechanism of somatic mitochondrial DNA mutations associated with age and diseases" **Biochim Biophys Acta** 1271:177-89

Ozawa T. (1997) "Genetic and functional changes in mitochondria associated with aging" **Physiol Rev** 77:425-64

Paabo S. (1996) "Mutational hot spots in the mitochondrial microcosm" **Am J Hum Genet** 59:493-6

Pakendorf B, Wiebe V, Tarskaia LA, Spitsyn VA, Soodyall H, Rodewald A y otros. (2003) "Mitochondrial DNA evidence for admixed origins of central Siberian populations" **Am J Phys Anthropol** 120:211-24

Palade G. (1952) **Anat Rec** 114:427-451

Parenti F, Fontugue M, Guerin C. (1996) "Pedra Furada in Brazil and its 'presumed' evidence: Limitations and potential of the available data." **Antiquity** 70:416-421

Parsons TJ, Muniec DS, Sullivan K, Woodyatt N, Alliston-Greiner R, Wilson MR y otros. (1997) "A high observed substitution rate in the human mitochondrial DNA control region" **Nature Genet** 15:363-8

Passarino G, Semino O, Modiano G, Bernini LF, Santachiara Benerecetti AS. (1996) "mtDNA provides the first known marker distinguishing proto-Indians from the other Caucasoids; it probably predates the diversification between Indians and Orientals" **Ann Hum Biol** 23:121-6

Pauling L, Itano H, Singer S, Wells I. (1949) "Sickle cell anemia: A molecular disease." **Science** 110:543

Pena SD, Santos FR, Bianchi NO, Bravi CM, Carnese FR, Rothhammer F y otros. (1995) "A major founder Y-chromosome haplotype in Amerindians" **Nature Genet** 11:15-6

- Pesole G, Sbisa E, Preparata G, Saccone C. (1992) "The evolution of the mitochondrial D-loop region and the origin of modern man" **Mol Biol Evol** 9:587-98
- Pesole G, Gissi C, De Chirico A, Saccone C. (1999) "Nucleotide substitution rate of mammalian mitochondrial genomes" **J Mol Evol** 48:427-34
- Pfeiffer H, Steighner R, Fisher R, Mornstad H, Yoon CL, Holland MM. (1998) "Mitochondrial DNA extraction and typing from isolated dentin-experimental evaluation in a Korean population" **Int J Legal Med** 111:309-13
- Poinar HN, Kuch M, Sobolik KD, Barnes I, Stankiewicz AB, Kuder T y otros. (2001) "A molecular analysis of dietary diversity for three archaic Native Americans" **Proc Natl Acad Sci USA** 98:4317-22
- Powell J, Neves WA, Ozolins E, Pucciarelli H. (1999) "Afinidades biológicas extra-continetales de los dos esqueletos más antiguos de América: implicaciones para el poblamiento del Nuevo Mundo" **Antropol Fis Latinoamer** 2:7-22
- Powell JF y Neves WA. (1999) "Craniofacial morphology of the first Americans: Pattern and process in the peopling of the New World" **Am J Phys Anthropol** Suppl 29:153-88
- Prasad BV, Ricker CE, Watkins WS, Dixon ME, Rao BB, Naidu JM y otros. (2001) "Mitochondrial DNA variation in Nicobarese Islanders" **Hum Biol** 73:715-25
- Puzyrev VP, Stepanov VA, Golubenko MV, Puzyrev KV, Maksimova NR, Khar'kov VN y otros. (2003) "MtDNA and Y-chromosome lineages in the Yakut population" **Russian J Genet** 39:816-22
- Qian YP, Chu ZT, Dai Q, Wei CD, Chu JY, Tajima A y otros. (2001) "Mitochondrial DNA polymorphisms in Yunnan nationalities in China" **J Hum Genet** 46:211-20
- Quintana-Murci L, Semino O, Bandelt HJ, Passarino G, McElreavey K, Santachiara-Benerecetti AS. (1999) "Genetic evidence of an early exit of Homo sapiens sapiens from Africa through eastern Africa" **Nature Genet** 23:437-41
- Raimond R, Marcade I, Bouchon D, Rigaud T, Bossy JP, Souty-Grosset C. (1999) "Organization of the large mitochondrial genome in the isopod *Armadillidium vulgare*" **Genetics** 151:203-10
- Rando JC, Pinto F, Gonzalez AM, Hernandez M, Larruga JM, Cabrera VM y otros. (1998) "Mitochondrial DNA analysis of northwest African populations reveals genetic exchanges with European, near-eastern, and sub-Saharan populations" **Ann Hum Genet** 62 (Pt 6):531-50
- Rao L, Wu MY, Liang WB, Zhang L. (2003) "Sequence polymorphisms of the mitochondrial DNA control region in 105 Chinese Han population" **J Forensic Sci** 48:891-5
- Redd AJ y Stoneking M. (1999) "Peopling of Sahul: mtDNA variation in aboriginal Australian and Papua New Guinean populations" **Am J Hum Genet** 65:808-28
- Reid FM, Vernham GA, Jacobs HT. (1994) "Complete mtDNA sequence of a patient in a maternal pedigree with sensorineural deafness" **Hum Mol Genet** 3:1435-6
- Reidla M, Kivisild T, Metspalu E, Kaldma K, Tambets K, Tolk HV y otros. (2003) "Origin and Diffusion of mtDNA Haplogroup X" **Am J Hum Genet** 73:1178-90

- Ribeiro-dos-Santos AK, Santos SE, Machado AL, Guapindaia V, Zago MA. (1996) "Heterogeneity of mitochondrial DNA haplotypes in Pre-Columbian Natives of the Amazon region" **Am J Phys Anthropol** 101:29-37
- Ribeiro-dos-Santos AK, Pereira JM, Lobato MR, Carvalho BM, Guerreiro JF, Batista Dos Santos SE. (2002) "Dissimilarities in the process of formation of Curiaú, a semi-isolated Afro-Brazilian population of the Amazon region" **Am J Human Biol** 14:440-7
- Ricaud FX, Kolodesnikov S, Keyser-Tracqui C, Alekseev AN, Crubezy E, Ludes B. (2004a) "Genetic analysis of human remains found in two eighteenth century Yakut graves at At-Dabaan" **Int J Legal Med** 118:24-31
- Ricaud FX, Keyser-Tracqui C, Cammaert L, Crubezy E, Ludes B. (2004b) "Genetic analysis and ethnic affinities from two Scytho-Siberian skeletons" **Am J Phys Anthropol** 123:351-60
- Richards M, Corte-Real H, Forster P, Macaulay V, Wilkinson-Herbots H, Demaine A y otros. (1996) "Paleolithic and neolithic lineages in the European mitochondrial gene pool" **Am J Hum Genet** 59:185-203
- Richards M, Macaulay VA, Bandelt HJ, Sykes BC. (1998) "Phylogeography of mitochondrial DNA in western Europe " **Ann Hum Genet** 62 (Pt 3):241-60
- Richards M, Macaulay V, Hickey E, Vega E, Sykes B, Guida V y otros. (2000) "Tracing European founder lineages in the Near Eastern mtDNA pool" **Am J Hum Genet** 67:1251-76
- Rickards O, Martinez-Labarga C, Lum JK, De Stefano GF, Cann RL. (1999) "mtDNA history of the Cayapa Amerinds of Ecuador: detection of additional founding lineages for the Native American populations" **Am J Hum Genet** 65:519-30
- Ris H y Plaut W. (1962) "Ultrastructure of DNA-containing areas in the chloroplast of *Chlamydomonas*" **J Cell Biol** 13:383-91
- Robin ED y Wong R. (1988) "Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells" **J Cell Physiol** 136:507-13
- Rodriguez-Delfin LA, Rubin-de-Celis VE, Zago MA. (2001) "Genetic diversity in an Andean population from Peru and regional migration patterns of Amerindians in South America: data from Y chromosome and mitochondrial DNA" **Hum Hered** 51:97-106
- Rohl A, Brinkmann B, Forster L, Forster P. (2001) "An annotated mtDNA database" **Int J Legal Med** 115:29-39
- Roodyn DB, Suttie JW, Work TS. (1962) "Protein synthesis in mitochondria. 2. Rate of incorporation in vitro of radioactive amino acids into soluble proteins in the mitochondrial fraction, including catalase, malic dehydrogenase and cytochrome c" **Biochem J** 83:29-40
- Rotker, S. (1999) *Cautivas. Olvidos y memoria en la Argentina*. Compañía Editora Espasa-Calpe Argentina / Ariel, Buenos Aires, Argentina.
- Rubicz R, Schurr TG, Babb PL, Crawford MH. (2003) "Mitochondrial DNA variation and the origins of the Aleuts" **Hum Biol** 75 :809-35

Ruhlen, M. (1991) *"A guide to the World Languages"* Stanford University Press, Stanford, California

Ruiz-Linares A, Ortiz-Barrientos D, Figueroa M, Mesa N, Munera JG, Bedoya G y otros. (1999) "Microsatellites provide evidence for Y chromosome diversity among the founders of the New World" **Proc Natl Acad Sci USA** 96:6312-7

Ruiz-Pesini E, Mishmar D, Brandon M, Procaccio V, Wallace DC. (2004) "Effects of purifying and adaptive selection on regional variation in human mtDNA" **Science** 303:223-6

Saccone C, Pesole G, Sbisa E. (1991) "The main regulatory region of mammalian mitochondrial DNA: structure-function model and evolutionary pattern" **J Mol Evol** 33:83-91

Sagan L. (1967) "On the origin of mitosing cells" **J Theor Biol** 14:255-74

Saillard J, Evseeva I, Tranebjerg L, Norby S. (2000a) "Mitochondrial DNA diversity among Nenets" **En: Renfrew, C and Boyle, K, ed(s). Archaeogenetics: DNA and the population prehistory of Europe**, McDonald Institute Monographs

Saillard J, Forster P, Lynnerup N, Bandelt HJ, Norby S. (2000b) "mtDNA variation among Greenland Eskimos: the edge of the Beringian expansion" **Am J Hum Genet** 67:718-26

Sajantila A, Lahermo P, Anttinen T, Lukka M, Sistonen P, Savontaus ML y otros. (1995) "Genes and languages in Europe: an analysis of mitochondrial lineages" **Genome Res** 5:42-52

Salas A, Richards M, De la Fe T, Lareu MV, Sobrino B, Sanchez-Diz P y otros. (2002) "The making of the African mtDNA landscape" **Am J Hum Genet** 71:1082-111

Salzano, F M and Callegari-Jacques, S M. (1988) *South American Indians. A case study in evolution*. Oxford University Press, Oxford, UK

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. (1977) "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors" **Proc Natl Acad Sci USA** 74:5463-7

Santachiara Benerecetti AS, Scozzari R, Semino O, Torroni A, Brega A, Wallace DC. (1988) "Mitochondrial DNA polymorphisms in Italy. II. Molecular analysis of new and rare morphs from Sardinia and Rome" **Ann Hum Genet** 52 (Pt 1):39-56

Santos M, Ward RH, Barrantes R. (1994) "mtDNA variation in the Chibcha Amerindian Huetar from Costa Rica" **Hum Biol** 66:963-77

Santos SE, Ribeiro-Dos-Santos AK, Meyer D, Zago MA. (1996) "Multiple founder haplotypes of mitochondrial DNA in Amerindians revealed by RFLP and sequencing" **Ann Hum Genet** 60 (Pt 4):305-19

Satoh M y Kuroiwa T. (1991) "Organization of multiple nucleoids and DNA molecules in mitochondria of a human cell" **Exp Cell Res** 196:137-40

Sawyer DE y Van Houten B. (1999) "Repair of DNA damage in mitochondria" **Mutat Res** 434:161-76

Sbisa E, Tanzariello F, Reyes A, Pesole G, Saccone C. (1997) "Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and

evolutionary implications" **Gene** 205:125-40

Schatz G, Haslbrunner E, Tuppy H. (1964) "**Biochem Biophys Res Comm** 15:127-132

Schmitt R, Bonatto SL, Freitas LB, Muschner VC, Hill K, Hurtado AM y otros. (2004) "Extremely limited mitochondrial DNA variability among the Ache Natives of Paraguay" **Ann Hum Biol** 31:87-94

Schurr TG, Ballinger SW, Gan YY, Hodge JA, Merriwether DA, Lawrence DN y otros. (1990) "Amerindian mitochondrial DNAs have rare Asian mutations at high frequencies, suggesting they derived from four primary maternal lineages" **Am J Hum Genet** 46:613-23

Schurr TG, Sukernik RI, Starikovskaya YB, Wallace DC. (1999) "Mitochondrial DNA variation in Koryaks and Itel'men: population replacement in the Okhotsk Sea-Bering Sea region during the Neolithic" **Am J Phys Anthropol** 108:1-39

Schwartz F, Baldwin CT, Baima J, Gavras H. (1999) "Mitochondrial DNA mutations in patients with orthostatic hypotension" **Am J Med Genet** 86:145-50

Scott G y Turner II CI. (1988) "Dental Anthropology" **Annu Rev Anthropol** 17:99-126

Scozzari R, Torroni A, Semino O, Sirugo G, Brega A, Santachiara-Benerecetti AS. (1988) "Genetic studies on the Senegal population I. Mitochondrial DNA polymorphisms" **Am J Hum Genet** 43:534-44

Seo Y, Stradmann-Bellinghausen B, Rittner C, Takahama K, Schneider PM. (1998) "Sequence polymorphism of mitochondrial DNA control region in Japanese" **Forensic Sci Int** 97:155-64

Shadel GS y Clayton DA. (1997) "Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates" **Annu Rev Biochem** 66:409-35

Shields GF, Schmiechen AM, Frazier BL, Redd A, Voevoda MI, Reed JK y otros. (1993) "mtDNA sequences suggest a recent evolutionary divergence for Beringian and northern North American populations" **Am J Hum Genet** 53:549-62

Shinoda K y Kunisada T. (1994) "Analysis of Ancient Japanese Society through Mitochondrial DNA Sequencing" **Int J Osteoarchaeol** 4:291-297

Shinoda K y Kanai S. (1999) "Intracemetery Genetic Analysis at the Nakazuma Jomon Site in Japan by Mitochondrial DNA Sequencing" **Anthropological Science** 107:129-140

Sigurgardottir S, Helgason A, Gulcher JR, Stefansson K, Donnelly P. (2000) "The mutation rate in the human mtDNA control region" **Am J Hum Genet** 66:1599-609

Simon DK, Pulst SM, Sutton JP, Browne SE, Beal MF, Johns DR. (1999) "Familial multisystem degeneration with parkinsonism associated with the 11778 mitochondrial DNA mutation" **Neurology** 53: 1787-93

Smith DG, Malhi RS, Eshleman J, Lorenz JG, Kaestle FA. (1999) "Distribution of mtDNA haplogroup X among Native North Americans" **Am J Phys Anthropol** 110:271-84

Smith DG, Lorenz J, Rolfs BK, Bettinger RL, Green B, Eshleman J y otros. (2000) "Implications of the distribution of Albumin Naskapi and Albumin Mexico for new world prehistory" **Am J Phys**

Anthropol 111:557-72

Snall N, Savontaus ML, Kares S, Lee MS, Cho EK, Rinne JO y otros. (2002) "A rare mitochondrial DNA haplotype observed in Koreans" **Hum Biol** 74:253-62

Soodyall H, Jenkins T, Mukherjee A, du Toit E, Roberts DF, Stoneking M. (1997) "The founding mitochondrial DNA lineages of Tristan da Cunha Islanders" **Am J Phys Anthropol** 104:157-66

Starikovskaya YB, Sukernik RI, Schurr TG, Kogelnik AM, Wallace DC. (1998) "mtDNA diversity in Chukchi and Siberian Eskimos: implications for the genetic history of Ancient Beringia and the peopling of the New World" **Am J Hum Genet** 63:1473-91

Steele DG y Powell JF. (1992) "Peopling of the Americas: paleobiological evidence." **Hum Biol** 64:303-336.

Steele, D. y Powell, J. (2002) "Facing the past: a view of the North American human fossil record" **En: Jablonski, NG, ed(s). *The First Americans: The Pleistocene Colonization of the New World*, Memoirs of the California Academy of Sciences 27, University of California Press,**

Stone AC y Stoneking M. (1993) "Ancient DNA from a pre-Columbian Amerindian population" **Am J Phys Anthropol** 92:463-71

Stone AC y Stoneking M. (1998) "mtDNA analysis of a prehistoric Oneota population: implications for the peopling of the New World" **Am J Hum Genet** 62:1153-70

Stoneking M, Bhatia K, Wilson AC. (1986) "Rate of sequence divergence estimated from restriction maps of mitochondrial DNAs from Papua New Guinea" **Cold Spring Harb Symp Quant Biol** 51 Pt 1:433-9

Stoneking M, Sherry ST, Redd AJ, Vigilant L. (1992) "New approaches to dating suggest a recent age for the human mtDNA ancestor" **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci** 337:167-75

Sutovsky P, Moreno RD, Ramalho-Santos J, Dominko T, Simerly C, Schatten G. (1999) "Ubiquitin tag for sperm mitochondria" **Nature** 402:371-2

Sutovsky P, Moreno RD, Ramalho-Santos J, Dominko T, Simerly C, Schatten G. (2000) "Ubiquitinated sperm mitochondria, selective proteolysis, and the regulation of mitochondrial inheritance in mammalian embryos" **Biol Reprod** 63:582-90

Sykes B, Leiboff A, Low-Beer J, Tetzner S, Richards M. (1995) "The origins of the Polynesians: an interpretation from mitochondrial lineage analysis" **Am J Hum Genet** 57:1463-75

Sykes B. (1999) "The molecular genetics of European ancestry" **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci** 354:131-8; discussion 138-9

Szathmary EJ. (1984) "Peopling of northern North America: clues from genetic studies" **Acta Anthropogenet** 8:79-109

Szathmáry EJE. (1993) "Genetics of aboriginal North Americans." **Evol Anthropol** 1:202-220

- Szollósi D. (1965) "The fate of sperm middle-piece mitochondria in the rat egg" **J Exp Zool** 159:367-377
- Tajima A, Sun CS, Pan IH, Ishida T, Saitou N, Horai S. (2003) "Mitochondrial DNA polymorphisms in nine aboriginal groups of Taiwan: implications for the population history of aboriginal Taiwanese" **Hum Genet** 113:24-33
- Tajima A, Hayami M, Tokunaga K, Juji T, Matsuo M, Marzuki S y otros. (2004) "Genetic origins of the Ainu inferred from combined DNA analyses of maternal and paternal lineages" **J Hum Genet** 49:187-193
- Takada Y y Mukaida M. (1996) "Mitochondrial DNA Polymorphism in Japanese (Report 1)" **Acta Crim. Japon.** 62:42-47
- Tamura K y Nei M. (1993) "Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees" **Mol Biol Evol** 10:512-26
- Tanaka M, Ino H, Ohno K, Ohbayashi T, Ikebe S, Sano T y otros. (1991) "Mitochondrial DNA mutations in mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS)" **Biochem Biophys Res Commun** 174:861-8
- Tanaka M, Cabrera VM, González AM, Larruga JM, Takeyasu T y otros. (2004) "Mitochondrial Genome Variation in Eastern Asia and the Peopling of Japan" **Genome Res** 14:1832-50
- Thompson EA y Neel JV. (1996) "Private polymorphisms: how many? How old? How useful for genetic taxonomies?" **Mol Phylogenet Evol** 5 :220-31
- Topal M y Fresco J. (1976) "Complementary base pairing and the origin of substitution mutations." **Nature** 263:285-89
- Torróni A, Schurr TG, Yang CC, Szathmari EJ, Williams RC, Schanfield MS y otros. (1992) "Native American mitochondrial DNA analysis indicates that the Amerind and the Nadene populations were founded by two independent migrations" **Genetics** 130:153-62
- Torróni A, Sukernik RI, Schurr TG, Starikorskaya YB, Cabell MF, Crawford MH y otros. (1993a) "mtDNA variation of aboriginal Siberians reveals distinct genetic affinities with Native Americans" **Am J Hum Genet** 53:591-608
- Torróni A, Schurr TG, Cabell MF, Brown MD, Neel JV, y otros. (1993b) "Asian affinities and continental radiation of the four founding Native American mtDNAs" **Am J Hum Genet** 53:563-90
- Torróni A, Miller JA, Moore LG, Zamudio S, Zhuang J, Droma T y otros. (1994a) "Mitochondrial DNA analysis in Tibet: implications for the origin of the Tibetan population and its adaptation to high altitude" **Am J Phys Anthropol** 93:189-99
- Torróni A, Chen YS, Semino O, Santachiara-Benecere AS, Scott CR, Lott MT y otros. (1994b) "mtDNA and Y-chromosome polymorphisms in four Native American populations from southern Mexico" **Am J Hum Genet** 54:303-18
- Torróni A, Neel JV, Barrantes R, Schurr TG, Wallace DC. (1994c) "Mitochondrial DNA "clock" for the Amerinds and its implications for timing their entry into North America" **Proc Natl Acad Sci USA**

91:1158-62

Torrioni A, Lott MT, Cabell MF, Chen YS, Lavergne L, Wallace DC. (1994d) "mtDNA and the origin of Caucasians: identification of ancient Caucasian-specific haplogroups, one of which is prone to a recurrent somatic duplication in the D-loop region" **Am J Hum Genet** 55:760-76

Torrioni A y Wallace DC. (1995) "MtDNA haplogroups in Native Americans" **Am J Hum Genet** 56:1234-8

Torrioni A, Huoponen K, Francalacci P, Petrozzi M, Morelli L, Scozzari R y otros. (1996) "Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations" **Genetics** 144:1835-50

Torrioni A, Rengo C, Guida V, Cruciani F, Sellitto D, Coppa A y otros. (2001) "Do the four clades of the mtDNA haplogroup L2 evolve at different rates?" **Am J Hum Genet** 69:1348-56

Tsai LC, Lin CY, Lee JC, Chang JG, Linacre A, Goodwin W. (2001) "Sequence polymorphism of mitochondrial D-loop DNA in the Taiwanese Han population" **Forensic Sci Int** 119:239-47

Tully LA y Levin BC. (2000) "Human mitochondrial genetics" **Biotechnol Genet Eng Rev** 17:147-77

Turner II C. (1984) "Advances in the dental search for native Americans origins" **Acta Anthropogenet** 8:23-78

Turner II, C. (2002) "Teeth, needles, dogs and Siberia: Bioarchaeological evidence for the colonization of the New World" **En:** Jablonski, NG, ed(s). *The First Americans: The Pleistocene Colonization of the New World*, Memoirs of the California Academy of Sciences 27, University of California Press,

Unsel M, Marienfeld JR, Brandt P, Brennicke A. (1997) "The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides" **Nature Genet** 15:57-61

van den Ouweland JM, Lemkes HH, Trembath RC, Ross R, Velho G, Cohen D y otros. (1994) "Maternally inherited diabetes and deafness is a distinct subtype of diabetes and associates with a single point mutation in the mitochondrial tRNA^{Leu}(UUR) gene" **Diabetes** 43:746-51

van Holst Pellekaan S, Frommer M, Sved J, Boettcher B. (1998) "Mitochondrial control-region sequence variation in aboriginal Australians" **Am J Hum Genet** 62:435-49

Vigilant L, Pennington R, Harpending H, Kocher TD, Wilson AC. (1989) "Mitochondrial DNA sequences in single hairs from a southern African population" **Proc Natl Acad Sci USA** 86:9350-4

Vigilant L, Stoneking M, Harpending H, Hawkes K, Wilson AC. (1991) "African populations and the evolution of human mitochondrial DNA" **Science** 253:1503-7

Voevoda MI, Avksentyuk AV, Ivanova AV, Astakhova TI, Babenko VN, Kurilovich SA y otros. (1994) "Molecular Genetic Studies in the Population of Native Inhabitants of Chukchee Peninsula. Analysis of Polymorphism of Mitochondrial DNA and of Genes Controlling Alcohol Metabolizing Enzymes" **Sib J Ecol** 2:139-151

Voevoda MI, Sitnikova VV, Chikisheva TA, Romashchenko AG, Polos'mak NV, Molodin VI y otros. (1998) "Molecular genetic analysis of mitochondrial DNA of representatives of from the Pazyryk

culture of Altai (IV-II centuries B.C.)" **Doklady Biol Sci** 358:71-73

Wakeley J. (1993) "Substitution rate variation among sites in hypervariable region 1 of human mitochondrial DNA" **J Mol Evol** 37:613-23

Walberg MW y Clayton DA. (1981) "Sequence and properties of the human KB cell and mouse L cell D-loop regions of mitochondrial DNA" **Nucleic Acids Res** 9:5411-21

Wallace DC, Garrison K, Knowler WC. (1985) "Dramatic founder effects in Amerindian mitochondrial DNAs" **Am J Phys Anthropol** 68:149-55

Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AM y otros. (1988) "Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy" **Science** 242:1427-30

Wallace DC. (1994) "Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease" **Proc Natl Acad Sci USA** 91:8739-46

Wallace DC. (1995) "1994 William Allan Award Address. Mitochondrial DNA variation in human evolution, degenerative disease, and aging" **Am J Hum Genet** 57:201-23

Wallace DC. (1999) "Mitochondrial diseases in man and mouse" **Science** 283:1482-8

Wallace DC, Brown MD, Lott MT. (1999) "Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease" **Gene** 238:211-30

Wallin J. (1923) "On the nature of mitochondria" **American Naturalist**

Wallin, JE. (1927) "Symbiogenesis and the Origin of Species" Williams and Wilkins, Baltimore, MD, USA.

Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. (1991) "Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material" **Biotechniques** 10:506-13

Wang L, Oota H, Saitou N, Jin F, Matsushita T, Ueda S. (2000) "Genetic structure of a 2,500-year-old human population in China and its spatiotemporal changes" **Mol Biol Evol** 17:1396-400

Wang W, Wise C, Baric T, Black ML, Bittles AH. (2003) "The origins and genetic structure of three co-resident Chinese Muslim populations: the Salar, Bo'an and Dongxiang" **Hum Genet** 113:244-52

Ward RH, Frazier BL, Dew-Jager K, Paabo S. (1991) "Extensive mitochondrial diversity within a single Amerindian tribe" **Proc Natl Acad Sci USA** 88:8720-4

Ward RH, Redd A, Valencia D, Frazier B, Paabo S. (1993) "Genetic and linguistic differentiation in the Americas" **Proc Natl Acad Sci USA** 90:10663-7

Ward RH, Salzano FM, Bonatto SL, Hutz MH, Coimbra Jr. CEA, Santos RV. (1996) "Mitochondrial DNAs Polymorphism in Three Brazilian Indian Tribes" **Am J Hum Biol** 8:317-323

Watanabe S, Ferial Aytá W, Hamaguchi H, Guidon N, La Salvia E, Maranca S y otros. (2003) "Some Evidence of a Date of First Humans to Arrive in Brazil" **J Archaeol Sci** 30:351-354

- Watson E, Forster P, Richards M, Bandelt HJ. (1997) "Mitochondrial footprints of human expansions in Africa" **Am J Hum Genet** 61:691-704
- Watson JD y Crick FH. (1953) "Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid" **Nature** 171:737-8
- Wen B, Xie X, Gao S, Li H, Shi H, Song X y otros. (2004) "Analyses of Genetic Structure of Tibeto-Burman Populations Reveals Sex-Biased Admixture in Southern Tibeto-Burmans" **Am J Hum Genet** 74:856-865
- Wilichowski E, Ohlenbusch A, Hanefeld F. (1998) "Characterization of the mitochondrial genome in childhood multiple sclerosis. II. Multiple sclerosis without optic neuritis and LHON-associated genes" **Neuropediatrics** 29:307-12
- Williams SR, Chagnon NA, Spielman RS. (2002) "Nuclear and mitochondrial genetic variation in the Yanomamo: a test case for ancient DNA studies of prehistoric populations" **Am J Phys Anthropol** 117: 246-59
- Wilson AC, Carlson SS, White TJ. (1977) "Biochemical evolution" **Annu Rev Biochem** 46:573-639
- Wilson MR, Polanskey D, Roplogle J, DiZinno JA, Budowle B. (1997) "A family exhibiting heteroplasmy in the human mitochondrial DNA control region reveals both somatic mosaicism and pronounced segregation of mitotypes" **Hum Genet** 100:167-71
- Yao YG, Lu XM, Luo HR, Li WH, Zhang YP. (2000) "Gene admixture in the silk road region of China: evidence from mtDNA and melanocortin 1 receptor polymorphism" **Genes Genet Syst** 75:173-8
- Yao YG, Kong QP, Bandelt HJ, Kivisild T, Zhang YP. (2002a) "Phylogeographic differentiation of mitochondrial DNA in Han Chinese" **Am J Hum Genet** 70:635-51
- Yao YG, Nie L, Harpending H, Fu YX, Yuan ZG, Zhang YP. (2002b) "Genetic relationship of Chinese ethnic populations revealed by mtDNA sequence diversity" **Am J Phys Anthropol** 118:63-76
- Yao YG, Kong QP, Man XY, Bandelt HJ, Zhang YP. (2003a) "Reconstructing the evolutionary history of China: a caveat about inferences drawn from ancient DNA" **Mol Biol Evol** 20:214-9
- Yao YG, Macaulay V, Kivisild T, Zhang YP, Bandelt HJ. (2003b) "To trust or not to trust an idiosyncratic mitochondrial data set" **Am J Hum Genet** 72:1341-6; author reply 1346-9
- Yao YG, Bravi CM, Bandelt HJ. (2004) "A call for mtDNA data quality control in forensic science" **Forensic Sci Int** 141: 1-6
- Yoneda M, Tanno Y, Horai S, Ozawa T, Miyatake T, Tsuji S. (1990) "A common mitochondrial DNA mutation in the t-RNA(Lys) of patients with myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers " **Biochem Int** 21:789-96
- Yoshii T, Takeda E, Akiyama K, Ishiyama I. (1995) "[Sequence polymorphism of mitochondrial DNA and its forensic application]" **Nippon Hoigaku Zasshi** 49:242-50

ANEXO

Tabla A1. Secuencias mitocondriales completas o casi completas publicadas entre 1988 y 1999.

Patología en estudio ^a	Código ^b	N	Cobertura ^c	Origen ^d	Referencia bibliográfica
LHON	III-5	1	85% de la RC	afro-americano	Wallace y col., 1988
MERRF	Paciente 1	1	98% del total		Yoneda y col., 1990
MELAS	TNK205	1	Completa	japonés	Kobayashi y col., 1991
MELAS	MELAS P-1	1	Completa	japonés	Tanaka y col., 1991
Enfermedad de Parkinson	PD P-1	1	Completa		Ozawa y col., 1991a
Enfermedad de Parkinson	PD P-2	1	Completa	japonés	Ozawa y col., 1991a
MELAS	MELAS P-2	1	Completa	japonés	Ozawa y col., 1991a
Cardiomiopatía infantil fatal	FICM	1	completa	japonés	Ozawa y col., 1991a
Cardiomiopatía dilatada	DCM P-1	1	completa	japonés	Ozawa y col., 1991b
Cardiomiopatía dilatada	DCM P-2	1	completa	japonés	Ozawa y col., 1991b
Cardiomiopatía hipertrófica	HCM P-1	1	completa	japonés	Ozawa y col., 1991b
Cardiomiopatía hipertrófica	HCM P-2	1	completa	japonés	Ozawa y col., 1991b
MERRF	SVR 84-3	1	>85% de la RC		Noer y col., 1991
MERRF	SVR 88-3	1	>85% de la RC		Noer y col., 1991
MERRF	SVR 87-2	1	>85% de la RC		Noer y col., 1991
MELAS	SVR 86-1	1	>85% de la RC		Marzuki y col., 1991; Lertrit y col., 1992
CPEO	SVR 88-1	1	>85% de la RC		Marzuki y col., 1991
CPEO	SVR 88-4	1	>85% de la RC		Marzuki y col., 1991
Distrofia miotónica	CMD 1	1	>85% de la RC		Marzuki y col., 1991
Distrofia miotónica	CMD 2	1	>85% de la RC		Marzuki y col., 1991
Control normal	SVR 89-1	1	>85% de la RC		Marzuki y col., 1991
Control normal	SVR 89-2	1	>85% de la RC		Marzuki y col., 1991
LHON	IV-1	1	>90% de la RC	caucasoide	Brown y col., 1992a
LHON		1	>92% de la RC	caucasoide	Brown y col., 1992b
LHON		1	>94% de la RC	caucasoide	Brown y col., 1992b

Tabla A1. Continuación

Patología en estudio^a	Código^b	N	Cobertura^c	Origen^d	Referencia bibliográfica
LHON y distonia	IV-36	1	90% del total	hispano (EUA)	Jun y col., 1994
Diabetes y sordera	II-4	1	93% del total	uropeo	van den Ouweland y col., 1994
Sordera sensorineural		1	completa	uropeo (Escocia)	Reid y col., 1994
Cardiomiopatía dilatada		1	completa	japonés	Ozawa y col., 1995a
Control (Fallo renal crónico)		1	completa	japonés	Ozawa y col., 1995a
Normal		1	completa	africano (Uganda)	Horai y col., 1995
Esclerosis múltiple	MS-R4	1	completa	caucasoide	Kalman y col., 1996
Esclerosis múltiple	MS-1PN	1	completa	caucasoide	Kalman y col., 1996
Esclerosis múltiple	MS-R51	1	completa	caucasoide	Kalman y col., 1996
Normal	Lund	1	completa	caucasoide	Arnason y col., 1996
Alzheimer plus Parkinson	ADPD2	1	>92% de la RC	caucasoide	Brown y col., 1996
Alzheimer plus Parkinson	ADPD7	1	>92% de la RC	caucasoide	Brown y col., 1996
Alzheimer plus Parkinson	ADPD14	1	>92% de la RC	caucasoide	Brown y col., 1996
Enfermedad de Parkinson	PD4	1	>92% de la RC	caucasoide	Brown y col., 1996
Encefalomiopatía mitocondrial		1	completa	japonés	Nishino y col., 1996
Cardiomiopatía hipertrófica	HCM P-3	1	completa	japonés	Ozawa,1997; Ozawa, 1994; Ozawa, 1995b
Cardiomiopatía hipertrófica	HCM P-5	1	completa	japonés	Ozawa,1997; Ozawa, 1994; Ozawa, 1995b
Cardiomiopatía hipertrófica	HCM P-8	1	completa	uropeo (Inglaterra)	Ozawa,1997; Ozawa, 1994; Ozawa, 1995b
Cardiomiopatía hipertrófica	HCM P-9	1	completa	uropeo (Grecia)	Ozawa,1997; Ozawa, 1994; Ozawa, 1995b
Cardiomiopatía hipertrófica	HCM P-10	1	completa	japonés	Ozawa,1997; Ozawa, 1994; Ozawa, 1995b
Cardiomiopatía mitocondrial	MCM P-1	1	completa	japonés	Ozawa,1997; Ozawa, 1994; Ozawa, 1995b
Control normal	ID 119	1	completa	chino	Ozawa,1997; Ozawa, 1994; Ozawa, 1995b
Esquizofrenia	A	1	completa	uropeo (Suecia)	Lindholm y col., 1997
Esquizofrenia	B	1	completa	uropeo (Suecia)	Lindholm y col., 1997
Esquizofrenia	C/D	1	85% del total	uropeo (Escocia)	Lindholm y col., 1997

Tabla A1. Continuación

Patología en estudio ^a	Código ^b	N	Cobertura ^c	Origen ^d	Referencia bibliográfica
Esclerosis Múltiple y neuritis óptica	MS 5	1	completa	uropeo (Alemania)	Ohlenbusch y col., 1998a
Esclerosis Múltiple y neuritis óptica	MS 23	1	completa	uropeo (Alemania)	Ohlenbusch y col., 1998a
Esclerosis Múltiple y neuritis óptica	MS 88	1	completa	uropeo (Alemania)	Ohlenbusch y col., 1998a
Esclerosis Múltiple y neuritis óptica	MS 122	1	completa	uropeo (Alemania)	Ohlenbusch y col., 1998a
Esclerosis Múltiple y neuritis óptica	MS 128	1	completa	uropeo (Alemania)	Ohlenbusch y col., 1998a
Esclerosis Múltiple y neuritis óptica	MS 134	1	completa	uropeo (Alemania)	Ohlenbusch y col., 1998a
Esclerosis Múltiple		13	RC completa	uropeo (Alemania)	Wilichowski y col., 1998; Ohlenbusch y col., 1998b
Controles normales		20	RC completa	uropeo (Alemania)	Wilichowski y col., 1998; Ohlenbusch y col., 1998b
Hipotensión ortostática	5060	1	completa	caucasoides	Schwartz y col., 1999
Hipotensión ortostática	5063	1	completa	caucasoides	Schwartz y col., 1999
Hipotensión ortostática	5177	1	completa	caucasoides	Schwartz y col., 1999
Degeneración multisistémica y parkinsonismo	III-8	1	completa	uropeo (Portugal)	Simon y col., 1999
TOTAL		93			

Referencias

- a- Se indica la patología de probable etiología mitocondrial investigada mediante secuenciación del ADNmt, alternativamente se señala si la secuencia correspondió a un control normal. **LHON**, neuropatía óptica hereditaria de Leber; **MERRF**, epilepsia mioclónica y fibra roja desgarrada; **MELAS**, encefalomiopatía mitocondrial, acidosis láctica y episodios similares a ACV; **CPEO**, oftalmoplegia externa crónica y progresiva.
- b- Código empleado en la publicación para individualizar cada secuencia.
- c- Extensión en que la molécula fue secuenciada. **RC**, región codificante.
- d- Cuando conocido, se indica el origen étnico-geográfico de linaje mitocondrial secuenciado.

Tabla A2- Poblaciones aborígenes americanas analizadas para polimorfismos de la RHV-I.

Esquimales / Aleutianos	N	Haplogrupo						Marcadores ¹	Referencia
		A	B	C	D	X	Otros		
Esquimales Inupiaq	5	4	0	0	1	0	0	No	Shields y col. (1993)
Esquimales Inuit	17	15	0	0	1	0	1	B	Shields y col. (1993)
Esquimales Inuit	82	82	0	0	0	0	0	No	Saillard y col. (2000)
Aleutianos	30	0	0	0	30	0	0	s.c.	Derbeneva y col. (2002)
Aleutianos	163	56	0	0	107	0	0	ABCD	Rubicz y col. (2003)
TOTAL	297	157	0	0	139	0	1		

Na-Dené	N	Haplogrupo						Marcadores ¹	Referencia
		A	B	C	D	X	Otros		
Haida	41	35	0	3	2	0	1	No	Ward y col. (1993)
Haida	1	1	0	0	0	0	0	ABCD	Torrioni y col. (1993b)
Athapaskan	21	20	0	1	0	0	0	No	Shields y col. (1993)
Dogrib	1	1	0	0	0	0	0	ABCD	Lorenz y col. (1997)
Dogrib	2	2	0	0	0	0	0	ABCD	Torrioni y col. (1993b)
Tlingit	2	2	0	0	0	0	0	ABCD	Torrioni y col. (1993b)
Apache	1	0	0	1	0	0	0	B	Horai y col. (1993)
Apache	1	0	0	0	1	0	0	ABCD	Torrioni y col. (1993b)
Apache	7	4	1	2	0	0	0	ABCDX	Malhi y col. (2003)
Apache	180	125	35	16	0	1	3	No	Budowle y col. (2002)
Navajo	146	68	63	11	2	1	1	No	Budowle y col. (2002)
Navajo	6	3	2	1	0	0	0	ABCDX	Malhi y col. (2003)
Navajo	2	2	0	0	0	0	0	ABCD	Torrioni y col. (1993b)
TOTAL	411	263	101	35	5	2	5		

continúa

Tabla A2- Continuación

Amerindios	N	Haplogrupo						Marcadores ¹	Referencia
		A	B	C	D	X	Otros		
Bella Coola	40	25	2	3	10	0	0	No	Ward y col. (1993)
Bella Coola	4	1	1	1	1	0	0	ABCD	Torrioni y col. (1993b)
Bella Coola	2	1	0	1	0	0	0	ABCD	Lorenz y col. (1997)
Bella Coola	5	1	0	0	4	0	0	ABCD	Malhi y col. (2004)
Nuu Chah Nulth (=Nootka)	63	28	2	12	13	7	1	BC	Ward y col. (1991)
Nuu Chah Nulth (=Nootka)	3	1	0	2	0	0	0	ABCD	Malhi y col. (2004)
Northern Paiute	2	0	2	0	0	0	0	ABCD	Malhi y col. (2004)
Yakima	42	3	26	3	7	2	1	B	Shields y col. (1993)
Ojibwa (=Chippewa)	2	1	0	1	0	0	0	ABCD	Lorenz y col. (1997)
Ojibwa (=Chippewa)	3	1	1	1	0	0	0	ABCD	Torrioni y col. (1993b)
Choctaw	1	1	0	0	0	0	0	ABCD	Lorenz y col. (1997)
Choctaw	14	8	5	1	0	0	0	ABCD	Bolnick y col. (2004)
Chickasaw	10	2	6	2	0	0	0	ABCD	Bolnick y col. (2004)
Creek	21	5	3	5	8	0	0	ABCD	Bolnick y col. (2004)
Seminole	3	1	2	0	0	0	0	ABCD	Bolnick y col. (2004)
Washo	2	0	2	0	0	0	0	ABCD	Lorenz y col. (1997)
Yuman	10	0	8	2	0	0	0	ABCD	Lorenz y col. (1997)
Salinan	1	0	1	0	0	0	0	ABCD	Lorenz y col. (1997)
Chumash	5	3	1	1	0	0	0	ABCD	Lorenz y col. (1997)
Nahua	5	3	0	2	0	0	0	ABCD	Lorenz y col. (1997)
California Uto-Aztecan	4	0	2	2	0	0	0	ABCD	Lorenz y col. (1997)
Hopi	1	0	1	0	0	0	0	ABCD	Lorenz y col. (1997)
Jemez	8	0	8	0	0	0	0	ABCDX	Malhi y col. (2003)
Zuñi	5	0	5	0	0	0	0	ABCDX	Malhi y col. (2003)

continúa

Tabla A2- Continuación

Amerindios	N	Haplogrupo						Marcadores ¹	Referencia
------------	---	------------	--	--	--	--	--	-------------------------	------------

		A	B	C	D	X	Otros		
Papago	3	0	3	0	0	0	0	ABCDX	Malhi y col. (2003)
Nahua	5	3	0	2	0	0	0	ABCDX	Malhi y col. (2003)
Seri	8	0	1	7	0	0	0	ABCDX	Malhi y col. (2003)
Pai Pai	2	0	2	0	0	0	0	ABCDX	Malhi y col. (2003)
Yavapai	1	0	1	0	0	0	0	ABCDX	Malhi y col. (2003)
Cochimi	1	0	1	0	0	0	0	ABCDX	Malhi y col. (2003)
Kiliwa	1	0	1	0	0	0	0	ABCDX	Malhi y col. (2003)
Kumeyaay (=Diegueño)	1	0	1	0	0	0	0	ABCDX	Malhi y col. (2003)
Pima	3	1	1	1	0	0	0	ABCD	Torrioni y col. (1993b)
Pima	40	2	18	15	1	1	3	No	Kittles y col. (1999)
Pima	6	0	2	3	0	1	0	ABCDX	Malhi y col. (2003)
Cheyenne	39	19	5	7	0	7	1	No	Kittles y col. (1999)
Mayas	4	1	1	1	1	0	0	ABCD	Torrioni y col. (1993b)
Mayas	3	2	0	1	0	0	0	B	Horai y col. (1993)
Mayas Quiché	23	16	6	1	0	0	0	No	Boles y col. (1995)
Boruca	2	1	0	0	1	0	0	ABCD	Torrioni y col. (1993b)
Huetar	27	19	1	0	7	0	0	ABC	Santos y col. (1994)
Ngobe (=Guaymí)	46	31	15	0	0	0	0	ABC	Kolman y col. (1995)
Ngobe (=Guaymí)	1	0	1	0	0	0	0	ABCD	Torrioni y col. (1993b)
Kuna	63	45	18	0	0	0	0	ABCD	Batista y col. (1995)
Emberá	44	10	23	11	0	0	0	ABCD	Kolman y col. (1997)
Wounan	31	9	6	15	1	0	0	ABCD	Kolman y col. (1997)
Colombia indeterminados	20	10	4	5	1	0	0	B	Horai y col. (1993)
Yanomama	3	0	1	1	1	0	0	ABCD	Torrioni y col. (1993b)

continúa

Tabla A2- Continuación

Amerindios	N	Haplogrupo						Marcadores ¹	Referencia
		A	B	C	D	X	Otros		

Yanomama ²	50	0	2	32	16	0	0	ABCD	Easton y col. (1996)
Yanomama	155	0	87	49	19	0	0	ABCD	Williams y col. (2002)
Makiritare	1	1	0	0	0	0	0	ABCD	Torrioni y col. (1993b)
Kraho	3	1	1	1	0	0	0	ABCD	Torrioni y col. (1993b)
Ticuna	3	1	0	1	1	0	0	ABCD	Torrioni y col. (1993b)
Guahibo	3	1	0	2	0	0	0	No	Ghose y col. (2002)
Piaroa	15	7	0	2	6	0	0	No	Ghose y col. (2002)
Amazonía (8 etnias) ³	92	34	21	26	11	0	0	ABCD	Santos y col. (1996)
Xavante	25	4	21	0	0	0	0	No	Ward y col. (1996)
Gaviao	27	4	4	0	19	0	0	No	Ward y col. (1996)
Zoró	30	6	2	4	18	0	0	No	Ward y col. (1996)
Brasil indeterminados	3	0	0	1	1	0	1	B	Horai y col. (1993)
Cayapa (=Chachi)	150	45	54	16	35	0	0	B	Rickards y col. (1999)
Quechua Arequipa	22	2	15	3	2	0	0	No	Fuselli y col. (2003)
Tayacaja Quechua	61	13	20	8	20	0	0	No	Fuselli y col. (2003)
San Martin, Perú ⁴	22	2	12	1	6	0	1	No	Fuselli y col. (2003)
Yuracare	15	4	6	5	0	0	0	ABCD	Bert y col. (2004)
Ignaciano	15	4	3	7	1	0	0	ABCD	Bert y col. (2004)
Trinitario	12	2	3	6	0	0	1	ABCD	Bert y col. (2004)
Movima	12	0	1	9	2	0	0	ABCD	Bert y col. (2004)
Aché	63	6	57	0	0	0	0	No	Schmitt y col. (2004)
Wichí (=Mataco)	3	1	1	0	1	0	0	ABCD	Torrioni y col. (1993b)
Chile indeterminados	45	2	9	18	15	0	1	B	Horai y col. (1993)
Mapuche	39	6	15	8	10	0	0	B	Ginther y col. (1993)

continúa

Tabla A2- Continuación

Amerindios	N	Haplogrupo	Marcadores ¹	Referencia
------------	---	------------	-------------------------	------------

		A	B	C	D	X	Otros		
Mapuche	34	0	8	12	14	0	0	ABCD	Moraga y col. (2000)
Pehuenche	24	3	7	8	6	0	0	ABCD	Moraga y col. (2000)
Yámana	15	0	0	6	9	0	0	ABCD	Moraga y col. (2000)
TOTAL	1572	403	539	334	268	18	10		

Poblaciones cosmopolita y otras ⁵	N	Haplogrupo						Marcadores ¹	Referencia
		A	B	C	D	X	Otros		
Hispanos E.U.A.	480	204	103	141	32	0	0	No	Monson y col. (2002)
Valle Central, Costa Rica	49	32	15	2	0	0	0	ABCD	Carvajal-Carmona y col. (2003)
Antioquia, Colombia	73	40	27	5	1	0	0	ABCD	Carvajal-Carmona y col. (2003)
Caracas, Venezuela	8	4	1	1	2	0	0	No	Ghose y col. (2002)
Afro-brasileños Curiaú	21	2	6	6	7	0	0	ABCDL	Ribeiro-Dos-Santos y col. (2002)
Afrobrasileños (3 poblaciones)	5	0	1	4	0	0	0	B	Bortolini y col. (1997)
Población cosmopolita México	64	16	33	14	1	0	0	ABCD y otros	Green y col. (2000)
Población cosmopolita Brasil	81	24	24	20	13	0	0	ABCD y otros	Alves-Silva y col. (2000)
TOTAL	781	40	57	34	14	0	0		

Tabla A2- Continuación

Poblaciones extinguidas ⁶	N	Haplogrupo						Marcadores ¹	Referencia
		A	B	C	D	X	Otros		
†Kwaday Dan Ts'inchi (Canadá)	1	1	0	0	0	0	0	ABCD	Monsalve y col. (2003)
†Hohokam (E.U.A.)	1	0	0	1	0	0	0	ABCD	Handt y col. (1996)
†Oneota (E.U.A.)	52	11	7	25	5	2	2	ABCD	Stone y col. (1998)

†Cuenca del río Columbia, (E.U.A.)	30	7	8	2	11	2	0	ABCDX	Malhi y col. (2004)
†Hinds Cave, Texas (E.U.A.)	3	0	1	2	0	0	0	ABCD	Poinar y col. (2001)
†Ciboney (Cuba)	15	1	0	9	5	0	0	ABCD	Lalueza-Fox y col. (2003)
†Aonikenk (Patagonia)	1	0	0	1	0	0	0	ABCD	Lalueza (1996)
†Yámana (Patagonia)	1	0	0	0	1	0	0	ABCD	Lalueza (1996)
TOTAL	103	19	16	40	22	4	2		

	Haplogrupo						
	N	A	B	C	D	X	Otros
GRAN TOTAL	3164	882	713	443	448	24	18

Referencias

1, se indican los marcadores haplogrupo-específicos analizados; s.c., secuencias completas; **2**, siete individuos X6 y dos individuos X7 son considerados D, mientras que un individuo X7 es considerado C (ver sección 4.3.1 en esta Tesis); **3**, linaje S10/R08 fue atribuido a D aunque tiene PLFR de haplogrupo A ya que su RHV-I es claramente afin a la de Yanomamas 39 y 42 de Easton y col. 1996 (incluyendo la transversión 16179 C→A); **4**, se desconoce que secuencias provienen de donantes Quechua y cuales de Machiguengas; **5**, para las poblaciones cosmopolitas, criollas, mestizas, “hispanas” o afro-americanas sólo se consideraron aquellos individuos portadores de linajes asignables a los haplogrupos A-D; **6**, las poblaciones/individuos informados en Hauswirth y col. 1994, Monsalve y col. 1996, Ribeiro-Dos Santos y col. 1996, Lleonart y col. 1999 y García-Bour y col. 2004 fueron excluidos de este análisis ya que en esos trabajos se informaron secuencias con conspicuos errores tales como contaminaciones con secuencias alóctonas, espectro mutacional aberrante, etc. (C.M. Bravi, observaciones no publicadas); **7**, sólo se consideró el individuo VC15 porque los otros dos mostraron resultados inconsistentes en diferentes extracciones.

Tabla A3- Poblaciones del este y sudeste asiático plus Oceanía analizadas para polimorfismos de la RHV-I.

Poblaciones	N	Referencias
Chinos Han	1284	1, 2, 5, 15, 23, 25, 32, 33, 35, 36, 48, 51, 53
Chinos cantoneses	89	7, 31
Chinos Han Taiwán	218	24, 39
Corea	818	1, 5, 8, 10, 13, 15, 32, 37, 50, 51
Japón	1670	1, 2, 4-6, 9, 15, 17, 20, 23, 32, 34, 35, 42-46, 53
Ainú (Japón)	57	5, 22
Ryu-Kyu (Japón)	50	5
Va (=Wa) (China)	60	27, 30
Nu (China)	30	29
Sali (China)	31	29
Tibetan (China)	155	27, 29, 54
Aini (China)	47	54
Bai (China)	90	29, 54
Dai (China)	62	27, 29, 30
Zhuang (China)	83	29
Salar (China)	10	38
Bo'an (China)	10	38
Dongxiang (China)	10	38
Hani (China)	33	54
Jino (China)	18	54
Naxi (China)	45	54
Pumi (China)	35	54
Tujia (China)	97	54
Yi (China)	56	54
Thai	167	15, 28, 29, 51
Mussur (Tailandia)	21	28
Phuthai (Tailandia)	25	28
Lao Song (Tailandia)	25	28
Chong (Tailandia)	25	28
Sakai Negrito (Tailandia)	20	28
Akha (Tailandia)	91	26
Lisu (Tailandia, China)	157	26, 28, 29
Red Karen (Tailandia)	39	26
White Karen (Tailandia)	40	26
Lahu (Tailandia, China)	121	26, 27, 30, 54
H'mong	1	2
Camboya	12	32
Vietnam	66	15, 32, 35
Malasia	59	2, 32, 53
Aborígenes Taiwán	62	3, 14
Atayal (Aborígenes Taiwán)	20	49
Saisiat (Aborígenes Taiwán)	20	49

continúa

Tabla A3- continuación

Bunun (Aborígenes Taiwán)	20	49
Tsou (Aborígenes Taiwán)	20	49
Rukai (Aborígenes Taiwán)	20	49
Paiwan (Aborígenes Taiwán)	20	49
Ami (Aborígenes Taiwán)	20	49
Puyuma (Aborígenes Taiwán)	20	49
Yami (Aborígenes Taiwán)	20	49
Asiáticos de origen mixto	13	32
Filipinas	117	1, 3, 15, 53
Indonesia	89	1, 19, 53
Indonesia - Java	17	15
Indonesia - Borneo	50	2, 3, 15
Urak Lanoi (Océano Indico)	13	15
Moken (Océano Indico)	14	15
Nicobareses	33	52
Papúas	46	1, 2, 3, 15, 19
Guam	87	51
Melanesia	129	3, 15, 18
Micronesia	478	2, 3, 15
Polinesia	293	2, 3, 11, 15
Aborígenes Australia	178	2, 12, 15, 19
†Yixi, China	23	16
†Liangchung, China	34	33
†Yayoi, Japón	69	21, 41
†Jomon, Japón	34	22, 40
TOTAL	7886	

†Poblaciones estudiadas mediante análisis de ADN antiguo en restos arqueológicos.

Referencias

1, Horai y Hayasaka (1990); 2, Lum y col. (1994); 3, Sykes y col. (1995); 4, Yoshii y col. (1995); 5, Horai y col. (1996); 6, Takada y col. (1996); 7, Betty y col. (1996); 8, Lee y col. (1997); 9, Seo y col. (1998); 10, Han y col. (1998); 11, Murray-MacIntosh y col. (1998); 12, van Holst Pellekaan y col. (1998); 13, Pfeiffer y col. (1998); 14, Melton y col. (1998); 15, Lum y col. (1998); 16, Oota y col. (1999); 17, Abe y col. (1998); 18, Hagelberg y col. (1999); 19, Redd y col. (1999); 20, Ohira y col. (1999); 21, Oota y col. (1995); 22, Horai y col. (1991); 23, Nata y col. (1999); 24, Tsai y col. (2001); 25, Yao y col. (2002a); 26, Oota y col. (2001); 27, Qian y col. (2001); 28, Fucharoen y col. (2001); 29, Yao y col. AJPA (2002b); 30, Yao y Zhang (2002); 31, Kivisild y col. (2002); 32, Bamshad y col. (2001); 33, Wang y col. (2000); 34, Koyama y col. (2002); 35, Oota y col. (2002); 36, Yao y col. (2003a); 37, Snall y col. (2002); 38, Wang y col. (2003); 39, Chen y col. (2002); 40, Shinoda y col. (1999); 41, Shinoda y col. (1994); 42, Isashiki y col. (2003); 43, Nagai y col. (2003); 44, Imaizumi y col. (2002); 45, Koyama y col. (2002); 46, Maruyama y col. (2003); 48, Rao y col. (2003); 49, Tajima y col. (2003); 50, Kong y col. (2003b); 51, FBI mtDNA Population Database (<http://www.fbi.gov/hq/lab/fsc/backissu/april2002/mtDNA.exe>); 52, Prasad y col. (2001); 53, Tajima y col. (2004); 54, Wen y col. (2004)

Tabla A4- Poblaciones de Siberia y Asia Central analizadas para

polimorfismos de la RHV-I.

Poblaciones	N	Referencias
Esquimales Siberianos	105	1, 3, 7
Chukchi	111	1, 3, 5, 7
Koryaks	292	5, 8, 28
Itel'men	47	5, 8
Nivkh	59	2, 28
Daur	45	26
Oroqen	44	26
Udegey	3	2
Yakuts	418	5, 18, 19, 24, 25
Evens	100	5,28
Evenks	143	2, 12, 29, 26
Kets	48	6, 17
Nganasan	24	17
Sel'kups	24	6
Nenets	58	15
Altai	258	1, 13,27
Khakassian	53	27
Mansi	98	11
Mari	138	30, 21
Udmurt	103	30, 21
Mordvinian	110	30, 21
Khant	10	30
Komi	152	30, 21
Bashkirs	221	21
Tatars	228	21
Chuvash	55	21
Mongoles Khalka	64	4
Mongoles Dariganga	36	4
Mongoles Durvet	1	4
Mongoles Darkhad	1	4
Mongoles Buryat	454	4, 5, 14, 31, 18, 27,28
Mongoles	63	32, 26
Tu	35	32
Tuvinius	126	14, 27
Todjins	48	27
Tofalar	58	27
Kazakos	85	9, 16
Uighurs	100	9, 16
Kirghuiz	199	9, 13
Tadjik	37	13
Uzbek	47	13

continúa

Tabla A4- continuación

Poblaciones	N	Referencias
†Cultura Jety-Asar	3	10
†Cultura Pazyryk, Escito-Siberiana, Rusia	2	22
†Cultura Escito-Siberiana, Altai, Rusia	2	23
†Xiongnu (Mongolia)	46	20
TOTAL	4308	

†Poblaciones estudiadas mediante análisis de ADN antiguo en restos arqueológicos.

Referencias

1, Shields y col. (1993); **2**, Torroni y col. (1993a); **3**, Voevoda y col. (1994); **4**, Kolman y col. (1996); **5**, Derenko y Shields (1997); **6**, Kazakovsteva (1998); **7**, Starikovskaya y col.(1998); **8**, Schurr y col. (1999); **9**, Comas y col. (1998); **10**, Ovchinnikov y col. (1999); **11**, Derbeneva y col. (2002a); **12**, Kaessmann y col. (2002); **13**, Goloubenko M, comunicación personal; **14**, Derenko y col. (2000); **15**, Saillard y col. (2000a); **16**, Yao y col. (2000); **17**, Derbeneva y col. (2002c); **18**, Pakendorf y col. (2003); **19**, Puzyrev y col. (2003); **20**, Keyser-Tracqui y col. (2003); **21**, Bermisheva y col. (2002); **22**, Voevoda y col. (1998); **23**, Ricaut y col. (2004b); **24**, Fedorova y col. (2003); **25**, Ricaut y col. (2004a); **26**, Kong y col. (2003b); **27**, Derenko y col. (2003); **28**, Tajima y col. (2004); **29**, SeryoginYA, Lebedeva IA y Poltarau AB (2000), secuencias sin publicar depositadas en GeneBank con números de acceso AF285385-AF285413; **30**, Voevoda MI y Shkapenko AL, (2001); secuencias sin publicar depositadas en GeneBank con números de acceso AF214068-AF214105; **31**, Shimada MK, Kim C, Takahashi A, Spitsyn VA, Ikeo K, Gojobori T y Saitou N, secuencias sin publicar depositadas en GeneBank con números de acceso AB059865-AB059998; **32**, Yao y col. (2002b)

