

Carolina Núñez Domingo

Análisis de ADN mitocondrial y de  
polimorfismos genéticos de los  
cromosomas autosómicos y sexuales  
en la población mestiza de Nicaragua

Departamento

Anatomía Patológica, Medicina Legal y Forense  
y Toxicología

Director/es

Martínez-Jarreta, Begoña  
Martínez de Pancorbo Gómez, M<sup>a</sup> de los  
Ángeles

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

Tesis Doctoral

ANÁLISIS DE ADN MITOCONDRIAL Y DE POLIMORFISMOS  
GENÉTICOS DE LOS CROMOSOMAS AUTOSÓMICOS Y  
SEXUALES EN LA POBLACIÓN MESTIZA DE NICARAGUA

Autor

Carolina Núñez Domingo

Director/es

Martínez-Jarreta, Begoña  
Martínez de Pancorbo Gómez, M<sup>a</sup> de los Ángeles

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**

Anatomía Patológica, Medicina Legal y Forense y Toxicología

2011





Departamento de Anatomía Patológica,  
Medicina Legal y  
Forense, y Toxicología  
Facultad de Medicina  
Universidad de Zaragoza

# ANÁLISIS DE ADN MITOCONDRIAL Y DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE LOS CROMOSOMAS AUTOSÓMICOS Y SEXUALES EN LA POBLACIÓN MESTIZA DE NICARAGUA

**Trabajo de Tesis dirigido por:**  
**Catedrática Dra. Begoña Martínez Jarreta**  
**Catedrática Dra. M<sup>a</sup> de los Ángeles Martínez de Pancorbo Gómez**

**Para la obtención del grado de “Doctor Europeo” de:**  
**Carolina Núñez Domingo**

Zaragoza, septiembre 2011





**ÁREA DE MEDICINA LEGAL Y FORENSE**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**  
C/Domingo Miral , s/n  
50.009-ZARAGOZA (SPAIN)  
**Prof. Dra. Begoña Martínez Jarreta**  
**Catedrática de Medicina Legal y Forense**

DOÑA **BEGOÑA MARTÍNEZ JARRETA**, CATEDRÁTICA DE MEDICINA LEGAL Y FORENSE DE LA UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

HACE CONSTAR:

Que el trabajo realizado por D<sup>a</sup> **Carolina Núñez Domingo** titulado: *“ANÁLISIS DE ADN MITOCONDRIAL Y DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE LOS CROMOSOMAS AUTOSÓMICOS Y SEXUALES EN LA POBLACIÓN MESTIZA DE NICARAGUA”* ha sido realizado bajo mi dirección y considero que reúne las condiciones para su defensa pública y la obtención del grado de Doctor.

En Zaragoza a dieciséis de junio de 2011





**TABLA DE CONTENIDOS**

<b>RESUMEN</b>	<b>15</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>17</b>
<b>PUBLICACIÓN ORIGINAL Y COMUNICACIONES A CONGRESOS</b>	<b>19</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>20</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>21</b>
ORGANIZACIÓN DEL GENOMA HUMANO	21
LA GENÉTICA FORENSE	22
STRs AUTOSÓMICOS	24
1. Características generales	24
1.1. Tipos de STRs	24
1.2. Tasa de mutación	25
2. STRs autosómicos y genética forense	25
2.1. Criterios de selección de los STRs para la identificación humana	26
2.1.1. Elevado poder de discriminación y heterocigosidad	26
2.1.2. Baja tasa de mutación	26
2.1.3. Tamaño reducido	26
2.1.4. Rango alélico reducido	27
2.1.5. Bajo porcentaje de alelos tartamudos	27
2.1.6. Localización cromosómica diferencial	27
3. Interpretación de los perfiles de STRs. Bases de datos poblacionales	28
4. STRs autosómicos y genética de poblaciones	30
EL ADN MITOCONDRIAL	30
1. Características generales	30
2. El origen de la mitocondria	33
3. La herencia del ADN mitocondrial	34
4. El cuello de botella y la heteroplasma en el ADNmt	34
5. Recombinación	35
6. ADNmt y genética de poblaciones	36
6.1. El modelo de las migraciones humanas a partir del estudio del ADNmt	38
6.2. El poblamiento de las Américas	38
6.3. El ADNmt y la adaptación del ser humano	

a climas cambiantes	41
6.4. Complejidad del análisis del ADNmt	42
7. ADNmt y genética forense	44
7.1. Criminalística	45
7.2. Identificación de cadáveres en desastres en masa	45
7.3. Identificación de restos humanos antiguos	46
8. La interpretación de los perfiles de ADNmt. Bases de datos poblacionales	47
 EL CROMOSOMA Y	 48
1. Características generales	48
2. Polimorfismos del cromosoma Y	49
2.1. Microsatélites del cromosoma Y (Y-STRs)	49
2.2. Marcadores bialélicos del cromosoma Y (indels y Y-SNPs)	50
3. Polimorfismos del cromosoma Y y genética forense	51
3.1. La identificación de muestras procedentes de varones en criminalística	51
3.2. Investigación biológica de la paternidad	53
4. Interpretación de los perfiles de Y-STRs	54
5. Marcadores del cromosoma Y y genética de poblaciones	54
5.1. La colonización de las Américas según el cromosoma Y	58
5.2. La asimetría genética sexual en las migraciones humanas	59
 EL CROMOSOMA X	 60
1. Características generales	60
2. Marcadores del cromosoma X	62
2.1. Ligamiento y desequilibrio de ligamiento	63
3. Polimorfismos del cromosoma X y genética forense	64
3.1. Criminalística	64
3.2. Investigación de parentesco	64
4. Polimorfismos del cromosoma X y genética de poblaciones	65
4.1. Estudios sobre la historia humana	66
 NICARAGUA	 67

<b>JUSTIFICACIÓN DEL TEMA Y OBJETIVOS</b>	<b>70</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>73</b>
1. Selección de muestras de la población nicaragüense	73
2. Extracción de ADN	73
3. Cuantificación de ADN	74
4. Análisis de HVSI y HVSII del ADNmt	74
4.1. Amplificación del ADN mitocondrial	74
4.2. Comprobación del producto amplificado mediante gel de agarosa	75
4.3. Purificación del ADN	76
4.4. Reacción de secuenciación	76
4.5. Purificación de los productos de la reacción de secuenciación	77
4.6. Electroforesis capilar del producto de secuenciación	77
4.7. Análisis de resultados	77
5. Análisis de STRs autosómicos	77
5.1. Amplificación de los STRs autosómicos	77
5.2. Electroforesis capilar de los fragmentos	78
6. Análisis de STRs del cromosoma Y	78
6.1. Amplificación de los STRs de cromosoma Y	78
6.2. Electroforesis capilar de los fragmentos	79
6.3. Predicción de los haplogrupos de cromosoma Y	79
7. Análisis de SNPs del cromosoma Y	80
7.1. Determinación de los haplogrupos de cromosoma Y	80
7.2. Condiciones de amplificación	81
7.3. Comprobación del producto amplificado mediante gel de agarosa	82
7.4. Purificación de los productos de amplificación	82
7.5. Reacción de extensión de una base (SBE)	82
7.6. Purificación del producto de SBE	83
7.7. Electroforesis capilar	83
8. Análisis de STRs del cromosoma X	83
8.1. Amplificación de STRs del cromosoma X	83
8.2. Electroforesis capilar de los fragmentos	84
9. Análisis estadístico	84
9.1. ADN mitocondrial	84
9.2. Cromosoma Y	89

9.3.	Cromosoma X	89
9.4.	STRs autosómicos	90
<b>RESULTADOS</b>		<b>92</b>
1.	Cuantificación de ADN	92
2.	ADN mitocondrial	92
2.1.	Análisis de las secuencias de la región control (HVS1 y HVSII) del ADNmt	92
2.1.1.	Análisis de HVS1	92
2.1.2.	Análisis de HVSII	93
2.1.3.	Análisis conjunto de HVS1 y HVSII	94
2.2.	Parámetros de diversidad del ADNmt de la población mestiza de Nicaragua	94
2.3.	Diferencias entre pares de nucleótidos y parámetros de interés forense	95
2.4.	Distribución <i>mismatch</i>	96
2.5.	Composición de haplogrupos	97
2.6.	Red promedio ( <i>Median-joining network</i> )	100
2.7.	Comparación de HVS1 de las secuencias de origen amerindio de Nicaragua con la de diversas poblaciones americanas	100
2.8.	Análisis AMOVA	102
2.9.	Estimación del origen geográfico	102
2.10.	Análisis interpoblacional	105
3.	Cromosoma Y	108
3.1.	Poder de discriminación por locus Y-STR	108
3.2.	Diversidad haplotípica	109
3.3.	Composición de haplogrupos	109
3.4.	Análisis interpoblacional	111
4.	Cromosoma X	113
4.1.	Diversidad haplotípica	113
4.2.	Análisis de desequilibrio de ligamiento	113
4.3.	Poder de discriminación por locus	114
4.4.	Análisis interpoblacional	116
5.	STRs autosómicos	117
5.1.	Proporciones de mezcla genética basadas en STRs autosómicos	119
6.	Proporciones de mezcla en la población mestiza de Nicaragua	119
<b>DISCUSIÓN</b>		<b>121</b>

1.	ADN mitocondrial	123
1.1.	Parámetros de diversidad e interés forense	123
1.2.	Análisis de expansión poblacional	123
1.3.	Análisis de haplogrupos del ADNmt	124
1.4.	Análisis interpoblacional	125
1.4.1.	Parámetros de diversidad del segmento HVSI	126
1.4.2.	Origen geográfico de los linajes nativo americanos de ADNmt de los mestizos de Nicaragua	126
2.	Cromosoma Y	128
2.1.	Parámetros de diversidad e interés forense	128
2.2.	Análisis de haplogrupos del cromosoma Y	129
2.3.	Análisis interpoblacional	131
3.	Cromosoma X	132
3.1.	Parámetros de diversidad e interés forense	132
3.2.	Análisis interpoblacional	133
4.	STRs autosómicos	134
4.1.	Parámetros de diversidad e interés forense	134
5.	Proporciones de mezcla	134
	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>136</b>
	<b>CONCLUSIONS</b>	<b>138</b>
	<b>REFERENCIAS</b>	<b>139</b>
	<b>ANEXOS</b>	<b>169</b>
1.	Haplotipos de las regiones HVSI y HVSI del ADNmt y el haplogrupo correspondiente de las muestras de la población mestiza de Nicaragua	169
2.	Información sobre los cebadores utilizados para la amplificación y reacción de extensión de único nucleótido (SBE) en los diversos multiplex de Y-SNPs	172
3.	Haplotipos de Y-STRs y Y-SNPs de la población mestiza de Nicaragua	179
4.	Frecuencias alélicas de los 17 loci Y-STR en la población mestiza de Nicaragua	183
5.	Haplotipos de 10 X-STRs de la población mestiza de Nicaragua	184
6.	Frecuencias alélicas de los 10 loci X-STR en la población mestiza de Nicaragua	187
7.	Genotipos de 15 STRs autosómicos de la población mestiza de Nicaragua	188
8.	Comunicaciones a congresos	191

9. **Núñez C**, Baeta M, Sosa C, Casalod Y, Ge J, Budowle B, Martínez-Jarreta B. *Reconstructing the population history of Nicaragua by means of mtDNA, Y-chromosome STRs, and autosomal STR markers.* Am J Phys Anthropol, 2010; 143 (4): 591-600. 195



## RESUMEN

En esta tesis doctoral se presentan los resultados derivados del estudio de la población mestiza de Nicaragua mediante el análisis de los principales marcadores genéticos de interés forense y genético poblacional: ADN mitocondrial, microsatélites autosómicos y de los cromosomas sexuales y polimorfismos de único nucleótido del cromosoma Y.

Los sistemas genéticos de 15 STRs autosómicos, 17 STRs de cromosoma Y y 10 STRs de cromosoma X resultaron altamente polimórficos, generando un poder de discriminación y una probabilidad de exclusión "a priori" elevados. Estos parámetros indican que estos sistemas constituyen marcadores genético moleculares de gran rendimiento en la identificación forense de la población mestiza de Nicaragua.

Además, el estudio de estos marcadores ha proporcionado diversas evidencias que corroboran lo que narran los textos históricos, por lo que abre nuevas líneas de investigación sobre la historia genético-poblacional de Nicaragua. Según los registros históricos, algunos de los principales grupos que habitaron Nicaragua durante el período pre-colombino podrían haber migrado hacia el sur desde México, siendo los descendientes de culturas mesoamericanas como la cultura azteca. También, grupos pertenecientes a la familia lingüística *Chibcha* pudieron haber habitado la región montañosa central y en la costa Caribeña de Nicaragua. La huella de estas poblaciones se ha visto reflejada en la comparación de los linajes mitocondriales nativo americanos de los mestizos nicaragüenses con los de 40 poblaciones americanas recopiladas de la literatura. En este contexto, la población mestiza de Nicaragua se encontró próximamente relacionada con las poblaciones mesoamericanas, en particular con poblaciones de México, El Salvador y grupos *Chibcha* parlantes (Ngöbé).

En cuanto al estudio de los haplogrupos de ADNmt y cromosoma Y de la población mestiza de Nicaragua, confirmó un patrón asimétrico de mezcla entre mujeres nativas y hombres europeos (españoles) principalmente, así como un componente africano probablemente derivado de los colonos españoles con ascendencia norteafricana y/o de los esclavos africanos introducidos en el país durante el período colonial.

En este trabajo se observó que el componente nativo americano del ADNmt de la actual población mestiza de Nicaragua alcanza un 88,95%, siendo el haplogrupo A2 el más frecuente (73,62%), seguido de los haplogrupos B (14,11%) y D1 (1,22%). Los linajes restantes pertenecen a los haplogrupos no amerindios H, HV0, R, L0, L1, L2 y L3, que se han encontrado en bajas frecuencias.

Por otro lado, se observó que la mayoría de haplogrupos del cromosoma Y, determinados mediante el estudio de diversos Y-SNPs, se pueden clasificar dentro del acervo genético euroasiático. En particular, el haplogrupo R1b resultó ser el mayoritario (43,63%), el cual presenta unas frecuencias especialmente altas entre la población española. Los haplogrupos nativo americano Q y africano E también se observaron en la muestra poblacional, ambos con una frecuencia del 15,33%.

Al comparar los haplotipos de Y-STRs de la población mestiza de Nicaragua con los de otras poblaciones, se identificó una menor distancia genética entre Nicaragua y las poblaciones mestizas americanas y las europeas, en particular España. Asimismo, la comparación poblacional basada en las frecuencias alélicas de los loci X-STRs reflejó también una mayor similitud entre Nicaragua y las poblaciones americanas y españolas. La notable contribución española también se pudo observar mediante el análisis de mezcla basado en los STRs autosómicos que alcanzó el 69% en la muestra poblacional estudiada. La restante contribución de mezcla basada en los loci STRs autosómicos fue del 20,3% africana y 10,6% amerindia.

Los datos aquí recopilados aportan una información muy valiosa, al menos por dos razones. En primer lugar, estos son los primeros datos poblacionales de interés forense generados de la población mestiza de Nicaragua, por lo que presentan una utilidad forense para la identificación humana. Y en segundo lugar, la información genética obtenida es beneficiosa para apoyar nuevas investigaciones que pretendan entender mejor la historia de las poblaciones que habitaron las Américas.



## SUMMARY

This doctoral thesis presents the results derived from the study of the Nicaraguan mestizo population on the primary forensically relevant genetic markers (mitochondrial DNA, autosomal and sex chromosome microsatellites, and Y chromosome single nucleotide polymorphisms).

The 15 autosomal STR, 17 Y-STR and 10 X-STR systems were all highly polymorphic, yielding a high discrimination power and probability of exclusion. These parameters highlight the usefulness of the genetic markers studied herein for forensic identification purposes in the Nicaraguan mestizo population.

Additionally, the study of these markers has provided some evidence that is in agreement with the historical texts and thus opens new research lines about the population genetic history of Nicaragua. The historical records tell that some of the main groups that inhabited Nicaragua during the pre-Columbian period may have migrated southwards from Mexico, being the descendants of Mesoamerican cultures, such as the Aztecs. The *Chibchan*-speaking groups could have inhabited the central mountain region and the Caribbean coast of Nicaragua. The legacy of these populations was mirrored when comparing the Native American mtDNA lineages of Nicaraguan mestizos to 40 American populations compiled from the literature. In this context, the Nicaraguan mestizo population appeared more closely related to Mesoamerican populations, particularly Mexican populations, El Salvador and *Chibchan*-speaking groups (Ngöbé).

Regarding the study of mtDNA and Y chromosome haplogroups of the Nicaraguan mestizo population, an asymmetric pattern of admixture was confirmed involving mainly Amerindian women and European (Spanish) men, as well as an African component likely derived from the Spaniards with North African ancestry and/or from the African slaves. This work revealed that 88,95% of the mtDNA component of the current Nicaraguan mestizo population is accounted by a Native American contribution. Haplogroup A2 was the most common in the population (73,62%) followed by haplogroups B (14,11%) and D1 (1,22%). The remaining lineages belonged to non-Amerindian haplogroups H, HV0, R, L0, L1, L2 and L3 that appeared at low frequencies.

For the male counterpart, the majority of Y chromosome haplogroups, determined by the analysis of Y-SNPs, can be traced back to the Eurasian gene pool. The haplogroup R1b occurs at high frequency in the Spanish populations and was the most frequently observed haplogroup (43,63%) in the sample population. Native American and African haplogroups Q and E were also observed each with a frequency of 15,33%.

Genetic distances based on Y-STRs haplotypes, demonstrated a close relationship between Nicaraguan and other American mestizo and European

populations, particularly Spain. Inter-population comparison based on the allelic frequencies of X-STR loci also showed a similar relationship between Nicaraguan mestizos, the other American populations and Spanish populations. The substantial Spanish contribution can also be noted by autosomal STRs admixture analysis, which reached 69% in the studied population. The remaining admixture contribution based on autosomal STRs was African at 20,3% and Amerindian at 10,6%.

The data compiled here are of substantial value for at least two main reasons. First, these are the first forensically-relevant population data generated on the Nicaraguan mestizo population and thus have forensic utility in human identity testing. Second, the genetic data are useful to support further study to better understand the history of human beings populating the Americas.

## PUBLICACIÓN ORIGINAL Y COMUNICACIONES A CONGRESOS

Esta tesis se ha basado en la siguiente publicación original que se adjunta al final (Anexo 9):

**Núñez C**, Baeta M, Sosa C, Casalod Y, Ge J, Budowle B, Martínez-Jarreta B. *Reconstructing the population history of Nicaragua by means of mtDNA, Y-chromosome STRs, and autosomal STR markers*. Am J Phys Anthropol, 2010; 143 (4): 591-600.

Comunicaciones a congresos (Anexo 8):

- **Núñez C**, Sosa C , Baeta M, Casalod Y , Abecia E and Martínez-Jarreta B. Genetic Data of 15 STR-PCR Polymorphisms in a Mestizo population from Nicaragua (Central America). Póster en: Forensica 2008, Prague, Czech Republic 2008.
- Baeta M, **Núñez C**, Sosa C, Casalod Y, Gascón S, Ge J, Martínez-Jarreta B, Budowle B. Characterization of Y-STR loci in a population from Nicaragua (Central America) and study of population substructure. Póster en: 61st Annual Scientific Meeting of the American Academy of Forensic Sciences, Denver, CO (USA), Febrero 2009.
- **Núñez C**, Casalod Y, Baeta M, Sosa C, González-Andrade F, Martínez-Jarreta B, Budowle B. Patterns of mtDNA Diversity in a Central American population from Nicaragua. Póster en: XXI Congress of the International Academy of Legal Medicine, Lisboa, Portugal, Mayo 2009.
- **Núñez C**, Baeta M, Sosa C, Casalod Y, Ge J, Budowle B, Martínez-Jarreta B. Characterization of Y-STR, autosomal STR loci and mtDNA control region in a population from Nicaragua and study of the population substructure. Póster en: 21st International Symposium on Human Identification, San Antonio, Texas. Octubre 2010.

## ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADNmt	Ácido desoxiribonucleico mitocondrial
AMOVA	Análisis de varianza molecular
ATP	Adenosín trifosfato
CODIS	<i>Combined DNA Index System</i>
CRS	Secuencia de referencia de Cambridge
EMD	Escalamiento multidimensional
EMPOP	Base de datos poblacional de ADNmt del <i>European DNA Profiling Group</i>
Fw	<i>Forward</i>
GEP-ISFG	Grupo Español y Portugués de la Sociedad Internacional de Genética Forense
H	Cadena pesada
HLA	Antígeno leucocitario humano
HVS	Segmento hipervariable
HW	Ley de Hardy-Weinberg
Kb	Kilobase
L	Cadena ligera
LD	Desequilibrio de ligamiento
LR	Razón de verosimilitud
mARN	Ácido ribonucleico mensajero
MLP	Sonda multilocus
Mb	Megabase
MSY	Región específica masculina del cromosoma Y
NRY	Región no recombinante del cromosoma Y
OXPHOS	Fosforilación oxidativa
pb	Pares de bases
PC	Probabilidad de coincidencia al azar
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PD	Poder de discriminación
PE	Probabilidad de exclusión
Rv	<i>Reverse</i>
rARN	Ácido ribonucleico ribosómico
rCRS	Secuencia de referencia de Cambridge revisada
RFLP	Fragmentos de restricción polimórficos de longitud
SLP	Sondas unilocus
SNP	Polimorfismos de único nucleótido
SRY	Región determinadora del sexo del cromosoma Y
STR	Repeticiones en tándem cortas
tARN	Ácido ribonucleico de transferencia
TBE	Ácido etilendiaminotetraacético tris borato
TMRCA	Tiempo del ancestro común más reciente
VNTR	Número variable de repeticiones en tándem
X-SNP	SNP del cromosoma X
X-STR	STR del cromosoma X
YAP	Polimorfismo Alu del cromosoma Y
YCC	Consorcio del Cromosoma Y
Y-SNP	SNP del cromosoma Y
Y-STR	STR del cromosoma



## INTRODUCCIÓN

### ORGANIZACIÓN DEL GENOMA HUMANO

El genoma humano está constituido por unos 3.000 millones de pares de bases (pb). En cada una de las células humanas, el ADN se localiza principalmente en el núcleo, donde se encuentra compactado en los cromosomas. El genoma humano nuclear consiste en 22 pares de cromosomas autosómicos y un par de cromosomas sexuales, X e Y, cuya combinación determina el sexo del individuo. Adicionalmente, también existe una pequeña cantidad de ADN en las mitocondrias, orgánulos celulares encargados de la producción de energía.

La complejidad del genoma humano puede clasificarse según su localización, su repetitividad y su carácter codificante (Figura 1).

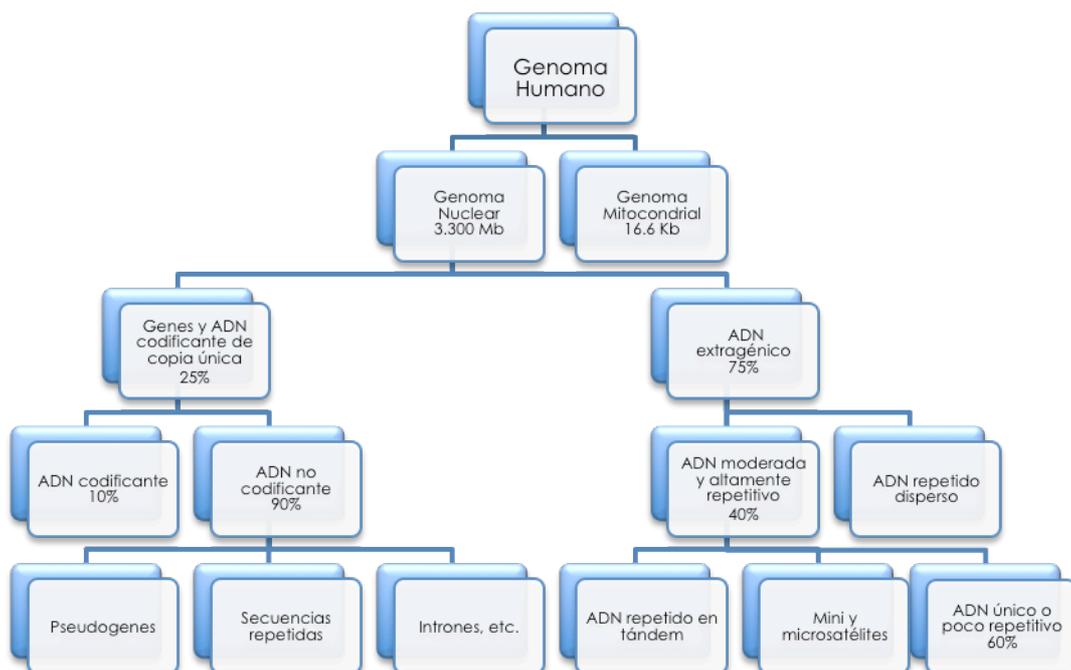


Figura 1. Esquema de la organización del genoma humano.

Gracias a la iniciativa internacional Proyecto Genoma Humano (PGH) dirigida a caracterizar la secuencia completa del genoma humano y que finalizó con éxito en el año 2003, la complejidad de nuestro genoma fue revelada casi por completo (International Human Genome Sequencing 2004; McPherson *et al.* 2001; Venter *et al.* 2001).

Dentro de la pequeña proporción de ADN codificante, sólo el 1,2% representan genes que codifican proteínas (International Human Genome Sequencing 2004). El resto incluye ADN no codificante al que se le atribuyen principalmente funciones estructurales y reguladoras. Es en este ADN donde se concentra la mayor parte de la variabilidad genética entre individuos (polimorfismos). Los polimorfismos genéticos, es decir, la variación en la secuencia de un lugar determinado del ADN entre los individuos de una población, también conocidos como marcadores genéticos, son los que permiten usar la información genética con fines identificativos y, por lo tanto, son los principales protagonistas en genética forense.

### LA GENÉTICA FORENSE

La genética forense es una disciplina relativamente nueva que ha revolucionado las investigaciones forenses, pasando a ser de inestimable ayuda en la resolución de casos criminales y civiles.

El principal objetivo de esta especialidad es identificar el origen de muestras biológicas a través del estudio del ADN. Todo organismo vivo contiene ADN, el cual presenta variabilidad entre y dentro de las diferentes especies, por lo que cualquier material biológico asociado a un caso legal puede proporcionar información sobre su origen.

La primera herramienta genética utilizada para la identificación humana fueron los grupos sanguíneos ABO después de su descubrimiento en 1900 (Landsteiner 1900). Seguidamente se descubrieron diversos polimorfismos en proteínas plasmáticas y sistemas enzimáticos que analizados en conjunto resultaban eficaces para la identificación (Martinez-Jarreta 1999; Murch y Budowle 1986). Sin embargo, la revolución de la genética forense podría datarse a finales del siglo XX, cuando Jeffreys *et al.* (1985b) describieron un método de identificación individual que denominaron *DNA fingerprinting* o huella genética. Este método consistía en el análisis de los polimorfismos minisatélite o número variable de repeticiones en tándem (*Variable Number of Tandem Repeats, VNTRs*) mediante el corte con enzimas de restricción y su posterior hibridación con sondas multi locus (*Multi Locus Probe, MLP*) (Jeffreys *et al.* 1985a). Las sondas MLP reconocen un núcleo común de 10-15 pb compartido por diferentes minisatélites y su posterior detección por *Southern Blot* permitía revelar un patrón multibanda resultante de los fragmentos de restricción polimórficos de longitud (*Restriction Fragment Length Polymorphisms, RFLPs*). La ventaja principal de estos polimorfismos era su elevado poder de discriminación. Sin embargo, su principal limitación residía en que para su estudio requerían grandes cantidades de ADN de alto peso molecular, situación poco habitual en las muestras de ADN forenses debido a

su escasez y/o degradación. Además, el complejo patrón de bandas era muchas veces difícil de interpretar, y en casos de mezclas no permitía diferenciar entre los distintos contribuyentes.

Aunque el uso del *DNA fingerprinting* persistió durante unos años en las investigaciones de paternidad, la casuística forense se concentró en el análisis de minisatélites específicos mediante sondas unilocus (*Single-locus Probes, SLPs*) (Jeffreys *et al.* 1985a; Jobling y Gill 2004). Estas sondas, a diferencia de las MLPs que se unen a múltiples loci minisatélite, son específicas para un solo locus y por tanto dan lugar a “perfiles de ADN” (*DNA profiling*) más simples, facilitando de esta forma la interpretación de la prueba.

El siguiente acontecimiento que supuso un nuevo paso en la genética forense, y que ahora representa la base del tipado de ADN forense, fue el desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Mullis *et al.* 1986). La amplificación de ADN mediante PCR proporcionaba un enorme incremento en la sensibilidad permitiendo el análisis de pequeñas cantidades de ADN. Los sistemas iniciales basados en la PCR consistían en el análisis de un pequeño número de polimorfismos de único nucleótido (*Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs*) del locus antígeno leucocitario humano (HLA) (Helmuth *et al.* 1990). Sin embargo, fue el descubrimiento de los microsatélites o repeticiones cortas en tándem del ADN nuclear (*Short Tandem Repeats, STRs*) junto con la introducción de la tecnología de secuenciación automática, lo que condujo a los potentes sistemas de identificación individual actuales. Es por ello, que los STRs autosómicos son la herramienta básica de los laboratorios de genética forense, y el vertiginoso avance en la tecnología de análisis de ADN ha permitido la generación de kits comerciales altamente sensibles para el análisis de estos marcadores incluso en cantidades mínimas de ADN.

Pero, a pesar del acaparamiento de los STRs nucleares en la ciencia forense, no son los únicos marcadores que ofrecen ventajas. Los SNPs son los polimorfismos más abundantes en el genoma humano y recientemente se han empezado a explotar sus cualidades dentro de esta área (Budowle 2004; Budowle y van Daal 2008). Por otro lado, los polimorfismos de los cromosomas sexuales también tienen un papel muy importante en esta disciplina, así como el ADN mitocondrial (ADNmt).

## STRS AUTOSÓMICOS

## 1. Características generales

Los STRs son regiones de ADN repetitivo que se encuentran distribuidas a lo largo del genoma, existiendo un microsatélite por cada 5.000-10.000 pb (Beckman y Weber 1992) y están compuestos por una secuencia de 1-7 pb que se repite en tándem desde 3 a 50 veces aproximadamente (Butler 2005) (Figura 2).

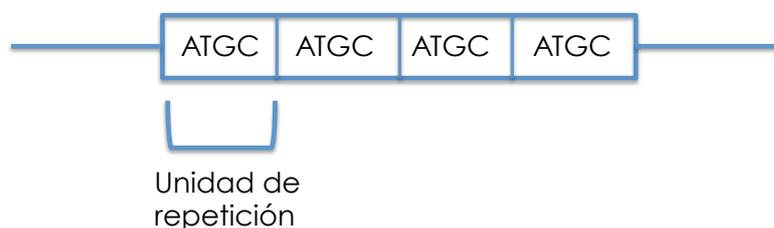


Figura 2. Esquema básico de un STR. En este caso la unidad de repetición (ATGC) se repite 4 veces.

## 1.1. Tipos de STRs

Las secuencias de STRs pueden variar en el tamaño de la unidad de repetición, en el número de veces que se repite la unidad/es de repetición y en las características del patrón de repetición.

Según el número de nucleótidos que forman la unidad de repetición, los STRs pueden ser mono, di-, tri-, tetra-, penta- y hexanucleótidos (Jin *et al.* 1994). En cuanto al patrón de repetición los STRs pueden clasificarse en 4 categorías (Butler 2005):

- *Repeticiones simples*, con unidades de repetición idénticas en longitud y secuencia.
- *Repeticiones compuestas*, constan de unidades con la misma longitud pero de secuencias diferentes.
- *Repeticiones complejas*, que pueden contener varios bloques de repeticiones de longitud variable además de secuencias variables intermedias.
- *Repeticiones hipervariables complejas*, las cuales poseen numerosos alelos que difieren tanto en tamaño como en secuencia y por lo tanto

ofrecen grandes dificultades en cuanto a la nomenclatura y a la reproducibilidad del genotipado entre diferentes laboratorios.

## 1.2. Tasa de mutación

Las tasas de mutación de los loci STRs son elevadas, desde  $10^{-2}$  a  $10^{-6}$  mutaciones por locus por generación (Chakraborty *et al.* 1997). La variabilidad alélica de los microsatélites se genera mediante un peculiar patrón de deslizamiento (*slippage*) de la enzima polimerasa (Levinson y Gutman 1987), en el cual el alelo gana o pierde una o varias unidades, siendo las ganancias o pérdidas de un solo tándem las más habituales (Weber y Wong 1993).

## 2. STRs autosómicos y genética forense

Debido a su abundancia en el genoma humano, su naturaleza polimórfica, su relativo pequeño tamaño (100-400 pb) y que es posible el estudio simultáneo de varios STRs en un único análisis, los STRs autosómicos se convirtieron en unos marcadores ideales para la identificación individual en genética forense. Las dos grandes áreas de aplicación de los polimorfismos STR en este sentido son la investigación de vestigios biológicos de interés criminal y la investigación biológica de la paternidad.

Los marcadores STR fueron primeramente descritos como herramientas para la identificación humana a principios de los años 90 (Edwards *et al.* 1991; Edwards *et al.* 1992; Hagelberg *et al.* 1991; Jeffreys *et al.* 1992). En el Reino Unido el *Forensic Science Service* (FSS) desarrolló el primer sistema de tipado de STRs diseñado para el análisis forense, el cual consistía en la amplificación en la misma reacción de cuatro loci STR (TH01, VWA, FES/FPS, y F13A1 (Clayton *et al.* 1995a; Kimpton *et al.* 1994; Lygo *et al.* 1994). Seguidamente, una segunda generación multiplex (SGM) fue desarrollada con los loci TH01, VWA, FGA, D8S1179, D18S51 y D21S11 (Kimpton *et al.* 1996). Teniendo en cuenta el prometedor panorama que ofrecía la tecnología de tipado de STRs autosómicos y el éxito obtenido en el Reino Unido, el laboratorio del FBI estableció, en 1997, un núcleo de 13 loci STR que formarían la base del CODIS (*Combined DNA Index System*), la base de datos de los Estados Unidos (Budowle *et al.* 1998). Desde entonces, fueron apareciendo nuevos kits, que incluyen los 13 loci STR del CODIS además de otros marcadores que incrementan el poder de discriminación (para revisión ver Butler 2006).

### 2.1. Criterios de selección de los STRs para la identificación humana

A la hora de seleccionar los loci STRs más adecuados para aplicaciones identificativas se deben valorar una serie de criterios:

#### 2.1.1. Elevado poder de discriminación y heterocigosidad

Para valorar la aplicación de un marcador en genética forense se debe tener en cuenta su poder de discriminación y heterocigosidad. Cuanto mayores sean estos valores mayor será la capacidad de dicho marcador para la identificación individual, meta clave en esta disciplina.

Los loci seleccionados, por lo tanto, presentan una elevada variabilidad caracterizada por un poder de discriminación no inferior a 0.9 y una heterocigosidad superior al 70% (Carracedo 1998).

#### 2.1.2. Baja tasa de mutación

En situaciones donde se compara la evidencia con el perfil de un sospechoso, la tasa de mutación no es tan importante puesto que las mutaciones ocurridas en la línea germinal son mantenidas a lo largo de toda la vida (Butler 2006). Sin embargo, las tasas de mutación pueden jugar un papel importante en el diagnóstico de parentesco (Leclair *et al.* 2004), ya que las relaciones parentales se realizan bajo la asunción de que los alelos se mantienen estables en su paso de generación en generación, por lo que la presencia de mutaciones puede provocar falsas exclusiones (Gonzalez-Andrade *et al.* 2009b).

#### 2.1.3. Tamaño reducido

Por lo general, las evidencias obtenidas en los casos de criminalística suelen contener leves trazas de ADN o ADN altamente degradado. En estos casos, el análisis mediante fragmentos de tamaño reducido presenta una mayor eficacia. Los STRs son mejores candidatos que los VNTRs ya que su tamaño es menor, y en efecto son la herramienta más utilizada en el análisis de ADN de muestras forenses. Sin embargo, en determinadas ocasiones se requieren fragmentos de tamaño aún menor, por lo que la reducción del tamaño de los fragmentos de amplificación de algunos STRs (miniSTRs) se ha convertido en un método muy prometedor para el tipado de ADN degradado (para revisión ver Baeta *et al.* 2010).

#### 2.1.4. Rango alélico reducido

A pesar de que los loci STR con un amplio rango de alelos (especialmente el locus FGA) se caracterizan por un alto poder de discriminación, pueden conllevar una amplificación diferencial de los alelos de alto y bajo peso molecular, llevando a pérdidas de los alelos de mayor tamaño (Carracedo 1998), hecho más evidente cuando el ADN se haya degradado.

En este sentido, puede lograrse un mayor poder de discriminación mediante el uso de dos o más loci STR moderadamente polimórficos que ocupen un menor rango alélico (Butler 2006).

#### 2.1.5. Bajo porcentaje de alelos tartamudos

Los alelos tartamudos (*stutter*) son productos que se generan durante la PCR por el fenómeno *slippage* y se caracterizan por tener una repetición menos que el alelo real (Hauge y Litt 1993; Walsh *et al.* 1996). La altura del pico de los *stutter* es típicamente un 10-15% de la altura del alelo real. Esta altura aumenta en los alelos más grandes dentro de un locus y disminuye en los STRs con unidades de repetición mayores (Butler 2005). Estos artefactos pueden suponer una desventaja sobretudo en los casos de mezclas ya que pueden ser confundidos con alelos reales (Gill *et al.* 2006).

En este sentido, los loci STR con repeticiones tetranucleotídicas (p.ej. CSF1P0 y TH01) son los más utilizados en genética forense debido a su menor porcentaje de *stutters*, en comparación con los de repeticiones di- y trinucleotídicas. Por otro lado, las repeticiones penta- y hexanucleotídicas (p.ej. Penta D y E) aún presentan un porcentaje menor de alelos tartamudos, aunque son menos frecuentes en el genoma (Bacher 1998).

#### 2.1.6. Localización cromosómica diferencial

A la hora de seleccionar loci STR para fines forenses uno de los requisitos es que no se encuentren ligados, de manera que sea posible aplicar la regla del producto en la valoración probabilística de coincidencia al azar de los perfiles de ADN que incluyen múltiples STRs (Butler 2006). Para ello se buscan loci que se localicen en distintos cromosomas o distantes entre sí en un mismo cromosoma.

### 3. Interpretación de los perfiles de STRs. Bases de datos poblacionales

Una vez obtenido el perfil de STRs de una muestra problema y determinada la coincidencia con el perfil de la muestra de referencia, se le debe dar un valor de significación a dicha coincidencia. De esta forma se determinará la probabilidad de que la muestra problema provenga del individuo al cual pertenece la muestra de referencia, en relación a un individuo tomado al azar de la población. Para ello es imprescindible acudir a la genética de poblaciones y el análisis estadístico de los datos.

En genética forense la ley/equilibrio de Hardy-Weinberg (HW) (Hardy 1908; Stern 1943) se utiliza junto con las frecuencias alélicas de los loci STR obtenidas de bases de datos poblacionales para calcular las frecuencias de los genotipos. La ley HW establece que en una población panmíctica (todos los individuos tienen la misma probabilidad de aparearse y el apareamiento es al azar) sin migración o selección contra un genotipo y cuya tasa de mutación es despreciable, la proporción de los diferentes genotipos permanecerá constante generación tras generación (Dorak 2005). Por lo tanto, el que una población se encuentre en equilibrio HW indicará que las frecuencias alélicas así como los genotipos se muestran invariables de generación en generación, y además que los alelos, dentro de un determinado locus, se heredan independientemente uno de otro.

Para calcular la frecuencia de un perfil de STRs determinado, mediante el equilibrio HW, se calcula la frecuencia genotípica esperada para cada locus usando las frecuencias alélicas observadas en la base de datos. Finalmente, la frecuencia total del perfil de STRs se determina multiplicando la frecuencia genotípica de cada locus, ya que los alelos de cada locus se heredan independientemente, lo cual se conoce como la regla del producto (Evet 1998).

Una base de datos poblacional de frecuencias alélicas se construye calculando la ocurrencia de los alelos en la población determinada. Con respecto al tamaño de la base de datos, se recomienda que incluya al menos unos 100-150 individuos no relacionados de la población para generar buenas estimaciones estadísticas del valor de la evidencia de ADN (Chakraborty 1992). Cuanto mayor sea la base de datos mejor representará a la población en cuestión. Sin embargo, los loci STR presentan un elevado número de alelos distintos dada su gran variabilidad, y en una población grande resulta difícil abarcar todos los alelos. En consecuencia las frecuencias son sólo estimaciones, propensas a imprecisiones por la limitación del muestreo. Este hecho no afectaría tanto a los alelos comunes como a los

alelos raros, los cuales están pobremente representados en la base de datos. Para poder compensar estas situaciones, consecuencia de un muestreo limitado, se han planteado varias posibilidades (Balding 1995; Balding y Nichols 1994; Foreman y Evett 2001; NRC 1996). Pero además de aplicar esta corrección para el efecto del muestreo, a la hora de calcular las frecuencias de los perfiles genéticos es importante tener en cuenta la presencia de subpoblaciones. Algunas poblaciones pueden no ser homogéneas y comprender varias subpoblaciones relacionadas, como por ejemplo EEUU, donde conviven distintos grupos raciales (amerindios, asiáticos, hispanos, caucasoides y afroamericanos) (Ge *et al.* 2010), los cuales presentan diferencias en las frecuencias de sus datos poblacionales.

Las bases de datos normalmente están compuestas por individuos de la población general y, por lo tanto, nos proporcionan una estimación promedio de las frecuencias alélicas de la población global. Se ha demostrado la influencia de las subpoblaciones, la cual puede conllevar sesgos en la estimación de las frecuencias de los perfiles genéticos (Curran *et al.* 2003). En una subpoblación los individuos están más relacionados entre sí que en relación a la población general, es decir, existe una mayor probabilidad de que dos individuos compartan marcadores genéticos debido a la ascendencia común y no al azar (Triggs y Buckleton 2002). El *National Research Council II Report* (NRC 1996) recomienda el uso del estadístico *Fst* de Wright (Wright 1922; Wright 1965) o valor theta ( $\theta$ ) para estimar el grado de diferenciación entre subpoblaciones y corregir las desviaciones del equilibrio HW debido a la subestructura poblacional (Buckleton *et al.* 2006). Así, el *NRC II Report* sugiere utilizar un valor theta de 0,01 para poblaciones aparentemente homogéneas, y de 0,03 para aquellas aisladas y claramente diferenciadas. Sin embargo, varios estudios han observado que, en general, el nivel de diferenciación o subestructura poblacional basada en loci STRs es mucho menor que 0,01 (Foreman y Lambert 2000; Foreman *et al.* 1998; Gill *et al.* 2003). Por lo tanto, este valor sería conservativo, y la determinación de la frecuencia de un perfil de ADN no se vería afectada, tanto si se tienen en cuenta o se ignoran los efectos de subestructura, al menos para las poblaciones europeas (Budowle y Chakraborty 2001).

Actualmente, las bases de datos poblacionales de perfiles de STRs autosómicos más conocidas son la del grupo de trabajo en ADN (DNA Working Group) de la *European Network of Forensic Science Institutes* (ENFSI) ([www.str-base.org](http://www.str-base.org)), y la del *National Institute of Standards and Technology* (NIST) ([www.cstl.nist.gov/biotech/strbase](http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase)).

### 4. STRs autosómicos y genética de poblaciones

Desde los estudios iniciales encaminados a la reconstrucción de la evolución humana, muchos análisis genéticos basados en marcadores tipo microsatélite se han centrado en desentrañar los procesos históricos de la diferenciación humana, tanto a una escala global (el origen de los humanos) (Gonser *et al.* 2000; Jorde *et al.* 1997; Reich y Goldstein 1998; Zhivotovsky *et al.* 2003) como a una escala más local (el origen de poblaciones específicas) (Bosch *et al.* 2000; Martínez-Cruz *et al.* 2011; Zabala Fernández *et al.* 2005). La evolución de estos polimorfismos en poblaciones aisladas, al ser neutros selectivamente, está controlada únicamente por mutación y deriva genética (Perez-Lezaun *et al.* 1997). Tras genotipar una población, la distribución de las frecuencias alélicas de los loci STR puede compararse con la de otras poblaciones a través de una variedad de medidas de distancia genética para entender la evolución de la diferenciación poblacional (Cavalli-Sforza 1997).

Por otro lado, la importancia de los estudios genético poblacionales basados en el análisis de STRs autosómicos queda demostrada, tal y como se ha comentado en el apartado anterior, con la generación y ampliación de bases de datos poblacionales con fines forenses.

## EL ADN MITOCONDRIAL

### 1. Características generales

El ADN mitocondrial (ADNmt) ha pasado a ser una herramienta fundamental en el ámbito de la genética desde finales del siglo XX, siendo de especial interés en genética forense y genética de poblaciones.

El ADNmt es una molécula circular, cerrada y de doble cadena, que se encuentra en el interior de las mitocondrias. El genoma mitocondrial fue secuenciado en su totalidad por primera vez por Anderson *et al.* (1981). Está compuesto por 16569 bp con diferente distribución en las dos cadenas. La cadena pesada (*Heavy chain*, H) es rica en purinas, mientras que la cadena ligera (*Light chain*, L) es rica en pirimidinas.

Sea cual sea la aplicación del estudio del ADNmt, su análisis se basa en primer lugar en la comparación con una secuencia de referencia. Durante muchos años, la secuencia original de Anderson o secuencia de referencia

de Cambridge (CRS) fue la secuencia de referencia con la que se comparaban nuevas secuencias. En 1999, el material placentario original usado por Anderson *et al.* (1981) para generar la CRS fue re-secuenciado (Andrews *et al.* 1999). La secuencia obtenida en 1981 derivó principalmente de un individuo de descendencia europea; sin embargo, también contenía algunas secuencias HeLa y bovinas que rellenaron los huecos originados por los procedimientos rudimentarios de secuenciación de ADN de aquél entonces. Con las mejoras en la tecnología de secuenciación de ADN que tuvieron lugar durante las dos décadas siguientes, se asumió que se debían rectificar los errores originales para permitir un uso más robusto de la secuencia de referencia en el futuro. El reanálisis posterior (Andrews *et al.*, 1999) confirmó todos los nucleótidos de la secuencia original publicada excepto 11 posiciones de la región codificante, mientras que no se encontró ningún error en la región control. Esta nueva secuencia llamada la secuencia de referencia de Cambridge revisada (rCRS) es actualmente el estándar aceptado para la comparación.

Al igual que el ADN nuclear, el ADNmt presenta dos regiones, una región codificante y una no codificante (Figura 3), también llamada región control o *D-loop*. La región codificante, que representa el 90% del genoma mitocondrial, contiene 37 genes, 13 de los cuales codifican para polipéptidos involucrados en la cadena de fosforilación oxidativa, y el resto para 22 moléculas de tARN y 2 de rARN (12S y 16S) (Anderson *et al.* 1981; Andrews *et al.* 1999).

La organización del ADNmt es única en cuanto a economía. Entre los genes no existen o existen muy pocas regiones no codificantes o intrones, y en muchos casos los codones de terminación no son codificados en el ADN sino que son generados post-transcripcionalmente por poliadenilación de los mARNs (Anderson *et al.* 1981).

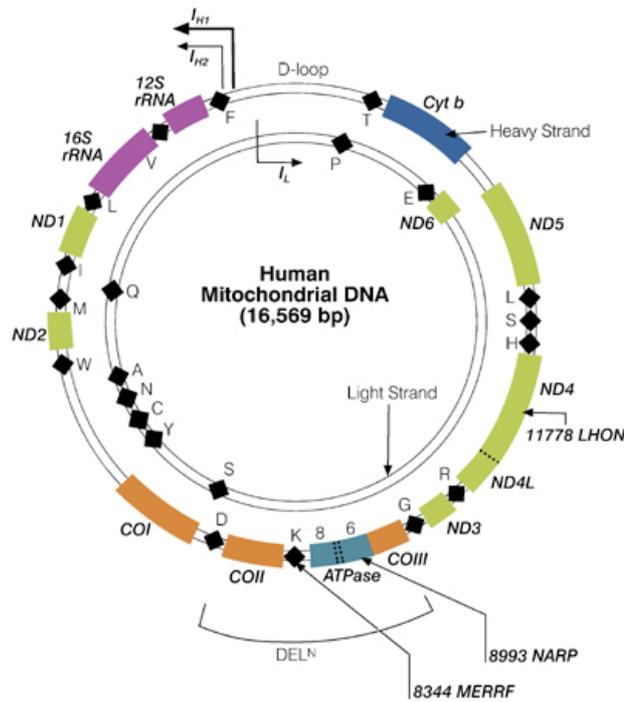


Figura 3. Estructura del ADNmt humano. D-loop = región control no codificante; light/heavy strand = cadenas ligera y pesada. Tomado de Kyriakouli et al. (2008).

Por otro lado, la región no codificante que alberga tan solo unas 1,2 kb, contiene el origen de la replicación de la cadena H, el origen de la transcripción de ambas cadenas y regiones reguladoras para la replicación y transcripción (Taanman 1999). Esta región es muy polimórfica y presenta dos regiones hipervariables bien caracterizadas, la HVSI y HVSII, de unas 400 bp cada una. Existe una tercera región hipervariable, la HVSIII, que es analizada en algunos casos, sobre todo para diferenciar entre secuencias de ADNmt que son idénticas para HVSI y HVSII (Lutz et al. 2000). Dentro de estas regiones, la tasa de mutación no es constante, habiendo sitios con una mayor tasa de cambio que otros (Meyer et al. 1999). En cuanto a los polimorfismos que encontramos en la región control del ADNmt, se pueden clasificar en dos tipos: de secuencia y de longitud.

Los *polimorfismos de secuencia* se refieren a mutaciones puntuales, es decir, mutaciones de un único nucleótido, y éstas a su vez pueden ser transiciones o transversiones. La mayoría de los polimorfismos de secuencia se encuentra dentro de la región control y las transiciones son el tipo de sustitución predominante (Meyer et al 1999). Por otra parte, los *polimorfismos de longitud*, hacen referencia a la variación en longitud de los trectos homopoliméricos dentro de la región control, debida a inserciones o deleciones de una o más bases, generalmente de citosinas.

Aunque el ADNmt constituye menos del 1% del ADN celular total, existe en un gran número de copias por célula. Cada célula humana contiene cientos de mitocondrias y miles de moléculas de ADNmt, en número variable según la especie, tipo celular, necesidades metabólicas y momento funcional del tejido.

La función de las mitocondrias es puramente energética. Estas organelas se encargan de la producción de energía necesaria para los procesos biológicos del organismo, quemando las calorías de la dieta con el oxígeno respirado, para generar energía química. A su vez, generan el calor necesario para mantener la temperatura corporal. Sin embargo, para entender mejor su función e implicaciones en el ser humano, nos tenemos que remontar primero a sus orígenes, hace unos mil millones de años.

## 2. El origen de la mitocondria

La célula eucariota tal y como la conocemos actualmente, hace unos 2-3 mil millones de años podría haber carecido de mitocondrias. Según la teoría postulada por Sagan (1967), se habría producido una simbiosis entre lo que parece haber sido una célula glicolítica motril y una  $\alpha$ -protobacteria, que posteriormente evolucionaría a la actual mitocondria.

Inicialmente, cada organismo contenía los genes necesarios para la vida independiente. Sin embargo, durante las siguientes generaciones, las células descendientes de la simbiosis inicial podrían haber experimentado una serie de reorganizaciones genómicas, dando lugar a la especialización de la mitocondria en la producción de energía, y en su conjunto, a la célula eucariota actual.

La reestructuración del genoma proto-mitocondrial pudo haber involucrado la transferencia de unos 1500 genes al genoma nuclear, manteniendo el ADNmt únicamente 37 genes codificadores de subunidades del complejo enzimático para la fosforilación oxidativa (OXPHOS) (Dyall *et al.* 2004). Existen varias hipótesis que explican por qué estas subunidades del complejo OXPHOS han quedado retenidas en el ADNmt (Allen 1993; von Heijne 1986; Wallace 1982).

En la práctica, los genes mitocondriales codificados por el ADN nuclear son traducidos a proteínas por ribosomas citosólicos y selectivamente importados a la mitocondria.

### 3. La herencia del ADN mitocondrial

Una vez el simbionte mitocondrial se hubo establecido, la presión selectiva pudo haber conducido al ADNmt a ser uniparental, siendo heredado exclusivamente por vía materna.

Varios autores han postulado que la mezcla de citoplasmas durante la fusión gamética podría resultar en una rápida dispersión de elementos citoplasmáticos deletéreos a través de poblaciones sexuales (Cosmides y Tooby 1981; Eberhard 1980). Este argumento asume una falta de control de la replicación intracelular y la subsiguiente segregación del ADN citoplasmático en la gametogénesis. Sin este control pero con una transmisión biparental, un genoma mitocondrial germinal con una ventaja replicativa sobre el genoma *wild-type* podría transmitirse a la mayoría de gametos. Esta ventaja de segregación, podría acarrear efectos negativos en el *fitness* del huésped, los cuales se expandirían a través de la población. Este escenario, en términos evolutivos, podría conducir a una mala adaptación, por lo que se esperaría que la selección natural favoreciese las variantes genéticas que minimizasen la posibilidad de dispersión de estas mutaciones mitocondriales deletéreas. Un posible mecanismo para ello sería restringir la transmisión de mitocondrias a uno de los progenitores (Hoekstra 2000).

La primera evidencia directa de la herencia uniparental del ADNmt fue obtenida por Dawid y Blackler (1972), que demostraron una herencia maternal en el género de ranas *Xenopus*. A partir de entonces, esta teoría empezó a ganar popularidad y obtuvo apoyo en numerosos estudios en los cuales no se encontraron evidencias de transmisión del ADNmt paterno en una amplia gama de especies (Giles *et al.* 1980; Gyllensten *et al.* 1985; Hayashi *et al.* 1978; Hutchison *et al.* 1974). Además, otros estudios mostraron que parece existir una eliminación del ADNmt del espermatozoide en el citoplasma del cigoto en ratones y hámsteres (Kaneda *et al.* 1995). Por otro lado, en primates y ganado, este proceso involucra la ubiquitinación del ADNmt del espermatozoide y el subsiguiente reconocimiento y digestión proteolítica por la célula femenina (Sutovsky *et al.* 2000).

### 4. El cuello de botella y la heteroplasma en el ADNmt

Una vez conseguido que la herencia sea uniparental, otra restricción que podría resultar necesaria en términos evolutivos sería la limitación de linajes de ADNmt transmitidos por la madre a la descendencia.

El ADNmt posee una tasa de mutación elevada, estimada en unas 2.5 sustituciones por sitio y por millón de años (Howell *et al.* 1996; Parsons *et al.*

1997). Por su ubicación en la mitocondria, el ADNmt está expuesto a un elevado número de radicales libres, los cuales crean un ambiente altamente oxidativo que provoca daño en el ADNmt. Además, a diferencia del ADN nuclear, carece de la protección que las histonas otorgan y sus mecanismos de reparación son limitados (Awise 1991). Todo ello, hace que el ADNmt sea más susceptible a padecer mutaciones que pueden provocar un amplio rango de variantes deletéreas generadoras de una variedad de potenciales efectos perjudiciales.

De no existir ningún mecanismo compensador, en un mismo linaje se podrían acumular mutaciones deletéreas que acabarían extinguiéndolo, según el fenómeno conocido como "*Muller's ratchet*" (Muller 1964). En consecuencia, la introducción de un cuello de botella germinal que limite el número de moléculas de ADNmt transmitidas entre generaciones, mejoraría este problema incrementando la tasa de filtración de moléculas mutantes en la línea germinal materna por deriva genética (Bergstrom y Pritchard 1998).

Normalmente un individuo contiene solo un tipo de ADNmt, lo que se conoce como *homoplasmia*. Sin embargo, debido al elevado número de copias de ADNmt por célula, una mutación en alguna molécula de ADNmt resultaría en una mezcla de variantes de genomas de ADNmt, condición conocida como *heteroplasmia*. La heteroplasmia es definida por la presencia de dos o más subpoblaciones de ADNmt en una mitocondria, célula, tejido, órgano o individuo (Budowle *et al.* 2003a). A su vez, la heteroplasmia puede ser de longitud (debido a una inserción o delección) o de posición (debido a un cambio en un nucleótido). Un estado heteroplásmico también se alcanzaría si el ADNmt paterno entrara en el cigoto durante la fertilización. Hasta hace poco, la fuga de ADNmt paterno se creía imposible (White *et al.* 2008) pero actualmente se sabe que esto no es del todo cierto ya que se han observado varios casos en la naturaleza (Arunkumar *et al.* 2006; Kvist *et al.* 2003; Meusel y Moritz 1993; Schwartz y Vissing 2002; Theologidis *et al.* 2007). Estos ejemplos muestran que los mecanismos de prevención de la transmisión de ADNmt paterno no se conocen completamente y a veces podrían fallar (Birky 1995; Thompson *et al.* 2003).

## 5. Recombinación

Una característica del ADNmt que ha sido objeto de largo debate desde hace unos años es la ausencia de recombinación. Hasta finales de los años 90, el hecho de que el ADNmt no padece recombinación parecía algo establecido y aceptado (Wallace *et al.* 1999). Pero posteriormente este punto

de vista fue reevaluado y se sugirió que la recombinación podría ser posible en animales ya que diversos estudios mostraron que:

- a) La mitocondria posee la maquinaria enzimática necesaria para la recombinación (Thyagarajan *et al.* 1996).
- b) La recombinación de ADNmt está ampliamente distribuida en plantas y hongos (Barr *et al.* 2005).
- c) Existe recombinación intramolecular en nemátodos (Lunt y Hyman 1997) y humanos (Holt *et al.* 1997; Tang *et al.* 2000).
- d) Existe recombinación intermolecular en animales con un único sistema de herencia mitocondrial (Burzynski *et al.* 2006; Ladoukakis y Zouros 2001).

Además, a finales del siglo XX, varios autores ofrecerían evidencias de recombinación del ADNmt humano (Awadalla *et al.* 1999; Eyre-Walker *et al.* 1999; Hagelberg *et al.* 1999). Sin embargo, estos estudios utilizaron una metodología y una calidad de secuencias que se llevó a escrutinio, y los resultados que obtuvieron no se repitieron en análisis posteriores (Arctander 1999; Jorde y Bamshad 2000; Kumar *et al.* 2000; Macaulay *et al.* 1999b; Parsons y Irwin 2000). A raíz de todas estas observaciones, actualmente se acepta que la recombinación de ADNmt puede ocurrir.

Dadas las particularidades del ADNmt, anteriormente mencionadas, su estudio reviste gran importancia en varias disciplinas de la genética humana.

### **6. ADNmt y genética de poblaciones**

El primer polimorfismo examinado en humanos con fines evolutivos se describiría en el ADNmt en 1980 (Brown 1980; Denaro *et al.* 1981). A partir de ese momento, el conocimiento de la variabilidad del ADNmt en poblaciones humanas ha ido cobrando cada vez mayor interés y ganando aplicaciones y utilidades en un muy elevado número de análisis evolutivos y filogenéticos.

En los inicios de los años 80, la mayoría de estudios de ADNmt se realizaban con enzimas de restricción sobre el conjunto del genoma de esta organela. Esta aproximación involucraba el uso de unas 5 o 6 enzimas en un número pequeño de muestras (RFLPs, de baja resolución) (Brown 1980). Rápidamente, se incorporaron a su análisis un mayor número de enzimas (12 o 14), aumentando con ello la resolución de la técnica (RFLPs de alta resolución) (Cann *et al.* 1987), y finalmente con la introducción de la PCR (Mullis *et al.* 1986) empezaría a ganar importancia la secuenciación del ADNmt. Esta

técnica ha permitido profundizar aún más en el estudio del ADNmt, ya que aporta mayor cantidad de información gracias a su elevado poder de resolución (Richards *et al.* 1996; Vigilant *et al.* 1991). No obstante, mientras que la secuenciación se ha concentrado principalmente en la región control del ADNmt, y en especial en el segmento HVSI, la técnica de RFLP se siguió utilizando durante años principalmente en la región codificante.

Finalmente, la máxima resolución en el análisis se obtuvo con la secuenciación del genoma mitocondrial completo. El primer trabajo publicado sobre análisis de genomas completos se debe a Finnila *et al.* (2001) en el cual se obtuvieron un total de 192 genomas mitocondriales completos de individuos finlandeses. Seguidamente, el número de trabajos de este tipo fue incrementando a la par que se refinaba el conocimiento de la filogeografía de los haplogrupos del ADNmt (Achilli *et al.* 2004; Macaulay *et al.* 2005; Palanichamy *et al.* 2004; Tamm *et al.* 2007).

El nivel de resolución de estas técnicas ha tenido efectos positivos, favoreciendo una mejor interpretación de la evolución de nuestra especie. El uso de RFLPs de baja resolución apoyaba el modelo "multirregional" del origen de los humanos modernos, que propone que nuestros ancestros habrían evolucionado a humanos modernos en diferentes partes del mundo (Excoffier y Langaney 1989; Templeton 1993). Sin embargo, el uso de RFLPs de alta resolución y la secuenciación de las regiones hipervariables, ha conducido a una interpretación diferente (Cann *et al.*, 1987; Vigilant *et al.*, 1991), así como a obtener una filogenia de ADNmt mucho más detallada. En 1987, Rebecca Cann, Mark Stoneking y Allan Wilson, utilizando RFLPs de alta resolución, presentaban un árbol no tan estrellado como el resultante tras el análisis con RFLPs de baja resolución que mostraba una marcada división entre los africanos sub-saharianos y los no africanos. Cann *et al.* (1987) interpretarían estos resultados de forma impactante al señalar que constituían la evidencia de un origen reciente del humano moderno, "fuera de África" (modelo "Out of Africa"), y finalmente establecían la hipótesis de un antecesor mitocondrial africano común que sería denominado la "Eva mitocondrial" (*mitochondrial Eve*) (Cann *et al.* 1987).

Se puede concluir que la combinación de ambos procedimientos, RFLPs y la secuenciación de las regiones hipervariables, ha proporcionado, no obstante, buenas estimaciones filogenéticas que han sido posteriormente confirmadas y refinadas mediante la secuenciación del genoma mitocondrial completo (Macaulay *et al.* 1999a; Richards y Macaulay 2001). De esta forma, los estudios filogeográficos del ADNmt humano han revelado una correlación significativa entre los linajes del ADNmt y los orígenes geográficos de las poblaciones humanas. Estos linajes se establecen sobre la

base de grupos de secuencias de ADNmt individuales (o haplotipos) relacionadas, conocidos como *haplogrupos*.

Se ha propuesto que el árbol del ADNmt humano tendría su raíz en África, según el modelo arriba expuesto, y sus ramas irradiarían hacia diferentes áreas geográficas específicas, hecho que se ha puesto en relación con las regiones climáticas (Cann *et al.* 1987; Johnson *et al.* 1983; Merriwether *et al.* 1991; Wallace *et al.* 1999). La construcción de este árbol se ve facilitada por la especial forma de herencia del ADNmt que permite la transmisión de mutaciones secuenciales a través de los linajes maternos. Siguiendo este modelo, mutaciones compartidas por diferentes ADNs mitocondriales deberían derivar de un ancestro femenino común, y aquellas que están confinadas a haplotipos únicos corresponderían a nuevas mutaciones.

### 6.1. El modelo de las migraciones humanas a partir del estudio del ADNmt

Partiendo de los modelos ya expuestos, se hipotetiza que la historia de la migración humana tendría su origen en África, continente en el que el *Homo sapiens* pudo surgir hace unos 150.000-200.000 años con el primer haplogrupo africano específico, L0 (Kivisild *et al.* 2004; Mishmar *et al.* 2003), que seguidamente daría lugar a la aparición de los linajes L1, L2 y L3.

En el nordeste de África, L3 habría generado dos nuevos linajes, M y N, los cuales marcarían la salida del hombre moderno fuera de África, y por tanto, constituirían los antecesores de todos los linajes de ADNmt de Europa, Asia, América y Oceanía. Se estima que estos linajes pudieron haber colonizado Eurasia hace unos 65.000 años, mientras que en Europa, N daría lugar a los haplogrupos H, I, J, Uk, T, U, V, W y X. En Asia, M y N originarían un diverso rango de haplogrupos. Finalmente, a partir de N surgirían A, B, F, C, D, y el haplogrupo G a partir de M (Achilli *et al.* 2008; Chandrasekar *et al.* 2009; Richards *et al.* 2000; Wallace 2005; Wallace *et al.* 1999).

### 6.2. El poblamiento de las Américas

Uno de los sucesos sobre la colonización humana más polemizados ha sido el del poblamiento de las Américas. A modo de resumen podríamos decir que el origen de los primitivos grupos humanos que colonizaron el Nuevo Mundo ha sido objeto de un gran número de investigaciones y estudios arqueológicos, lingüísticos y genéticos. Las conclusiones de estos estudios no siempre han sido coincidentes, y el limitado acuerdo radica en su origen, a partir de una migración desde Asia a través del estrecho de Bering ( $\geq 12.000$  años) (Cavalli-Sforza 1994; Hoffecker *et al.* 1993). También existe consenso en que los haplogrupos de ADNmt predominantes en las poblaciones

fundadoras serían A, B, C, D y X (Goebel *et al.* 2008; Torroni *et al.* 1992) (Figura 4).

Por otro lado, existe una extensa discusión acerca del tiempo y el número de migraciones que colonizaron las Américas, así como acerca del tamaño de estas poblaciones ancestrales.

Desde la perspectiva de la Arqueología, existen dos hipótesis principales sobre la data del poblamiento americano. La primera sugiere una entrada tardía basándose en los yacimientos de la cultura Clovis encontrados, principalmente, en Nuevo México (EEUU) y datados entre 12.700 y 13.200 años (Fagundes *et al.* 2008; Waters y Stafford 2007). Estos yacimientos fueron atribuidos a las primeras poblaciones que colonizaron el continente después de una migración durante la última edad de hielo a través de un corredor libre de hielo (*ice-free corridor*). La segunda hipótesis apoya un poblamiento más temprano (Fagundes *et al.* 2008) a raíz de los descubrimientos de Monte Verde (Chile) (Dillehay 1997) y otros yacimientos de Sudamérica (O'Rourke y Raff 2010).

En 1986, el lingüista Joseph Greenberg, el antropólogo dental Christy Turner II y el genetista Stephen Zegura propusieron una hipótesis sobre el poblamiento de las Américas (Greenberg 1986). Su propuesta se basa en un modelo de tres olas migratorias, que se corresponden con los tres grupos lingüísticos establecidos por Greenberg (1987). De acuerdo con este modelo, la primera migración daría lugar a los llamados Paleo-indios (los actuales amerindios) y dos migraciones posteriores originarían los Na-Dene y Eskimo-aleutianos. Aunque la mayoría de lingüistas que estudian las lenguas nativo americanas rechazan su hipótesis (Bolnick *et al.* 2004), muchos genetistas la han acogido satisfactoriamente (Torroni *et al.* 1993; Torroni *et al.* 1992; Wallace 1995).

Torroni *et al.* (1993) y Wallace *et al.* (1995) propusieron un escenario de tres olas migratorias basándose principalmente en resultados obtenidos mediante el análisis de RFLPs sobre el genoma mitocondrial. Según estos datos los amerindios pudieron haber surgido de dos primeras migraciones. La primera, presentando los haplogrupos A, C, y D, atravesaría el estrecho de Bering desde el nordeste de Siberia hace unos 20.000-30.000 años, fundando los Paleo-indios (Wallace 2005). Una oleada posterior (hace unos 12.000-15.000 años) conteniendo el haplogrupo B, entraría en las Américas posiblemente a través de otra ruta (Mishmar *et al.* 2003; Torroni *et al.* 1993). Más tardíamente, hace unos 7.000-9.000 años, una migración con un haplogrupo A modificado migraría desde el nordeste de Siberia al noroeste de Norte América para fundar la población Na-Dene (Torroni *et al.* 1993; Wallace 1995). Y finalmente,

derivados de los haplogrupos A y D podrían haber viajado a través del Círculo Ártico para fundar la población esquimal (Wallace *et al.* 1999).

Por el contrario, diversos autores defienden la presencia de una colonización americana a través de una única ola migratoria (Bonatto y Salzano 1997; Forster *et al.* 1996; Kolman *et al.* 1995; Merriwether *et al.* 1995). Así, Bonatto y Salzano (1997) mediante análisis de la región HVSI del ADNmt, plantearon que la población originaria de los Nativos Americanos se estableció y diversificó en Bering, antes de una posterior colonización del resto del continente. Esta hipótesis llamada "out of Bering", se fundamenta en trabajos anteriores de Szathmary (1993). Se basa en que cuando se cerró el corredor libre de hielo, la región de Bering y las zonas al sur de los glaciares, ya colonizadas, permanecerían aisladas durante un tiempo, separando dos poblaciones que actualmente se corresponderían con los Amerindios, al sur, y los Na-Dene y Eskimo-aleutianos, en Bering. Este aislamiento estaría en concordancia con la cercana afinidad entre Na-Dene y Eskimo-aleutianos por un lado, y con la relación más lejana de estos grupos con los Amerindios (Dugoujon *et al.* 1995). De igual forma, también explicaría que los grupos Na-Dene y Eskimo-aleutianos tengan una diversidad de ADNmt menor que los Amerindios. El deterioro del clima y la reducida área habitable podría haber llevado a la pérdida de diversidad de secuencia de ADNmt según estos autores.

El escenario de dos olas migratorias para el poblamiento de las Américas también ha sido propuesto. Schurr y Sherry (2004) propusieron una primera migración por la costa Pacífica, que incluía los haplogrupos A, B, C, y D, desde Siberia hacia Sudamérica hace alrededor de 20.000-15.000 años. Seguidamente, se produciría una segunda migración en Norteamérica, conteniendo el haplogrupo X, una vez apareció el corredor libre de hielo. El haplogrupo X presenta una distribución muy particular ya que se encuentra en bajas frecuencias tanto en el oeste de Eurasia (Richards *et al.* 2000) como en algunos grupos de nativo americanos del norte (Brown *et al.* 1998; Forster *et al.* 1996; Malhi y Smith 2002; Ward *et al.* 1991). Sin embargo, sorprendentemente, está ausente en poblaciones del norte de Siberia y del este asiático (Brown *et al.* 1998; Schurr *et al.* 1999), las cuales son genética y geográficamente cercanas a los nativo americanos. La reciente mezcla genética europea no podría explicar la presencia del haplogrupo X en los amerindios, ya que si esta se debiera a flujo genético femenino europeo, entonces deberían estar presentes también otros haplogrupos europeos comunes entre los amerindios del norte. Además, la presencia relativamente antigua de este haplogrupo en los nativo americanos es confirmada mediante el análisis de restos humanos antiguos (Malhi y Smith 2002; Stone y Stoneking 1999). Por lo tanto, el haplogrupo X representaría un quinto haplogrupo fundador de los nativo americanos (Brown *et al.* 1998). Este

modelo propuesto por Schurr y Sherry (2004) sería congruente con el modelo reciente de una migración dual descrito por Perego *et al.* (2009) basado en la distribución geográfica de dos linajes de ADNmt (D4h3 y X2a). D4h3 presenta una distribución única a través de la costa Pacífica del norte y sur de América, mientras que X2a está restringido al noreste de Norteamérica. Perego *et al.* interpretaron esta distribución como una ola migratoria por la costa y otra, separada pero contemporánea, hacia el interior de Norteamérica a través del corredor libre de hielo.

### 6.3. El ADNmt y la adaptación del ser humano a climas cambiantes

Volviendo al modelo ya referido de distribución filogeográfica general, que parece haber ganado crédito en la comunidad científica internacional, y con respecto al ADNmt, se aprecian dos llamativas discontinuidades en cuanto a su variación (Wallace 2005). La primera, entre el África subsahariana y Eurasia, dado que toda la diversidad del ADNmt del África subsahariana permaneció en África y solo derivados de los linajes M y N parecen haber colonizado Eurasia. Y la segunda, entre el centro de Asia y Siberia, donde la gran variedad del ADNmt se redujo a tres linajes (A, C y D).

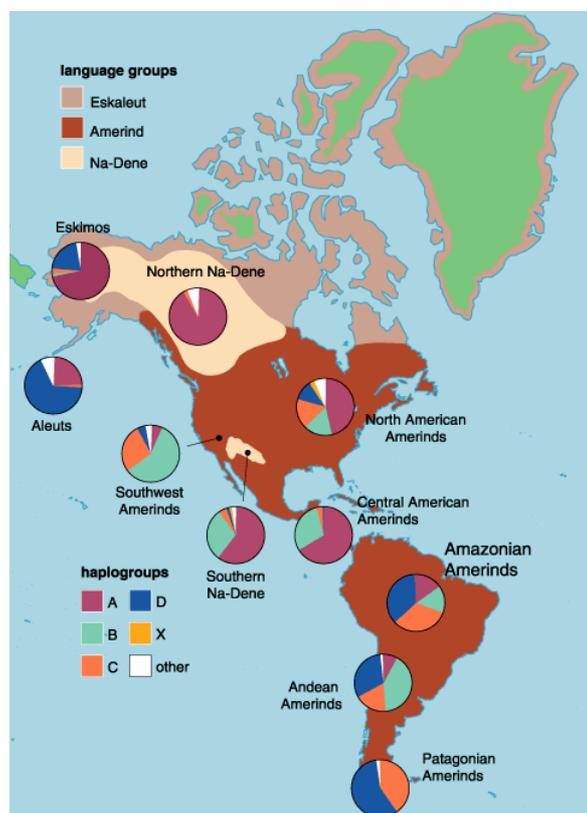


Figura 4. Distribución de los haplogrupos de ADNmt y de los grupos lingüísticos en América. Tomado de Schurr (2000).

Ya que estas discontinuidades corresponden a transiciones desde climas tropicales y subtropicales a climas más templados y al ártico, se ha propuesto que este hecho ha sido el resultado de una selección climática de mutaciones específicas en el ADNmt que permitirían la supervivencia de determinados linajes en latitudes más frías.

Para entender este fenómeno, primero hemos de comprender el papel de la mitocondria en la producción de adenosin trifosfato (ATP) y calor. La eficacia en la conversión de las calorías dietéticas en ATP viene determinada por la eficacia de acoplamiento del complejo de fosforilación oxidativa de la mitocondria. Si la cadena transportadora de electrones de la membrana interna de la mitocondria es altamente eficiente a la hora de bombear protones fuera de ésta y utilizarlos para la síntesis de ATP, entonces la mitocondria generará el máximo de ATP y un mínimo de calor por caloría consumida. En este estado se dice que la mitocondria, está fuertemente acoplada, y el rendimiento y la economía son máximos. Por el contrario, si la eficacia de estos procesos se reduce, cada caloría quemada producirá menos ATP pero más calor, estando la mitocondria pobremente acoplada. En consecuencia, mutaciones en el ADNmt que puedan desacoplar parcialmente el complejo OXPHOS, resultarían en una producción de calor incrementada, convirtiéndose en una estrategia adaptativa al cambio climático.

El hecho de que estas mutaciones adaptativas pudieran haber sido importantes para la migración humana fue confirmado mediante el análisis del ratio de mutaciones no sinónimas (las que producen cambios de aminoácidos) y sinónimas en las tres principales zonas climáticas (Wallace 2005). En este sentido se ha comprobado que conforme ascendemos de latitud hasta aquellas más septentrionales, mayor es la cantidad de mutaciones no sinónimas que el ADNmt acumula (Mishmar *et al.* 2003).

#### 6.4. Complejidad del análisis del ADNmt

Considerando la naturaleza de la molécula de ADNmt y sus variantes a lo largo de la evolución de cada linaje, se ha demostrado que es posible encajar cada variante de ADNmt en una parte específica de un árbol filogenético. En unas condiciones perfectas, cada variante sería única y solo podría encajar en un sitio determinado. Sin embargo, la elevada tasa de mutación del ADNmt no favorece estas condiciones. Cuando una mutación afecta repetidamente a un mismo sitio se produce un fenómeno conocido como homoplasia. Dos individuos pueden compartir la misma variante nucleotídica en un sitio determinado sin que esto se deba a una ascendencia común. Este fenómeno se expresa generando numerosas

reticulaciones en las redes filogenéticas, las cuales describen un gran número de rutas alternativas que podrían conectar a los haplogrupos (Salas *et al.* 2007). Sin embargo, estas posiciones normalmente vienen asociadas a mutaciones mucho más informativas en la región codificante, que ayudan a esclarecer el problema. Diversos autores demostraban que las posiciones determinantes de cada haplogrupo en la región control están directamente relacionadas con mutaciones puntuales en la región codificante (Chen *et al.* 1995; Torroni *et al.* 1994). En consecuencia, el estudio de ambas regiones, la región control y la región codificante, se postula como necesario, cuando se pretende definir la filogenia del ADNmt con elevada precisión (Salas *et al.* 2007).

El análisis de la secuencia del ADNmt desde un punto de vista filogenético reviste gran complejidad debido a la elevada información que se obtiene, pudiendo incluso aumentar los errores en el análisis. En estudios poblacionales, el impacto de estos errores es elevado ya que puede conducir a interpretaciones falaces concernientes a la evolución del ADNmt. En este sentido Bandelt *et al.* (2001) proporcionaron el primer análisis extendido de estos problemas y clasificaron los errores en las bases de datos de ADNmt en 5 categorías, proponiendo a su vez, diversas recomendaciones para detectar los mismos y evitarlos.

En los últimos años, el número de secuencias completas de ADNmt estudiadas mediante secuenciación, en poblaciones humanas ha aumentado considerablemente. Sin embargo, la secuenciación se presenta muy laboriosa, costosa económicamente y requiere una elevada cantidad de ADN. Por ello se han desarrollado recientemente nuevas metodologías aplicadas al análisis de SNPs como MALDI-TOF (Li *et al.* 1999), *Pyrosequencing* (Ahmadian *et al.* 2000; Andreasson *et al.* 2002), sondas *Taqman* (Livak 1999) y *Molecular Beacons* (Giesendorf *et al.* 1998). Sin embargo, la mayoría siguen siendo muy costosas y no están al alcance de todos los laboratorios, así que se han propuesto estrategias más simples como alternativa, como por ejemplo la minisequenciación o *SNaPshot* (Tully *et al.* 1996). La técnica de *SNaPshot* tiene muchas ventajas y es de gran utilidad ya que aporta mucha información utilizando relativamente poca cantidad de muestra. Este último aspecto junto con el hecho de que los fragmentos resultantes en esta técnica son de menor tamaño que los usados para secuenciar la región control, hace que sea muy adecuada cuando se trabaja con ADN escaso o fragmentado. Por lo tanto, podría tener un papel fundamental en genética forense en estudios de restos óseos antiguos o en cualquier tipo de muestra degradada.

### 7. ADNmt y genética forense

Varias son las características del ADNmt que lo hacen interesante en genética forense, principalmente (Budowle *et al.* 2003a):

a) La *elevada tasa de mutación* hace que el ADNmt sea muy polimórfico, característica fundamental para fines identificativos.

b) El ADNmt se *hereda por vía materna*, por lo que, salvo que se produzcan mutaciones, las secuencias de todos los parientes relacionados por vía materna serán idénticas.

c) El *elevado número de copias* de moléculas de ADNmt por célula, hace que el tipado de ADNmt resulte particularmente ventajoso, comparado con el ADN nuclear, en algunos casos.

En genética forense, el estudio del ADNmt se basa principalmente en la secuenciación de la región control del ADNmt obtenido de la muestra dubitada y de la indubitada o de referencia. Una vez obtenidos los resultados se debe realizar la interpretación a partir de la comparación de ambas secuencias, para lo cual existen una serie de recomendaciones (Bar *et al.* 2000):

- a) *Exclusión*: si las secuencias son inequívocamente diferentes, entonces se puede excluir que las muestras pertenezcan a un mismo origen.
- b) *Inclusión*: si las secuencias son idénticas, entonces no se puede excluir que la muestra de referencia y la dubitada presenten el mismo origen. En estos casos, si existe una heteroplasma en ambas secuencias, su presencia podría incrementar el valor de la evidencia. Por el contrario, si únicamente esta presente en una de las muestras, no se podría excluir que las secuencias pertenezcan a un linaje materno común.
- c) *Resultado inconcluso*: si las dos secuencias difieren en un único nucleótido y no existe heteroplasma.

A la hora de realizar la interpretación se debe tener en cuenta el origen del tejido investigado. Se ha observado que podría ser más probable que existan diferencias en las secuencias de ADNmt debido a mutaciones entre, por ejemplo, el pelo y la sangre que entre dos muestras de sangre obtenidas del mismo individuo (Bar *et al.* 2000).

El ADNmt también presenta una serie de desventajas importantes a tener en cuenta, como el hecho de que su análisis es un proceso laborioso y de larga duración. Pero la principal limitación del ADNmt en genética forense es la dificultad de diferenciar entre individuos que compartan haplotipos de HVSI/II comunes, por lo que su poder de discriminación es muy limitado (Just *et al.* 2004; Parsons y Coble 2001).

### 7.1. Criminalística

En los inicios de los 90, los genetistas forenses se dieron cuenta de la importancia del análisis de ADNmt para propósitos identificativos. La utilización del ADNmt para casos judiciales forenses es, por tanto, bastante reciente. El primer caso en el que los resultados del análisis de ADNmt fueron llevados a los tribunales en EEUU fue en junio del 1996 a raíz de un caso de violación y asesinato (caso P.W Ware, FBI). El mismo año, se realizó el primer análisis de ADNmt que se llevó a los tribunales en España (Martinez-Jarreta 1999).

En genética forense, el análisis de STRs autosómicos suele ser la primera opción ya que son unos marcadores muy discriminativos. Sin embargo, normalmente en las investigaciones criminales las evidencias que se recogen no están en condiciones óptimas de preservación o son evidencias mínimas y complejas como colillas, pelos, restos mínimos de saliva, heces, huesos o dientes (Allen *et al.* 1998; Ginther *et al.* 1992; Holland *et al.* 1993; Hopwood *et al.* 1996). En estos casos, y con las técnicas disponibles actualmente, es difícil obtener un perfil de marcadores autosómicos de ADN nuclear, y el ADNmt puede ser la alternativa.

### 7.2. Identificación de cadáveres en desastres en masa

Un desastre en masa es un evento inesperado (por causas naturales, accidentales o intencionadas) que causa un serio daño e incluso la muerte a un número de personas, normalmente elevado (Alonso *et al.* 2005). La identificación forense de las víctimas en estos casos es esencial, tanto por razones humanitarias, civiles como criminales.

Existen numerosos ejemplos de desastres en masa en los que el estudio del ADN ha jugado un papel fundamental, como el ataque al *World Trade Center* del 11 de Septiembre de 2001 (Brenner y Weir 2003; Budimilija *et al.* 2003; Holland *et al.* 2003), el ataque terrorista de Madrid del 11 de Marzo de 2004 (Alonso *et al.* 2005; Phillips *et al.* 2009), y el Tsunami ocurrido en el sureste asiático de 2004 (Ladika 2005). En estas situaciones, los restos humanos

encontrados suelen estar en condiciones muy severas, en función de la naturaleza del desastre. Por ello, el estudio del ADN es todo un reto y se hace necesario establecer nuevas técnicas y protocolos que permitan la obtención de ADN en este tipo de muestras. Así mismo, el análisis del ADNmt cobra importancia en estos casos ya que a veces es la única vía por la que se obtienen resultados. Además, la herencia materna del ADNmt puede jugar aquí un papel importante, ya que el análisis de familiares relacionados por vía materna pueden proporcionar muestras de referencia para la comparación directa con el ADNmt de los restos humanos cuestionados (Ginther *et al.* 1992).

### 7.3. Identificación de restos humanos antiguos

Una importante aplicación de los polimorfismos del ADNmt es la identificación de restos humanos (Gill *et al.* 1994; Goodwin *et al.* 1999; Holland *et al.* 1993), para los que hasta hace poco sólo se recurría a la antropología física y la odontología forense.

A pesar de los avances en las técnicas de análisis de muestras con escaso contenido en ADN o *Low Copy Number* (Budowle *et al.* 2009a) y ADN degradado, como el desarrollo de miniSTRs (Butler *et al.* 2003), a veces la última alternativa es recurrir al ADNmt para la obtención de resultados (Parson y Bandelt 2007). Sin embargo, el análisis de ADN de este tipo de muestras no deja de ser una tarea difícil, sobretodo si no han sido debidamente conservadas. Además, pueden presentar un elevado número de sustancias inhibitoras de la PCR (Scholz *et al.* 1998; Sutlovic *et al.* 2005; Wilson 1997) y están sometidas a un alto riesgo de contaminación por ADN exógeno (Gilbert *et al.* 2005; Sosa y Martínez-Jarreta 2010). Esto último es especialmente crítico cuando se pretende estudiar el ADNmt ya que al encontrarse en mayor número de copias por célula, las posibilidades de contaminación con fuentes exógenas se incrementan.

Por todo ello, se ha de llevar un control exhaustivo y estricto en el laboratorio. Se deben seguir los procedimientos y protocolos adecuados, y mantener un ambiente lo más estéril posible, en cada uno de los pasos del análisis. En el año 2000, la Comisión de ADN de la Sociedad Internacional de Genética Forense (ISFG) actualizó las pautas a seguir para el análisis de ADNmt (Bar *et al.* 2000).

A pesar de la complejidad de estos estudios existen numerosos ejemplos en la literatura (Bogdanowicz *et al.* 2009; Boles *et al.* 1995; Crubezy *et al.* 2010; Dissing *et al.* 2007; Green *et al.* 2008; Holland *et al.* 1993; Nunez *et al.* 2011; Rasmussen *et al.* 2010; Stone *et al.* 2001). Uno de los estudios de linaje en

restos humanos más conocidos utilizando el ADNmt es el que permitió la identificación de los restos óseos pertenecientes al último zar de Rusia, Nicolás II, y su familia (Gill *et al.* 1994; Ivanov *et al.* 1996).

## 8. La interpretación de los perfiles de ADNmt. Bases de datos poblacionales

Cuando los perfiles de ADNmt procedentes de una evidencia y de una muestra de referencia no pueden ser excluidos de pertenecer al mismo individuo o línea materna, se debe realizar un cálculo estadístico que determine el valor de esta coincidencia.

Este análisis estadístico se realiza a través del método de conteo (Bar *et al.* 2000; Holland 1999). Este método consiste en contar el número de veces que una secuencia o haplotipo es observado en una base de datos poblacional determinada, para obtener de esta forma la frecuencia haplotípica, y posteriormente aplicar una corrección para posibles errores de muestreo (Balding y Nichols 1994; Holland 1999). Finalmente, al igual que sucede con otras evidencias de ADN, el resultado se comunicará usando la razón de verosimilitud (*likelihood ratio*, LR) (Bar *et al.* 2000).

Como se ha comentado anteriormente, las bases de datos poblacionales en genética forense son muy valiosas ya que permiten interpretar y dar un valor estadístico a la prueba del ADN. Para su generación son fundamentales los estudios poblacionales de marcadores genéticos, los cuales a pesar de haber evidenciado un importante incremento en los últimos años, para algunas poblaciones son aún escasos.

Por otro lado, el creciente número de secuencias de ADNmt poblacionales que se han ido incorporando a la literatura y a las bases de datos, ha permitido mejorar nuestro conocimiento sobre la filogenia mundial del ADNmt, pero dicha cantidad de información también ha supuesto una serie de dificultades para los laboratorios a la hora de su manejo. La interpretación de las secuencias de ADNmt puede ser compleja, y tanto las etapas de secuenciación como de documentación de los datos obtenidos pueden ser importantes fuentes de errores (Bandelt *et al.* 2001; Bandelt *et al.* 2002; Carracedo *et al.* 1998; Parson *et al.* 2004).

En cuanto a las bases de datos de ADNmt, actualmente la más conocida y extensa es la base de datos poblacional de ADN mitocondrial del *European DNA Profiling Group* (EMPOP) (Parson y Dur 2007). Esta base de datos contiene hasta el momento 12785 haplotipos de poblaciones de todo el mundo, las cuales han superado una serie de estrictos requisitos de calidad para poder ser incorporadas a la base de datos.

## EL CROMOSOMA Y

### 1. Características generales

El cromosoma Y humano es un cromosoma acrocéntrico que representa alrededor del 2% del total del genoma humano y tiene un tamaño aproximado de unas 60 Mb. En él podemos distinguir dos regiones, la heterocromatina y la eucromatina (Figura 5). La región de heterocromatina se sitúa en la parte distal del brazo largo, siendo una región de longitud variable entre individuos y presenta una alta complejidad. En ella predominan secuencias altamente repetitivas (Skaletsky *et al.* 2003). La región de eucromatina se sitúa ocupando el brazo corto y parte del largo, y presenta un tamaño constante. Contiene las regiones que representan mayor interés desde el punto de vista genético ya que es donde se encuentran genes y polimorfismos.

El cromosoma Y contiene 78 genes (Skaletsky *et al.* 2003), entre los cuales destaca el gen SRY (Región determinante del sexo del cromosoma Y) que codifica una proteína que induce el desarrollo de los testículos y a través de una amplia red hormonal provoca el carácter masculino del feto en desarrollo (Sinclair *et al.* 1990).

A excepción de dos regiones, PAR 1 y PAR 2 (PAR: región pseudoautosómica), localizadas en los extremos, el cromosoma Y no padece recombinación durante la meiosis (Jobling y Tyler-Smith 2003). Además, es específico del género masculino y haploide, características que en su conjunto hacen que el cromosoma Y sea extraordinariamente valioso en genética forense, genética de poblaciones y genética médica. La región no recombinante del cromosoma Y (NRY) comprende aproximadamente el 95% del cromosoma. Dicha región ha sido rebautizada como región específica masculina (MSY) debido a que esta región puede tener cierta capacidad de recombinación con ella misma (Skaletsky *et al.* 2003).

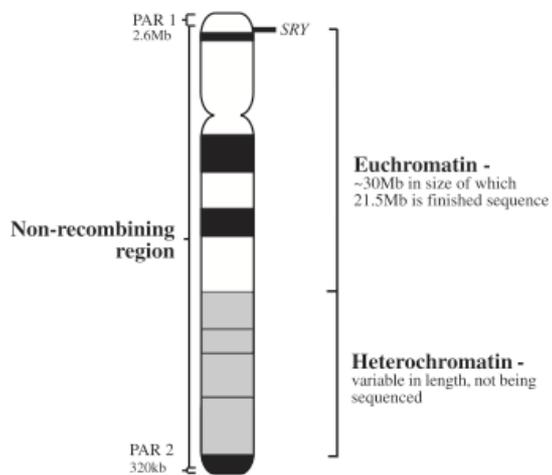


Figura 5. Idiograma del cromosoma Y. Se muestra la localización de las regiones PAR, el gen SRY y las regiones de eucromatina y heterocromatina. Tomada de Hurler y Jobling (2001).

## 2. Polimorfismos del cromosoma Y

El cromosoma Y contiene un gran número de polimorfismos incluyendo mini y microsatélites (VNTRs y STRs) y marcadores bialélicos (inserciones, deleciones y SNPs). En los inicios de los años 90, el número de loci STRs del cromosoma Y (Y-STR) descritos no superaban los 15 (Jobling y Tyler-Smith 1995; Mathias *et al.* 1994; Roewer *et al.* 1992), y solo se conocía un minisatélite específico de cromosoma Y (Jobling 1994). También se conocían 10 SNPs del cromosoma Y (Hammer 1995; Jobling 1994; Nakahori *et al.* 1989; Seielstad *et al.* 1994; Whitfield *et al.* 1995), y únicamente se había descubierto una inserción Alu (Y chromosome Alu polymorphism, YAP) (Hammer 1994). Sin embargo, este escenario ha ido cambiando desde entonces, y recientemente se han introducido un elevado número de SNPs (Underhill *et al.* 1997; Underhill *et al.* 2000) y STRs del cromosoma Y (Ayub *et al.* 2000; Kayser *et al.* 2004; White *et al.* 1999), altamente discriminativos (Butler *et al.* 2002; Gusmao *et al.* 1999; Krenke *et al.* 2005; Mulero *et al.* 2006), los cuales son de gran utilidad para las investigaciones forenses y la reconstrucción de la historia de las poblaciones humanas.

### 2.1. Microsatélites del cromosoma Y (Y-STRs)

El primer Y-STR que se descubrió fue DYS19, en los inicios de los años 90, y se aplicó con éxito en un caso de asesinato, permitiendo la exclusión del sospechoso (Roewer y Epplen 1992).

En 1997 el *Forensic Y-Chromosome Research Group*, coordinado por Lutz Roewer, hizo una primera aproximación hacia la aplicación forense de los haplotipos de Y-STRs (conjunto de alelos de Y-STR característicos de cada individuo), mediante la caracterización de 13 Y-STRs en 48 muestras poblacionales (Kayser *et al.* 1997). Por entonces, estos 13 Y-STRs eran los que estaban disponibles para aplicaciones forenses. De estos, 9 describen el llamado "haplotipo mínimo" (DYS19, DYS385a/b, DYS389I/II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393) recomendado por el *International Forensic Y User Group*, como el mínimo set de marcadores de cromosoma Y para la individualización masculina (Kayser *et al.* 1997). Pero este set de marcadores Y-STR puede extenderse añadiendo los loci hipervariables DYS438, DYS439, DYS437, DYS448, DYS456, DYS458, DYS635 y YGATAH4, con el fin de incrementar el poder de discriminación (Ayub *et al.* 2000; Mulero *et al.* 2006; Redd *et al.* 2002).

El aumento en el interés por los loci Y-STR ha conducido a numerosos estudios poblacionales para establecer bases de datos de frecuencias alélicas. La

mayor base de datos es la "Y Chromosome Haplotype Reference Database, YHRD" que se estableció en el año 2000 para recopilar haplotipos de Y-STR ([www.yhrd.org](http://www.yhrd.org)), y actualmente contiene más de 91.000 haplotipos de poblaciones de todo el mundo.

Aunque los 9-11 Y-STRs más comúnmente utilizados proporcionan una elevada probabilidad de identificación de linaje masculino, los Y-STRs adicionales incrementan el poder de discriminación. Además, varios estudios poblacionales han revelado poblaciones con un alto número de haplotipos de 9-16 loci Y-STR idénticos como resultado de cuellos de botella sucedidos en la historia de las mismas (Hedman *et al.* 2004; Mohyuddin *et al.* 2001). En consecuencia, en los casos en que existe coincidencia de haplotipos, el tipado de Y-STRs adicionales puede ser muy valioso para aplicaciones forenses. De hecho, actualmente muchos de los nuevos Y-STRs descritos están siendo investigados con respecto a su potencial de discriminación, la diversidad genética poblacional, los ratios de mutación y su capacidad para análisis multiplex (Ballantyne *et al.* 2010).

Los microsatélites de la región NRY poseen un importante papel en genética forense, llegando a configurarse como los marcadores de elección, particularmente en casos de delitos sexuales o en pruebas de paternidad (Kayser *et al.* 1997). Esto es debido a que, por su alta tasa de mutación, son altamente polimórficos y por lo tanto, mucho más efectivos para la identificación individual de lo que lo son los SNPs (Kayser *et al.* 1997; Roewer *et al.* 1996). Por otro lado, se están utilizando cada vez más en investigaciones genealógicas (Jobling 2001a) y en estudios evolutivos como marcadores de linajes masculinos (Jobling y Tyler-Smith 2003; Stumpf y Goldstein 2001).

### 2.2. Marcadores bialélicos del cromosoma Y (indels y Y-SNPs)

Estos marcadores se originan mediante mutaciones puntuales en un locus determinado, de manera que se crean dos alelos, el normal y el mutado. Esta mutación puede ser la sustitución de un nucleótido por otro (SNPs) o la adición o pérdida de un segmento de ADN (inserciones/delecciones o indels). Sin embargo, la mayoría de los marcadores bialélicos del cromosoma Y son SNPs (Jobling y Tyler-Smith 2003).

Los Y-SNPs se consideran eventos únicos y son evolutivamente estables con tasas de mutación alrededor de  $2 \times 10^{-8}$  por base por generación (Nachman y Crowell 2000). Esta característica limitaría su aplicación en genética forense, de hecho se estima que serían necesarios entre 50 y 80 SNPs para alcanzar los mismos niveles de discriminación que los actuales métodos basados en STRs

(Gill *et al.* 2001; Krawczak 2001). Sin embargo, la ventaja de los SNPs para la rutina forense reside en que permiten el análisis de pequeños fragmentos de ADN obtenidos de muestras altamente degradadas (Dixon *et al.* 2005). Además, debido a su simple estructura molecular, se pueden analizar grandes sets de SNPs en reacciones multiplex, y su tecnología de análisis es fácilmente automatizable. Por otro lado, en el caso específico de los Y-SNPs, podrían permitir predecir el origen geográfico o étnico de una muestra forense desconocida (Budowle y van Daal 2008; Jobling 2001b).

Recientemente, la base de datos YHRD ha incluido Y-SNPs entre sus herramientas de búsqueda, lo cual permite determinar la frecuencia de los diferentes haplogrupos de cromosoma Y (determinados por los Y-SNPs) en las poblaciones incluidas en la base de datos.

### **3. Polimorfismos del cromosoma Y y genética forense**

El estudio forense de marcadores del cromosoma Y no se realiza de forma tan rutinaria como el de los marcadores autosómicos. Sin embargo, el hecho de que estos marcadores solo se encuentren en varones, les otorga un valor especial, y les hace una herramienta muy valiosa para determinadas aplicaciones forenses.

#### **3.1. La identificación de muestras procedentes de varones en criminalística**

El valor de los marcadores del cromosoma Y para la identificación masculina en genética forense es enfatizado por el hecho de que un elevado porcentaje de crímenes violentos y delitos sexuales son cometidos por varones (Jobling *et al.* 1997; Rand y Robinson 2011).

En casos de delitos sexuales, normalmente se obtienen evidencias que contienen una mezcla de material biológico masculino y femenino, las cuales siempre han sido un reto en el área de criminalística. Una posible solución para aislar el contenido masculino y obtener el perfil genético del sospechoso, es realizar una extracción diferencial de ADN (Gill *et al.* 1985). Sin embargo, ésta técnica no es siempre posible debido a las condiciones de la muestra y a la proporción de cada componente (femenino/masculino) (Honda *et al.* 1999; Prinz *et al.* 1997; Prinz y Sansone 2001). Adicionalmente, el proceso de obtención del ADN de la fracción masculina se complica aún más en muestras mezcla donde el componente masculino proviene de individuos vasectomizados o azoospermicos. En estas situaciones, el análisis de Y-STRs es una buena herramienta para resolver el perfil de la porción masculina involucrada (Honda *et al.* 1999; Prinz *et al.* 1997; Prinz y Sansone 2001).

Como se ha comentado previamente, existen dos clases principales de marcadores de la región NRY, los Y-STRs y los Y-SNPs. La combinación de los alelos de múltiples Y-STRs definen lo que conocemos como haplotipo, mientras que la combinación de alelos de múltiples Y-SNPs definen los haplogrupos de cromosoma Y (Figura 6) (de Knijff 2000).

La utilidad forense de los Y-STRs se debe principalmente a su alto grado de polimorfismo en las poblaciones humanas (Roewer *et al.* 1996), y a la posibilidad de desarrollar reacciones multiplex. Pero una limitación que presentan, tanto en las aplicaciones forenses como de paternidad, es la falta de independencia de estos marcadores debido a la ausencia de recombinación en NRY. Esto conlleva que no sea posible distinguir entre varones relacionados por vía paterna (como en el caso del ADNmt por vía materna), por lo que los haplotipos de Y-STRs presentan un menor poder de discriminación en comparación con los de STRs autosómicos.

Por otro lado, los marcadores del cromosoma Y puede ser de ayuda para obtener una primera aproximación al origen geográfico del individuo varón al que pertenece una evidencia, lo cual podría ayudar a los investigadores a dirigir la investigación hacia un grupo más acotado de sospechosos de una región geográfica específica. Determinados alelos o haplotipos de Y-STRs están restringidos a ciertas áreas geográficas o muestran elevada diferenciación de frecuencias entre las mismas (Kayser *et al.* 1997; Kayser *et al.* 2001; Roewer *et al.* 2005; Roewer *et al.* 1996). Sin embargo, aunque algunos haplotipos de Y-STRs son altamente informativos para identificar el origen geográfico, la relativa alta tasa de mutación de estos polimorfismos tiende a diluir las señales genéticas ancestrales a lo largo de un elevado número de generaciones. En consecuencia, se ha establecido que los Y-STRs son más informativos para detectar eventos más recientes del pasado en las historias genéticas de las poblaciones (Adams *et al.* 2008). Para investigar los sucesos más antiguos, los Y-SNPs son mucho más fiables ya que sus tasas de mutación son aproximadamente 100.000 veces menores que las de los Y-STRs (Thomson *et al.* 2000). La elevada especificidad geográfica de los haplogrupos de cromosoma Y, determinados mediante Y-SNPs (Hammer *et al.* 2001; Jobling y Tyler-Smith 1995), podría proporcionar a la comunidad forense evidencias sobre el origen del material genético masculino depositado en el escenario de un crimen (Jobling 2001b; Lessig *et al.* 2005).

Uno de los primeros estudios que describió la distribución geográfica restringida de un Y-SNP y su uso para la investigación de la historia de las poblaciones humanas tuvo lugar en 1997 (Zerjal *et al.* 1997). Hoy en día se conocen un gran número de marcadores Y-SNPs, y muchos muestran una distribución específica de continente. Se conocen algunos casos en donde

existe una alta correlación entre los Y-STRs y Y-SNPs (Kayser *et al.* 2005). A pesar de estos casos de correlación y de que el estudio independiente de los marcadores Y-STR o Y-SNP puede revelar la misma información geográfica, la combinación de ambos puede ser mucho más informativa y fiable (de Knijff 2000; de Knijff *et al.* 1997).

### 3.2. Investigación biológica de la paternidad

Dentro de la rutina forense, el tipado de Y-STRs también es útil en los casos de paternidades deficientes, especialmente cuando el supuesto padre no está disponible, así como en la identificación de personas desaparecidas mediante la identificación de las líneas paternas (Jobling *et al.* 1997).

El hecho de que el supuesto padre presente un haplotipo de cromosoma Y distinto al del hijo demostraría la no paternidad, con una probabilidad de exclusión (probabilidad de excluir al padre no biológico como padre biológico) mayor que la que se obtiene con los STRs autosómicos (Chakraborty 1985).

Los STRs del cromosoma Y encontrarían otra aplicación en las paternidades con ausencia de madre. La comunidad científica recomienda prestar especial atención en estos casos cuando se analizan únicamente STRs autosómicos porque se ha observado que podrían inducir a paternidades erróneas ya que varones no relacionados podrían presentar perfiles genéticos coincidentes con la paternidad a pesar de no ser los padres biológicos (Gonzalez-Andrade *et al.* 2009b; Poetsch *et al.* 2006). Para solventar esta dificultad y obtener un mayor nivel de confianza se hace necesario establecer un número adecuado y suficiente de STRs autosómicos, así como completar el análisis de paternidad con el tipado de STRs del cromosoma Y (Gonzalez-Andrade *et al.* 2009b; Poetsch *et al.* 2006).

Por otro lado, algo a tener en cuenta, en este sentido, es la ocurrencia de mutaciones. En algunos casos particulares, los haplotipos de padres e hijos difieren debido a mutaciones (Gunn *et al.* 1997; Kayser *et al.* 2000). El ratio de mutación de los loci Y-STR es similar al de los STRs autosómicos, aproximadamente  $2.8 \times 10^{-3}$  por locus por generación (Kayser *et al.* 2000). El cromosoma Y acumula mutaciones a medida que se hereda en la línea paterna y la comparación directa entre hombres del mismo linaje podría resultar en una falsa exclusión de la paternidad, si las mutaciones no son consideradas. Por lo tanto, es imprescindible que los cálculos realizados tengan en cuenta esta posibilidad (Rolf *et al.* 2001).

### 4. La interpretación de los perfiles de Y-STRs

Al igual que ocurre para el ADNmt, la interpretación de los perfiles de Y-STRs se realiza mediante el método de contaje, el cual resulta simple y conservativo (Budowle *et al.* 2005; Budowle *et al.* 2007; Budowle *et al.* 2003b). Varios estudios han demostrado que los efectos de la subestructura poblacional son más intensos para los haplotipos de Y-STRs en comparación con los loci autosómicos (Lessig *et al.* 2003). En consecuencia, podría ser necesario definir de una forma más restrictiva (geográficamente) las bases de datos poblacionales de referencia de lo que típicamente se realiza para los loci STR autosómicos (Budowle *et al.* 2005; Kayser *et al.* 2002). Por ejemplo, la mayoría de bases de datos de STRs autosómicos tienden a referirse al grupo Hispánicos como cualquier individuo de México, Puerto Rico, Cuba, Centro/Sudamérica o de otra ascendencia cultural Española (Chakraborty *et al.* 1999). Alternativamente, se ha propuesto agrupar bases de datos basadas en grupos poblacionales principales y aplicar correcciones para los efectos de subestructura (NRC 1996).

Diversos estudios han investigado estos efectos de la subestructura poblacional y han demostrado que para haplotipos que comprenden al menos 10-16 marcadores Y-STR, no resulta necesario aplicar correcciones cuando se estima la probabilidad de un haplotipo de Y-STRs con el método de contaje, ya que los efectos de la subestructura son mínimos (Budowle *et al.* 2009b; Ge *et al.* 2010). Sin embargo, esto puede resultar diferente cuando se trata de haplotipos parciales consistentes en un número menor de loci Y-STR (Budowle *et al.* 2009c) o para determinadas subpoblaciones (Davis *et al.* 2011).

### 5. Marcadores del cromosoma Y y genética de poblaciones

En paralelo al descubrimiento de nuevos polimorfismos del cromosoma Y a partir de los años 90, empezó a ganar interés su aplicación en estudios evolutivos (Hammer 1996).

En este campo los SNPs son particularmente útiles porque su baja tasa de mutaciones les hace ser apropiados para identificar linajes paternos estables que pueden ser trazados atrás en el tiempo cientos de años. Sin embargo, a medida que ha ido aumentando el conocimiento de estos polimorfismos binarios, también lo ha hecho el número de publicaciones y de sistemas usados para nombrar los diferentes haplogrupos determinados por estos marcadores. Estas múltiples nomenclaturas dificultaron la comparación de los resultados entre la comunidad científica, por lo que en un intento para resolver este problema, en el 2002 el Consorcio del Cromosoma Y (YCC)

introdujo una nomenclatura filogenética exclusiva para la variación de la región no recombinante del cromosoma Y (YCC 2002). En este estudio, se describió un árbol filogenético de los haplogrupos mostrando las relaciones de unos 200 Y-SNPs, además de proponer una correlación entre las diferentes nomenclaturas que existían para definir los haplogrupos.

De la misma forma que se han podido trazar las migraciones humanas ocurridas a lo largo de la historia mediante el estudio del genoma mitocondrial, ha sido posible establecer un patrón migratorio mediante el estudio del cromosoma Y, con muchas similitudes al patrón establecido para el ADNmt (Underhill y Kivisild 2007). A pesar de la incertidumbre existente acerca del tiempo del ancestro común más reciente (TMRCA) del cromosoma Y, no se han encontrado linajes de cromosoma Y más antiguos a 200.000 años (Jobling y Tyler-Smith 2003).

La filogenia del cromosoma Y presentaría su raíz en África, con las dos primeras ramas representando los haplogrupos A y B que se caracterizan por el alelo ancestral del marcador M168 (Figura 6) (Semino *et al.* 2002; Underhill *et al.* 2001). La distribución de estos dos linajes junto con otras evidencias mostraron que la diversidad del cromosoma Y habría surgido recientemente en África y habría reemplazado los linajes de cromosoma Y del resto del mundo (Jobling y Tyler-Smith 2003). Por lo tanto, la mutación M168 representaría la huella del hombre moderno que salió de África, siendo la raíz del resto de haplogrupos del cromosoma Y (Figura 6). Analizando la distribución geográfica de estos haplogrupos podemos imaginar algunas de las migraciones del ser humano tras la salida de África. Del linaje definido por M168 derivarían tres sublinajes determinados por los polimorfismos en los loci YAP (Hammer 1995), M89 y RPS4Y (Bergen *et al.* 1999; Underhill *et al.* 2000).

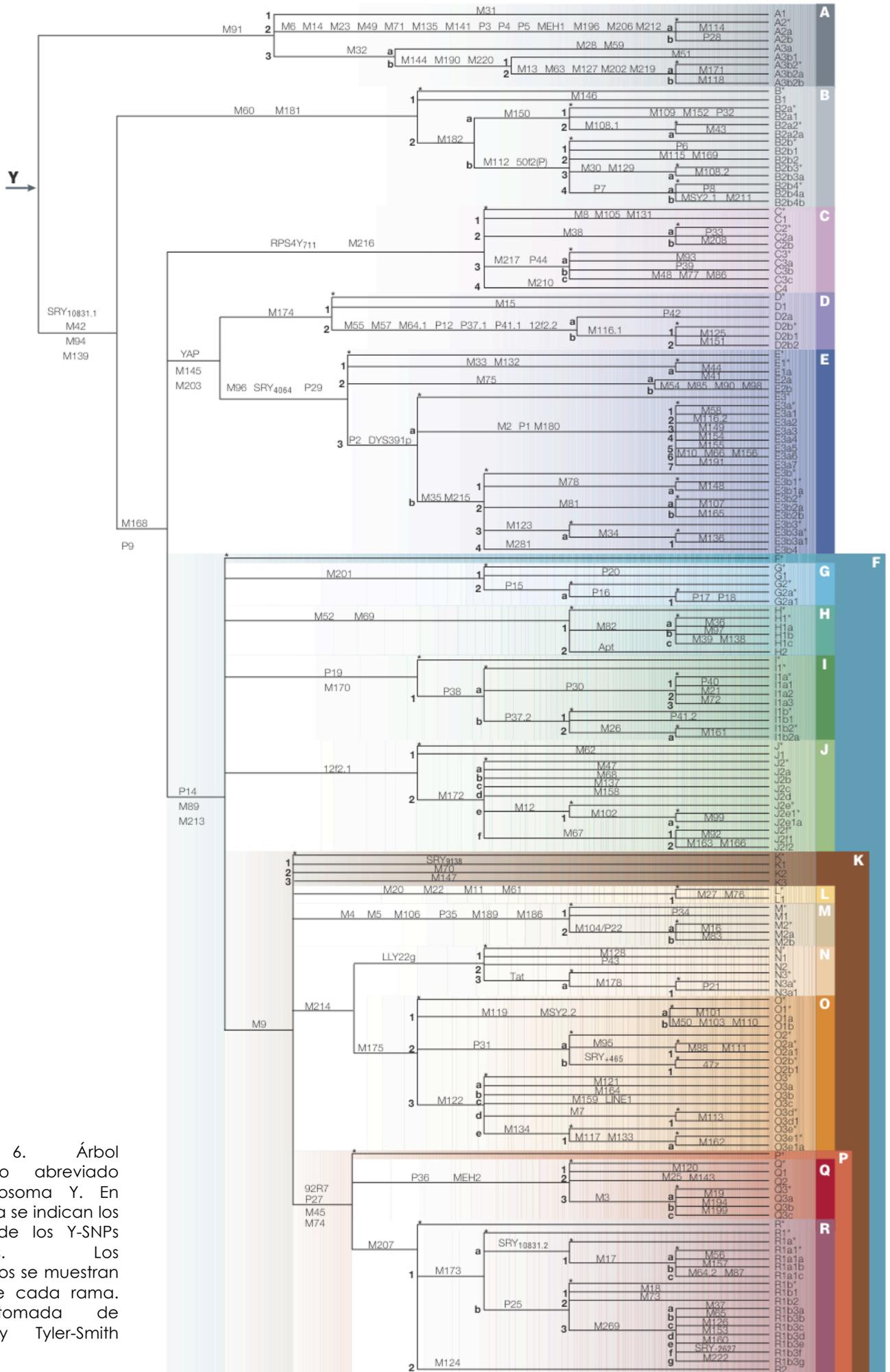


Figura 6. Árbol filogenético abreviado del cromosoma Y. En cada rama se indican los nombres de los Y-SNPs implicados. Los haplogrupos se muestran al final de cada rama. Figura tomada de Jobling y Tyler-Smith (2003).

La línea que adquiriría el marcador YAP se dividió en dos haplogrupos D y E. El haplogrupo D (M174) parece ser exclusivamente asiático, mayoritariamente confinado en Japón y Tíbet, donde presenta elevadas frecuencias (Hammer *et al.* 2006; Shi *et al.* 2008). Por otro lado, el haplogrupo E presenta altas frecuencias en África, y relativamente altas frecuencias en el Medio Oriente y sur de Europa (Figura 7) (Underhill *et al.* 2001). Este haplogrupo es una clara evidencia de un suceso más reciente de la historia de las poblaciones. En África, las huellas del Paleolítico en la diversidad del cromosoma Y son débiles debido a la reciente expansión del haplogrupo E probablemente desde el oeste de África (Beleza *et al.* 2005; Coelho *et al.* 2009; Underhill *et al.* 2001). Esto ha generado que los haplogrupos ancestrales A y B sean actualmente poco frecuentes, y que la mayoría de linajes de cromosoma Y pertenezcan al haplogrupo E (Gomes *et al.* 2010; Jobling y Tyler-Smith 2003).

En cuanto al linaje definido por RPS4Y/M216, representa el haplogrupo C el cual se encuentra en Asia, Oceanía y el norte de América (Figura 7) (Capelli *et al.* 2001; Karafet *et al.* 2001; Zegura *et al.* 2004). Se ha sugerido que una población africana con la mutación M168 migraría desde el “cuerno” de África por una vía costera o interior hacia el sur de Asia donde probablemente se originarían las mutaciones RPS4Y/M216 (Jobling y Tyler-Smith 2003; Walter *et al.* 2000). Esta oleada también alcanzaría a colonizar Nueva Guinea y Australia (Underhill *et al.* 2001). Más tarde un linaje RPS4Y/M216 adquiriría la mutación M217 (haplogrupo C3) (Figura 6) y se expandiría a través del centro y este de Asia, también alcanzando Japón y finalmente Norteamérica (Zegura *et al.* 2004).

Por último, la tercera línea (M89/M213) constituye los haplogrupos F-T (Figura 6). Se ha propuesto que una población con M89/M213 se dispersaría desde África hacia Medio Oriente, desde donde se expandiría hacia Europa, centro y sur de Asia hace unos 40,000 años (Underhill *et al.* 2001). Durante la migración a Asia Central se originaría M9, raíz de los haplogrupos K-T (Figura 6). A continuación, tendrían lugar una serie de eventos que caracterizan la historia genética del cromosoma Y de las poblaciones Euroasiáticas.

Inicialmente, tendría lugar la expansión y diferenciación del linaje PQR, derivado de M89/M213/M9 (Figura 6). Parte de esta población (haplogrupo R), viajaría hacia el oeste hace unos 30,000 años, alcanzando Europa, el Cáucaso, Medio Oriente, el centro de Asia y el norte de India-Paquistán (Myres *et al.* 2011; Semino *et al.* 2000; Underhill *et al.* 2001). Otro grupo de esta población inicial se diferenciaría adquiriendo diferentes mutaciones y formando el haplogrupo Q. Este linaje también se expandiría hacia el norte y centro de Asia y norte de India-Paquistán (Underhill *et al.* 2001). Más tarde,

este grupo adquiriría la mutación M3 y se propagaría desde Siberia hacia las Américas (Santos *et al.* 1999). Otra rama derivada de M9 caracterizada por M214/M175 (haplogrupo O) y que parece haberse originado en el norte de China (Su *et al.* 2000) se dirigiría hacia el noreste de Asia y Polinesia, alcanzando elevadas frecuencias especialmente en China (Deng *et al.* 2004), y desplazando gran parte de los linajes pre-existentes (C y D) (Underhill *et al.* 2001). Por otra parte, los linajes que derivaron de M89/M213, sin la mutación M9, representan los haplogrupos F-J, los cuales se dispersarían desde Levante hacia el área Mediterránea hace unos 20-25,000 años (Capelli *et al.* 2006; Semino *et al.* 2004; Semino *et al.* 2000).

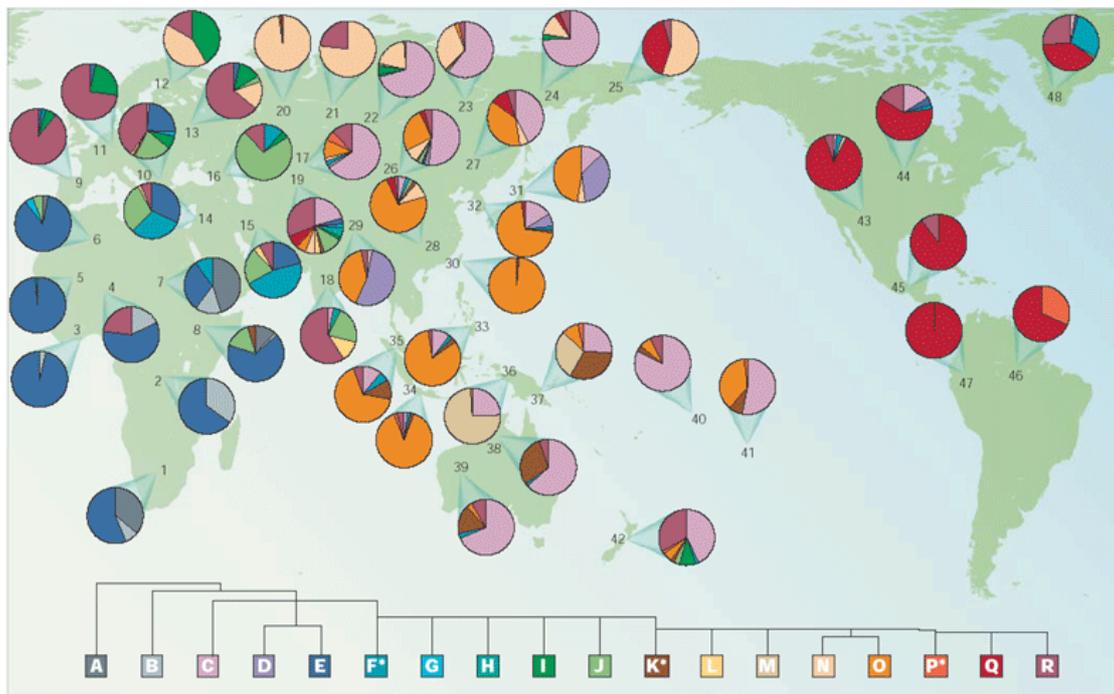


Figura 7. Distribución mundial actual de los haplogrupos de cromosoma Y. Imagen tomada de Jobling y Tyler-Smith (2003).

### 5.1. La colonización de las Américas según el cromosoma Y

Varios estudios son los que se han centrado en el cromosoma Y como fuente de información genética para el poblamiento de las Américas (Bergen *et al.* 1999; Bortolini *et al.* 2003; Karafet *et al.* 1997; Karafet *et al.* 2002; Lell *et al.* 1997; Lell *et al.* 2002; Seielstad *et al.* 2003; Underhill 2003; Zegura *et al.* 2004).

Los dos principales linajes fundadores que se han identificado son los haplogrupos C y Q. En general, el haplogrupo C está presente en un 5% de nativos americanos mientras que Q es el mayoritario, representando alrededor

del 76% de la población nativo americana (Zegura *et al.* 2004). Mientras que el haplogrupo Q, específicamente Q1a3a (M3), se encuentra distribuido en altas frecuencias en toda América, el haplogrupo C presenta una distribución mucho más restringida (Figura 7), principalmente al norte del continente, entre las poblaciones Na-Dene (Zegura *et al.* 2004) y con muy baja frecuencia, en miembros de la familia lingüística Aleut-esquimal (Bosch *et al.* 2003). Recientemente, Geppert *et al.* (2011) han observado la presencia del haplogrupo C3\* (M217) en un 6% de una muestra poblacional de individuos Waorani y Kichwa de Ecuador. Este haplogrupo también se observó en 2 individuos Wayuu en la frontera entre Venezuela y Colombia (Karafet *et al.* 1999; Zegura *et al.* 2004)

En comparación con Norte América, en donde el subhaplogrupo C3b (definido por P39) es el más frecuente, el haplogrupo C3\* es más antiguo. Estos resultados son sorprendentes, y abren la puerta a nuevas investigaciones, ya que teniendo en cuenta la hipótesis del poblamiento de Sudamérica a través de Norteamérica por poblaciones de origen asiático, sería de esperar encontrar en Sudamérica el mismo linaje C o derivados de los de Norteamérica (Geppert *et al.* 2011).

De todas formas, estos estudios indicarían que ambos haplogrupos fundadores están presentes en los tres grupos lingüísticos nativo americanos principales propuestos por Greenberg (1987), y subrayarían la posibilidad de que la deriva genética fuera la responsable de las diferencias de frecuencias del haplogrupo C. Una alternativa a que estos linajes representen múltiples eventos fundadores distintos (Bortolini *et al.* 2003; Karafet *et al.* 1999; Lell *et al.* 2002), podría ser que representaran un componente mayor y otro menor de los cromosomas Y de una única población fundadora (Bianchi *et al.* 1998; Santos *et al.* 1999; Tarazona-Santos y Santos 2002; Underhill *et al.* 1996).

## 5.2. La asimetría genética sexual en las migraciones humanas

Estudios sobre el análisis de poblaciones de todo el mundo indicarían que las poblaciones exhiben un alto grado de subestructura poblacional para el cromosoma Y (Poloni *et al.* 1997; Seielstad *et al.* 1998). Comparando con el relativo bajo grado de subestructura poblacional para el ADN mitocondrial, se ha sugerido que el flujo genético (o migración) entre la mayoría de las poblaciones humanas podría haber sido mediado generalmente por las mujeres (Seielstad *et al.* 1998). Es decir, las mujeres parecen haber tenido una tasa de migración mayor que los varones en la mayoría de las sociedades. Este hecho es principalmente debido a que aproximadamente el 70% de las sociedades modernas practican la patrilocalidad (Jobling y Tyler-Smith 2003;

Oota *et al.* 2001), es decir, cuando un hombre y una mujer de diferentes lugares contraen matrimonio, es la mujer la que migra al lugar de origen del varón. En consecuencia, las poblaciones resultan más similares entre ellas con respecto al ADN mitocondrial que con respecto al cromosoma Y (Seielstad 2000).

Existen varios estudios que han pretendido investigar las asimetrías sexuales en las tasas de migración humanas mediante el análisis de STRs autosómicos, ADNmt y cromosoma Y. Uno de ellos, realizado por Mesa *et al.* (2000), comprendió un estudio exhaustivo sobre cinco poblaciones nativas de Colombia. Los análisis de mezcla sugerirían un patrón de emparejamiento direccional que preferencialmente involucraba varones inmigrantes y mujeres nativas.

Un segundo ejemplo de estudio de este tipo, consistió en el análisis de la mezcla genética, mediante STRs autosómicos y de cromosoma Y, de mestizos, Kichwas, y afro-ecuatorianos de Ecuador (Gonzalez-Andrade *et al.* 2007). Las contribuciones al grupo de población mestiza en cuanto al cromosoma Y, fueron estimadas en un 70% europea, 28% amerindia, y 2% africana. Dichos resultados subrayan la asimetría sexual en el emparejamiento, con una contribución europea mayoritariamente masculina. Estos patrones característicos de asimetría sexual también se han observado en otros estudios de población mestiza de México (Green *et al.* 2000; Merriwether *et al.* 1997), Colombia (Carvajal-Carmona *et al.* 2000), entre otros.

Todas estas observaciones estarían de acuerdo con los registros históricos que muestran que durante el período colonial, la mayoría de los inmigrantes españoles en América fueron varones (Sánchez-Albornoz 1977). Además, esta asimetría se refuerza por el hecho de que existía una actitud social que aceptaba el matrimonio entre hombres europeos y mujeres nativo americanas, pero la situación opuesta involucrando hombres nativo americanos y mujeres europeas estaba perseguida (Rodríguez-Delfin *et al.* 2001).

## CROMOSOMA X

### 1. Características generales

El cromosoma X representa aproximadamente el 5% del ADN genómico humano (164 Mb). La secuencia de ADN del cromosoma X fue obtenida por primera vez en el año 2005 por Ross *et al.* (2005), los cuales identificaron 1.098 genes, que representan el 1,7% de la secuencia del cromosoma. A pesar de

esta reducida densidad génica, el cromosoma X está asociado a numerosas enfermedades genéticas.

El cromosoma X está presente por duplicado en las mujeres mientras que los varones solo tienen un cromosoma X. En el desarrollo embrionario temprano de las mujeres, uno de los cromosomas X, en las células somáticas, es inactivado de forma aleatoria y permanente. Este fenómeno conocido como inactivación del X o Lyonización (Lyon 1961) asegura que las mujeres, al igual que los varones, tengan solo una copia funcional del cromosoma X en cada célula del cuerpo. De este modo, algunos genes del cromosoma X escapan a la inactivación. Muchos de ellos están localizados en los extremos de cada brazo del cromosoma X, en las regiones PAR (Ross *et al.* 2005). Aunque numerosos genes son únicos del cromosoma X, los genes en estas regiones están presentes en ambos sexos. Como resultado, varones y mujeres tienen cada uno copias funcionales de estos genes, muchos de ellos esenciales para el desarrollo (Clement-Jones *et al.* 2000).

Existen numerosas enfermedades como la hemofilia, la distrofia muscular de *Duchenne*, el síndrome de *Lesch-Nyhan*, etc., que siguen una herencia dependiente del cromosoma X (Szibor 2007). Si un paciente varón es fértil transmitirá a todas sus hijas el cromosoma X defectuoso y estas a su vez lo transmitirán a la mitad de la siguiente generación. De esta forma, la mitad de todas las hijas serán portadoras del gen y la mitad de los hijos heredarán el alelo defectuoso y exhibirán las características de la enfermedad debido al estado hemigótico del cromosoma X.

Las características distintivas del cromosoma X derivan básicamente de su forma de herencia. Debido a que los varones tienen sólo una copia de cromosoma X, cada cromosoma X ha pasado dos tercios de su historia en las mujeres. Además, las mutaciones ocurren con menor frecuencia en el cromosoma X que en los autosomas porque la tasa de mutación nucleotídica en mujeres es mucho más baja que en los varones (Bohossian *et al.* 2000; Li *et al.* 2002). El resultado es una menor diversidad genética. La diversidad es adicionalmente reducida por el tamaño efectivo de la población del cromosoma X, la cual, debido a que los varones solo tienen una copia, es tres cuartos a la de los autosomas. Por lo tanto, la diversidad del cromosoma X debería ser menor a la de los autosomas, pero aún así, mayor a la del cromosoma Y.

Otra consecuencia del pequeño tamaño poblacional es que la deriva genética es más rápida para el cromosoma X que para los autosomas. Como resultado, la estructura poblacional debería ser más pronunciada, es decir

que, las poblaciones deberían diferir más en el cromosoma X que en los autosomas (Laan *et al.* 2005; Schaffner 2004).

Dado este contexto, parece lógico que el estudio del cromosoma X sea valioso en genética clínica pero recientemente también se ha probado su utilidad en genética forense, especialmente en la investigación de parentesco, y en genética de poblaciones.

## 2. Marcadores del cromosoma X

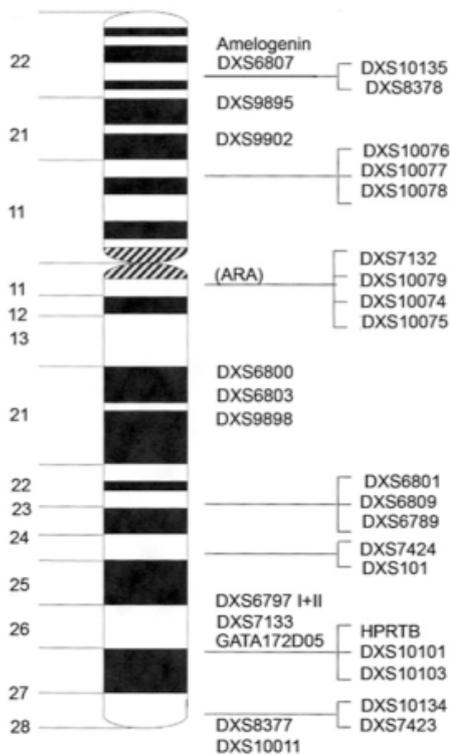


Figura 8. Principales X-STRs para usos forenses. Tomado de Szibor (2007).

A pesar de que la existencia de X-STRs como HPRTB (Hearne y Todd 1991), ARA (Desmarais *et al.* 1998) y DXS981 (Mahtani y Willard 1993) se demostró relativamente pronto, el uso de estos marcadores como una herramienta para aplicaciones específicas se ha desarrollado más tarde. La figura 8 muestra la mayoría de X-STRs para uso forense conocidos hasta la fecha.

Ya que el estudio de polimorfismos del cromosoma X para las aplicaciones en genética forense es un área aún joven, no existen muchos estudios genético poblacionales. En el 2005 se publicó la primera base de datos de STRs del cromosoma X online, la cual contiene mucha información en cuanto a marcadores

del cromosoma X usados para propósitos forenses y antropológico evolutivos (Szibor *et al.* 2006) ([www.chrx-str.org](http://www.chrx-str.org)).

En cuanto al análisis de X-STRs, el *Mentype® Argus X-UL PCR Amplification Kit* (Biotype, AG, Dresde, Alemania) fue el primer multiplex disponible, el cual amplifica 4 X-STRs (DXS7132, DXS7423, DXS8378 y HPRTB además de la amelogenina) cada uno de los cuales perteneciente a un grupo de ligamiento de los cuatro propuestos (Becker *et al.* 2008; Szibor *et al.* 2003). Más tarde apareció el nuevo *Mentype® Argus X-8 PCR Amplification Kit* (Biotype,

AG, Dresden, Alemania) el cual incrementó el número de loci X-STR a 8 (DXS7132, DXS7423, DXS8378, DXS10074, DXS10101, DXS10134, DXS10135, y HPRTB), 2 por grupo de ligamiento. Recientemente, la misma empresa ha sacado al mercado el *Investigator Argus X-12 PCR Amplification Kit* que incluye los 12 marcadores DXS7132, DXS7423, DXS8378, DXS10074, DXS10079, DXS10101, DXS10103, DXS10134, DXS10135, DXS10146, DXS10148 y HPRTB (3 por grupo de ligamiento).

En cuanto a kits comerciales, estos son los que únicamente están disponibles para el tipado de X-STRs. Sin embargo, en el 2009 tuvo lugar un trabajo colaborativo llevado a cabo por el GEP-ISFG, en donde se optimizó un multiplex para el tipado de 10 X-STR (DXS8378, DXS9902, DXS7132, DXS9898, DXS6809, DXS6789, DXS7133, GATA172D05, GATA31E08, y DXS7423) y que los laboratorios pueden optimizar manualmente (Gusmao *et al.* 2008; Gusmao *et al.* 2009).

Los SNPs del cromosoma X también son unos marcadores que se han empezado a utilizar, individualmente o en combinación con los X-STRs, tanto en genética forense como en genética de poblaciones (Li *et al.* 2010; Pereira *et al.* 2010; Tomas *et al.* 2008; Tomas *et al.* 2010; Zarrabeitia *et al.* 2007).

## 2.1. Ligamiento y desequilibrio de ligamiento

Los dos cromosomas X femeninos tienden a recombinar durante la meiosis. Este hecho requiere tener en cuenta dos características que pueden tener un impacto en la interpretación de los cálculos estadísticos en genética forense. Dichas características se conocen como ligamiento (*linkage*) y desequilibrio de ligamiento (*linkage disequilibrium*, LD) (Ott 1999).

El ligamiento se refiere a la segregación conjunta de loci físicamente próximos (en un mismo cromosoma) en un pedigrí, mientras que el LD mide la co-segregación de alelos (no necesariamente en el mismo cromosoma) a un nivel poblacional. Para un determinado conjunto de marcadores, el ligamiento se puede determinar obteniendo las frecuencias de recombinación en muestras de familias, y el LD se estima mediante las frecuencias alélicas y haplotípicas (Tillmar *et al.* 2008).

El estudio de estos conceptos ha tenido un especial interés ya que podrían influir en los cálculos de probabilidades en las investigaciones de parentesco (Krawczak 2007; Szibor 2007; Tillmar *et al.* 2008). Esto es debido a que los haplotipos de STRs estrechamente ligados deben analizarse como un bloque en vez de tener en cuenta los alelos por separado (Szibor *et al.* 2003).

Por otro lado, los estudios sobre LD entre STRs y SNPs pueden proporcionar nuevos aspectos sobre el origen y la historia de las poblaciones humanas

(McEvoy *et al.* 2011). Especialmente los marcadores del cromosoma X pueden ser muy buenos candidatos para revelar diferencias entre poblaciones (Kaessmann *et al.* 2002).

### 3. Polimorfismos de cromosoma X y genética forense

Mientras que se han publicado numerosos artículos sobre STRs localizados en los cromosomas autosómicos y del cromosoma Y, la aplicación de marcadores de cromosoma X ha jugado un papel menor en la práctica forense hasta ahora. Sin embargo, el análisis de marcadores de cromosoma X puede complementar al de otros marcadores genéticos muy eficazmente, especialmente en casos complejos de análisis de parentesco.

#### 3.1. Criminalística

Los casos de delitos sexuales principalmente involucran perpetradores varones, por lo que la utilidad del uso de marcadores de cromosoma Y se hace evidente tal y como se ha comentado anteriormente. Sin embargo, en algunos casos, podría ser necesario la identificación de la limitada cantidad de células de la víctima. Esto ha sido observado en casos, en donde se han obtenido muestras del varón para corroborar el contacto del sospechoso con la víctima (Cina *et al.* 2000). En estas situaciones, el análisis de X-STRs es muy útil, ya que la porción femenina contribuye con 2 alelos en la mezcla. Aun así, la interpretación de los perfiles de X-STRs en las mezclas con pequeñas cantidades de células femeninas requiere considerar que los alelos X dominantes podrían derivar del varón y de esta forma enmascarar los alelos femeninos, reduciendo el poder de discriminación del test (Szibor 2007).

#### 3.2. Investigación de parentesco

Los casos de paternidad que involucran al trio madre, hijo/a y padre putativo, pueden ser generalmente resueltos con el uso de STRs autosómicos, sin la necesidad de marcadores adicionales o alternativos. Sin embargo, cuando se pretende evaluar la relación padre/hija, la inclusión de marcadores X-STR podría valer la pena, y lo mismo sucedería con relaciones madre/hijo (Szibor *et al.* 2003).

Las paternidades deficientes y los casos complejos de parentesco son el principal área de aplicación de los marcadores del cromosoma X (Desmarais *et al.* 1998; Hering *et al.* 2006; Szibor 2007; Szibor *et al.* 2005). La investigación de marcadores del cromosoma X de dos hermanas o medio hermanas puede excluir la paternidad, incluso si no están los padres disponibles, ya que

si estuvieran relacionadas deberían mostrar el mismo cromosoma X paterno. Por otro lado, en los casos de paternidades deficientes, la abuela paterna sería la figura clave, ya que todos los alelos del cromosoma X del padre putativo pueden determinarse investigando el genotipo de la abuela (Szibor *et al.* 2003).

#### **4. Polimorfismos de cromosoma X y genética de poblaciones**

El cromosoma X tiene un papel muy interesante en genética de poblaciones. En varones, está presente como única copia, lo cual hace su estudio más sencillo que el de los autosomas. Esta característica, que comparte con el ADNmt y el cromosoma Y, explicaría su utilidad en un número cada vez mayor de estudios, especialmente aquellos dirigidos a descifrar la historia de las poblaciones humanas. Sin embargo, el estudio del cromosoma X para estos fines continua siendo eclipsado por los de ADNmt y cromosoma Y, a pesar de contener mucha más información genética que éstos.

Hasta la llegada de la tecnología de secuenciación de ADN, los estudios genético poblacionales no se centraron en el cromosoma X. Los primeros estudios de secuencia y árboles filogenéticos del cromosoma X aparecieron a finales del siglo XX (Harris y Hey 1999; Hey 1997; Jaruzelska *et al.* 1999; Kaessmann *et al.* 1999; Nachman *et al.* 1998; Zietkiewicz *et al.* 1998). A medida que fue madurando las tecnologías de secuenciación y genotipado, se avecinó un significativo aumento de información genética de todo tipo sobre este cromosoma.

Las cuestiones biológicas que se pueden estudiar con el cromosoma X derivan de las características comentadas anteriormente. La historia principalmente femenina del cromosoma X le hace un sistema ideal para estudiar las diferencias genético-poblacionales entre hombres y mujeres, especialmente diferencias en la tasa de mutación y los patrones de recombinación (Schaffner 2004).

La mayor tasa de mutación en mamíferos varones, incluyendo humanos, es atribuida al mayor número de mitosis que las células germinales realizan en varones (Nachman y Crowell 2000). Contrariamente, la tasa total de recombinación es mayor en mujeres, y varía a lo largo de los cromosomas para ambos sexos (Kong *et al.* 2002).

Por otro lado, la selección natural podría ser más visible en el cromosoma X que en los autosomas. Para ello existen dos explicaciones; en primer lugar, debido a que los alelos recesivos en el cromosoma X de varones están expuestos a la selección a pesar de su frecuencia, una mayor fracción de

mutaciones padecen selección; y en segundo lugar, el mayor desequilibrio de ligamiento en el cromosoma X significaría que, cuando la selección actúa en un locus, es más probable que afecte a una región mayor de lo que lo haría en los autosomas. Por lo tanto, un barrido selectivo generalmente cubriría más secuencia en el cromosoma X (Sabeti *et al.* 2002).

### 4.1. Estudios sobre la historia humana

La facilidad de determinar los haplotipos distingue al cromosoma X (en el caso de varones) de los autosomas, y la recombinación lo distingue del cromosoma Y y el ADNmt. Estos dos últimos, actúan como único locus y comparten una única historia genealógica. El cromosoma X y los autosomas, por otro lado, padecen recombinación en cada generación, por lo que diferentes regiones tienen historias distintas. La recombinación, en este contexto, significa que el cromosoma X registra un gran número de información de la historia de una población (Schaffner 2004).

El cromosoma X puede ser una fuente valiosa de información sobre la vía en que los parámetros genético-poblacionales difieren entre varones y mujeres. Varios mecanismos podrían contribuir a este fenómeno como por ejemplo, diferentes patrones reproductivos y de mortalidad (Schaffner 2004).

Hasta ahora, sin embargo, el poder de cualquier locus del cromosoma X para desvelar estas cuestiones ha sido muy bajo, principalmente debido a la mezcla de historias masculina y femenina en el cromosoma X. Aunque, a largo plazo, el volumen de información sobre cromosoma X promete proporcionar una perspectiva diferente en cuestiones que ni el cromosoma Y ni el ADNmt son capaces de resolver.

Actualmente, abundan los estudios sobre áreas geográficas y poblaciones pequeñas. Pero la gran mayoría de estos trabajos están basados en el cromosoma Y y el ADNmt, y apenas existen sobre cromosoma X. La razón de esta predominancia es en parte debido a la largo camino recorrido, y sirve de contexto para nuevos estudios. Además, el cromosoma Y y el ADNmt son muy apropiados para trazar la historia local reciente. Sus elevadas tasas de mutación y deriva genética en comparación con el cromosoma X, hacen que las poblaciones tiendan a diferir más en estos loci, permitiendo una mejor resolución para estudios locales. Por otro lado, esta última característica podría no ser siempre una ventaja ya que una deriva genética más rápida, también significa que las relaciones entre poblaciones se borran más fácilmente, siendo complejo identificar las poblaciones ancestrales.

Es evidente que se necesitan muchos más loci para desentrañar las complejidades de la historia de las poblaciones. Por eso es que, a pesar de su mínima contribución hasta el momento, el cromosoma X presenta un enorme potencial en este respecto. La información existente sobre el cromosoma X es suficientemente elevada como para ser esperanzadora. Sin embargo, aún se necesita un esfuerzo por parte de la comunidad forense para obtener el mismo alcance que se ha obtenido con el ADNmt y el cromosoma Y.

Hasta ahora, se han descrito las características principales y la importancia de los diferentes marcadores en genética forense y genética de poblaciones. También se ha hecho referencia a la importancia de las bases de datos genéticas enriquecidas principalmente gracias a los estudios genético poblacionales. A pesar de que existen ya muchas poblaciones humanas caracterizadas para los marcadores antes mencionados, aún quedan algunas poblaciones que no han sido estudiadas al respecto, como es el caso de Nicaragua.

## NICARAGUA

Nicaragua es el país más grande de Centroamérica, limitado al norte por Honduras, al este por el mar caribe, al sur por Costa Rica, y al oeste por el océano Pacífico (Figura 9).



Figura 9. Nicaragua.

El origen de la población de Nicaragua, como el de la mayoría de países latino americanos, comprende una sustancial mezcla étnica. La colonización de Nicaragua en 1524 (Séjourné 1972) introdujo varias poblaciones que interactuaron y se mezclaron con los nativos americanos residentes. Estas poblaciones fueron los europeos (principalmente españoles) y los africanos subsaharianos (quienes fueron llevados como esclavos).

En Nicaragua hubieron varias oleadas migratorias provenientes del norte de Mesoamérica. Las primeras poblaciones que se establecieron en Nicaragua fueron los Chorotega (o Mangue) sobre el 800 d.C (Tous 2003). Posteriormente, este grupo se vio forzado a desplazarse de sus territorios a la

región central de Nicaragua debido a la llegada de los Nicaro. Otro grupo nicaragüense fueron los Subtiaba (o Maribio), los cuales podrían estar relacionados con los Chorotega. Estos grupos principalmente hablaban lenguas de las familias Uto-azteca y Oto-mangue (Tous 2003). Por otro lado, los Chontales (o Matagalpa) también ocuparon la región montañosa central de Nicaragua. Su lengua ha sido clasificada en la familia Misumalpense, relacionada con la familia Chibcha (Constenla 2002; Lewis 2009).

La costa caribeña de Nicaragua, donde los españoles no se asentaron hasta el siglo XIX (Séjourné 1972) ya que fueron los ingleses los que impusieron primero su dominio sobre esta región (Merrill 1994), tuvo una historia diferente. Tribus con varias lenguas y dialectos relacionados con la familia Chibcha habitaron la mayoría de esta zona (Constenla 2002). El grupo de los Bawihka, el cual vivió en el noreste de Nicaragua, se mezcló con esclavos africanos que provenían de territorios británicos caribeños y lograron expandirse hasta controlar otros grupos indígenas como los Sumus, Ramas y Garifundas (Helms 1996). Este grupo afro-indígena pasó a llamarse Miskito, y actualmente es el grupo indígena más numeroso en Nicaragua (INIDE 2005).

A pesar de los numerosos grupos nativos americanos que habitaban Nicaragua durante el período colonial, los textos históricos registraron un drástico declive demográfico a la llegada de los colonos españoles, estimado en un 90-95% de la población indígena (Tous 2003). A su vez, la llegada de los colonos condujo a una mezcla interracial entre las diversas poblaciones, llevando al desarrollo de un nuevo grupo, los mestizos, el cual actualmente es el grupo más abundante en Nicaragua.

El último censo, realizado en el año 2005 (INIDE 2005), evidencia un total de 5.142.098 habitantes. Actualmente, la población de Nicaragua está compuesta por mestizos (69%), caucasoides (17%), africanos (9%), y amerindios (5%) (CIA 2011). La mayoría de la población nicaragüense reside en la región occidental del país, en los departamentos de Mangua, Granada y León.

En Nicaragua existe un bajo porcentaje de comunidades indígenas. Entre los grupos nativos americanos reconocidos en el país se encuentran los Xiu-Sutiaba, Naho-Nicarao, Chorotega-Nahua-Mangue y Cacaopera-Matagalpa, los cuales residen básicamente en el centro y costa Pacífica de Nicaragua (INIDE, 2005). Los grupos afro-indígenas son los Rama, Garifunda, Sumu, Ulwa, Creole y Miskitu los cuales residen principalmente en la costa del Caribe, región más vasta y despoblada del país (INIDE, 2005).

Por otro lado, hay también una comunidad siria, armenia, palestina, judía y libanesa, resultado de migraciones más recientes, de alrededor de 30.000

habitantes, como también una comunidad asiática proveniente principalmente de Japón, Taiwán y China (Library IADC). Se estima que la población china nicaragüense se aproxima a los 12.000 habitantes.

Este panorama poblacional en conjunto, hace que el estudio de la población nicaragüense sea muy interesante en términos de mezcla y diversidad genética poblacional.

## JUSTIFICACIÓN DEL TEMA Y OBJETIVOS

Como se ha expuesto en la *Introducción*, los diversos sistemas genéticos citados, son herramientas fundamentales en las diversas aplicaciones de la genética forense.

Estas aplicaciones se ven íntimamente ligadas a la genética de poblaciones. El estudio de marcadores genéticos en las diversas poblaciones humanas permite conocer el comportamiento de dichos sistemas genéticos y de esta forma valorar su eficacia para fines identificativos. Del mismo modo, la información genética obtenida de las diversas poblaciones permite la generación de bases de datos genéticas imprescindibles para la valoración estadística de la "prueba del ADN". Pero la genética de poblaciones humanas no solo constituye una herramienta de ayuda para la genética forense sino que, además, permite aproximarse a la historia de las poblaciones humanas y conocer mejor nuestros orígenes.

Se ha realizado un gran número de estudios genético poblacionales que han revelado distintos aspectos sobre la evolución y las diversas migraciones humanas acontecidas a lo largo de nuestra historia (Beleza *et al.* 2005; Bosch *et al.* 2000; Cann *et al.* 1987; Cavalli-Sforza 1997). Muchos de estos trabajos se han centrado en el continente americano ya que debido a su pasado de intercambio genético entre diferentes poblaciones ofrecen un panorama genético muy atractivo (Gonzalez-Andrade *et al.* 2007; Mendizabal *et al.* 2008; Rodriguez-Delfin *et al.* 2001; Wang *et al.* 2008). Sin embargo, existen pocos estudios que se hayan centrado en las poblaciones de Centroamérica y, en particular, que hayan analizado en conjunto el ADNmt, los marcadores autosómicos y de los cromosomas sexuales en una misma muestra poblacional, permitiendo contrastar los patrones de diversidad para alcanzar un conocimiento más completo desde distintos puntos de vista. Este conocimiento tiene un gran significado a efectos de identificación en genética forense, ya que desvelar el panorama genético con el estudio de diversos marcadores permitiría conocer el origen del individuo al que pertenece una muestra biológica (caucasoide, mestizo, nativo americano, etc.) obtenida en el escenario de un crimen. Así mismo, esto es de gran importancia para el desarrollo de bases de datos genético-poblacionales porque las migraciones de estas poblaciones latinoamericanas hacia EEUU y España puede tener una considerable influencia en la genética de las poblaciones locales.

Queda de manifiesto, que no es posible hablar de genética forense sin genética de poblaciones, y que esta última aporta además una información

muy interesante y estimulante en términos antropológicos. Por ello, para la presente tesis doctoral se desarrolló una estrategia de investigación abarcando ambas vertientes.

En primer lugar, se planteó el estudio de un conjunto de marcadores ampliamente reconocidos en el ámbito forense (ADNmt, STRs autosómicos y de los cromosomas sexuales, y SNPs del cromosoma Y), en la población mestiza de Nicaragua, no caracterizados hasta el momento en esta población. Con ello se pretendía valorar la eficacia discriminativa de dichos marcadores desde un punto de vista genético forense, así como compilar una información genética completa que contribuyera a las diferentes bases de datos genético-poblacionales ya existentes.

En segundo lugar, la elección de la población mestiza de Nicaragua se realizó bajo la hipótesis de revelar la huella genética de la mezcla interracial ocurrida durante el período de colonización de América, por las diversas poblaciones involucradas.

### **Objetivo principal**

El objetivo principal de la presente tesis doctoral es conocer la variabilidad genética de la población mestiza de Nicaragua para los principales polimorfismos utilizados en genética forense, así como aproximarse a la historia de esta población a través del estudio del ADN.

### **Objetivos específicos**

- 1) Determinar la variabilidad genética de los marcadores STR autosómicos y de los cromosomas sexuales (X e Y) en la población mestiza de Nicaragua.
- 2) Establecer los haplogrupos de cromosoma Y que caracterizan a la presente muestra poblacional mediante el análisis de SNPs, para estudiar el origen de la aportación genética masculina en los mestizos de Nicaragua.
- 3) Caracterizar los linajes maternos mediante el análisis de las regiones hipervariables (HVSI y HVSII) de la región control del ADN mitocondrial de la población mestiza de Nicaragua, así como estudiar su variabilidad.
- 4) Determinar los haplogrupos de ADNmt para estudiar el origen de la aportación genética femenina a la población mestiza de Nicaragua.

- 5) Calcular los parámetros estadísticos de mayor interés médico-legal para demostrar la utilidad y rendimiento de estos polimorfismos en genética forense y genética de poblaciones.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Selección de muestras de la población nicaragüense

En este estudio se han analizado muestras de individuos mestizos sanos y no emparentados, que han nacido y residen en Nicaragua. Las muestras se obtuvieron de varias regiones geográficas (Tabla 1).

Tabla 1. Origen geográfico y número de muestras obtenidas de la población de Nicaragua. Las zonas muestreadas se encuentran resaltadas en la imagen de la derecha.

Origen geográfico	Nº de muestras
Carazo	2
Chinandega	35
Chontales	1
Costa Atlántica RAAN	17
Costa Atlántica RAAS	3
Esteli	4
Granda	2
Jinotega	6
León	69
Madriz	2
Matagalpa	14
Managua	1
Nueva Segovia	9
<b>Total</b>	<b>165</b>



Todas las personas incluidas en la muestra aceptaron participar voluntariamente en el estudio, previa información de la finalidad del mismo y tras haber firmado el correspondiente consentimiento informado.

De cada individuo, se obtuvo sangre mediante punción dactilar que se depositó en papel FTA® y las muestras fueron debidamente almacenadas a -20°C.

### 2. Extracción de ADN

El ADN se extrajo mediante el método Chelex-100 (Walsh *et al.* 1991). Durante cada extracción se llevó a cabo un blanco de extracción.

Se cortó un pedazo de la mancha de sangre de unos 3 mm de lado y se colocó en un tubo estéril de 1,5 ml. Seguidamente se añadió 1 ml de agua desionizada autoclavada.

Se incubó a temperatura ambiente durante aproximadamente 20 minutos, durante los cuales se fue mezclando por inversión.

Se realizó una centrifugación a 12.500 rpm por 3 minutos, y el sobrenadante resultante se desechó.

Posteriormente, se añadieron 130 µl de Chelex 5% usando una punta cortada para obtener un número adecuado de microesferas. Se mezcló mediante agitación a máxima velocidad y se pincharon los tubos con una aguja estéril. Los tubos se pusieron a hervir durante 8 minutos.

Finalmente, se agitó de nuevo y se almacenó la solución a -20°C hasta proceder a su análisis.

### 3. Cuantificación de ADN

Tras la extracción, el ADN se cuantificó con el *Quantifiler™ Human DNA Quantification kit*, en el equipo *StepOne™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Este kit es específico para la cuantificación de ADN humano, además incorpora un control interno que monitoriza la inhibición de la PCR.

### 4. Análisis de HVSI y HVSII del ADNmt

#### 4.1. Amplificación del ADN mitocondrial

Previo a la amplificación, las muestras se centrifugaron durante 3 minutos a 12.500 rpm. En cada amplificación se realizó un negativo de amplificación para comprobar posibles contaminaciones de los reactivos de PCR. En la amplificación se incluyeron también los blancos de extracción para monitorizar posibles contaminaciones.

Las regiones del ADN mitocondrial analizadas fueron la HVSI y HVSII de la región control. Para ello, se utilizaron dos parejas de cebadores los cuales generan fragmentos de unas 400 pb, y que contienen la secuencia universal M13.

Los cebadores empleados para el segmento HVSI fueron Fw15996 y Rv16401, mientras que para HVSII fueron Fw29 y Rv408 (Tabla 2) (Vigilant *et al.* 1991).

Tabla 2. Cebadores utilizados para la amplificación de los fragmentos HVSI y HVSII de la región control del ADN mitocondrial. La región subrayada muestra la secuencia universal M13.

7. HVSI	Fw 15996	5' <u>CAG GAA ACA GCT ATG ACC</u> CTC CAC CAT TAG CAC CCA AAG C -3'
	Rv 16401	5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT TGA TTT CAC GGA GGA TGG TG -3'
HVSII	Fw 29	5' <u>CAG GAA ACA GCT ATG ACC</u> GGT CTA TCA CCC TAT TAA CCA C -3'

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 20  $\mu$ l (para ambos segmentos), utilizando el kit *HotStarTaq Plus Master Mix* (Qiagen, Chatsworth, CA). Los reactivos y las cantidades correspondientes se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Reactivos y volúmenes correspondientes utilizados para la reacción de amplificación de HVS1/II del ADNmt.

Reactivo	Volumen ( $\mu$ l)
HotStar Taq Plus Master Mix	10
Primer Fw (10 $\mu$ M)	0,4
Primer Rv (10 $\mu$ M)	0,4
Agua desionizada autoclavada	8,2
ADN	1
<b>Volumen final</b>	<b>20</b>

La amplificación se llevó a cabo igual para ambos segmentos, en un termociclador 2720 (Applied Biosystems, Foster City, CA), bajo las siguientes condiciones: 1) Desnaturalización inicial: 95°C 5 min; 2) 30 ciclos: 94°C 45 s, 60°C 60 s y 72°C 60 s; 3) Elongación final: 72°C 60 s; y 4) Almacenamiento: 4°C  $\infty$ .

#### 4.2. Comprobación del producto amplificado mediante gel de agarosa

La comprobación de los fragmentos amplificados se llevó a cabo en un gel de agarosa al 0,6 % en solución TBE 1X. El gel se preparó con bromuro de etidio al 0,01 % para la posterior detección de las bandas de amplificación con luz UV.

En cada pocillo del gel se añadieron 2  $\mu$ l del producto amplificado mezclados con 3  $\mu$ l de solución de carga (1  $\mu$ l de azul de bromofenol y 2  $\mu$ l de agua desionizada estéril).

La migración electroforética se realizó con un voltaje constante de 100V durante 15 minutos. Finalmente, el gel de agarosa teñido con bromuro de etidio se visualizó con luz UV.

#### 4.3. Purificación del ADN

Los productos de PCR se purificaron mediante el kit *MinElute® PCR Purification Kit* (Qiagen, Chatsworth, CA) para eliminar los restos de los reactivos de la mezcla de amplificación, así como productos de amplificación incompleta.

#### 4.4. Reacción de secuenciación

La secuenciación se llevó a cabo en un volumen final de 10 µl mediante el *BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA) y los cebadores universales M13 (Tabla 4). Los reactivos y sus volúmenes se detallan en la Tabla 5.

Tabla 4. Cebadores universales M13 utilizados para la reacción de secuenciación.

<b>M13 Fw</b>	5' TGAAAACGACGGCCAGT 3'
<b>M13 Rv</b>	5' CAGGAAACAGCTATGACC 3'

Tabla 5. Reactivos y volúmenes correspondientes para la reacción de secuenciación.

Reactivo	Volumen (µl)
BigDye® Terminator v1.1 Ready Reaction Mix	1,5
Sequencing Buffer (5x)	0,75
Primer M13 (10 µM)	1
Agua desionizada autoclavada	5,75
Producto de PCR	1
<b>Volumen final</b>	<b>10</b>

La secuenciación se llevó a cabo igual para ambos segmentos, en un termociclador 2720 (Applied Biosystems, Foster City, CA), bajo las condiciones recomendadas por el fabricante: 1) 25 ciclos: 96°C 10 s, 50°C 5 s, y 60°C 4 min; y 4) Almacenamiento: 4°C ∞.

#### 4.5. Purificación de los productos de la reacción de secuenciación

Se utilizaron las columnas *DyeEx 2.0 Spin Kit* (Qiagen, Chatsworth, CA) para eliminar los terminadores marcados no incorporados en la reacción de secuenciación y que podrían interferir en la reacción electroforética posterior.

#### 4.6. Electroforesis capilar del producto de secuenciación

Tras añadir 16  $\mu$ l de *Formamida Hi-Di* (Applied Biosystems, Foster City, CA) al producto de secuenciación purificado, éste se cargó en el analizador automático *ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las condiciones de electroforesis fueron las incluidas en el módulo *P4StdSeq(1ml)E.md4* del software del equipo. En todos los casos se utilizó el polímero *POP-4™* (*Performance Optimized Polymer 4*).

#### 4.7. Análisis de resultados

Las secuencias fueron analizadas mediante el software *Sequencing Analysis* (Applied Biosystems, Foster City, CA) y posteriormente fueron comparadas con rCRS mediante el software *SeqScape®* (Applied Biosystems, Foster City, CA). La edición de las secuencias fue realizada por dos analistas por separado y se realizó entre las posiciones 16024 y 16365 para HVSI y 60-340 para HVSII.

Las secuencias fueron analizadas con la herramienta de la EMPOP que permite determinar la plausibilidad de las secuencias.

Los haplogrupos fueron asignados mediante las herramientas online *mtDNAMANAGER* (Lee *et al.* 2008) y *HaploGrep* (Kloss-Brandstatter *et al.* 2011; van Oven y Kayser 2009) siguiendo la versión más actualizada de la filogenia del ADNmt.

## 5. Análisis de STRs autosómicos

### 5.1. Amplificación de los STRs autosómicos

Se analizaron los 15 loci STRs incluidos en el *AmpFISTR® Identifier® PCR Amplification kit*: D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, D5S818, FGA (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los reactivos y sus respectivos volúmenes se detallan en la Tabla 6. En cada reacción se realizó un blanco de amplificación. El tamaño de los fragmentos y la designación alélica se realizó comparando con la escalera alélica proporcionada por el kit.

Tabla 6. Reactivos y volúmenes correspondientes para la reacción de amplificación de los 15 STRs autosómicos.

Reactivo	Volumen ( $\mu$ l)
PCR Reaction Mix	5,25
AmpliTaqGold® DNA Polymerase	0,25
Primer Set	2,75
ADN	0,8-1 ng
<b>Volumen final</b>	<b>13</b>

El proceso de amplificación se llevó a cabo en un termociclador 2720 (Applied Biosystems, Foster City, CA), bajo las siguientes condiciones: 1) Desnaturalización inicial: 95°C 11 min; 2) 28 ciclos: 94°C 1 min, 59°C 1 min y 72°C 1 min; 3) Elongación final: 60°C 60 min; y 4) Almacenamiento: 4°C ∞.

## 5.2. Electroforesis capilar de los fragmentos

Se preparó 1,5 µl del producto de amplificación con 24,5 µl de *Formamida Hi-Di* y 0,5 µl de estándar de peso molecular (*GeneScan™ -500 LIZ Size Standard*). La escalera alélica (*Allelic Ladder*) se preparó de igual forma que la muestra. Posteriormente, se procedió a la desnaturalización de las muestras a 95°C durante 3 minutos, y se dejaron enfriar a -20°C durante otros 3 minutos. Seguidamente se cargó en el analizador automático *ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City, CA) y los resultados fueron analizados con el *GeneMapper™ ID software*, versión 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

## 6. Análisis de STRs de cromosoma Y

### 6.1. Amplificación de los STRs de cromosoma Y

Se analizaron los 17 loci Y-STRs incluidos en el *AmpFISTR® Yfiler® PCR Amplification kit*: *DYS456*, *DYS458*, *DYS19*, *DYS389I/II*, *DYS385a/b*, *DYS439*, *DYS635*, Y *GATA H4*, *DYS437*, *DYS438*, *DYS448* *DYS390*, *DYS391*, *DYS392* y *DYS393* (Applied Biosystems, Foster City, CA). La amplificación se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los reactivos y sus respectivos volúmenes se detallan en la Tabla 7. En cada reacción se realizó un blanco de amplificación. El tamaño de los fragmentos y la designación alélica se realizó comparando con la escalera alélica proporcionada por el kit.

Tabla 7. Reactivos y volúmenes correspondientes para la reacción de amplificación de los 17 Y-STRs.

Reactivo	Volumen (µl)
PCR Reaction Mix	9,2
Primers Set	5
AmpliTaq Gold® DNA Polymerase	0,8
Agua desionizada autoclavada	4
ADN	1
<b>Volumen final</b>	<b>20</b>

El proceso de amplificación se llevó a cabo en un termociclador 2720 (Applied Biosystems, Foster City, CA), bajo las siguientes condiciones: 1) Desnaturalización inicial: 1) Desnaturalización inicial: 95°C 11 min; 2) 30 ciclos: 94°C 1 min, 61°C 1 min y 72°C 1 min; 3) Elongación final: 60°C 80 min; y 4) Almacenamiento: 4°C ∞.

## 6.2. Electroforesis capilar de los fragmentos

Se preparó 1,5 µl del producto de amplificación con 24,5 µl de *Formamida Hi-Di* y 0,5 µl de estándar de peso molecular (*GeneScan™ -500 LIZ Size Standard*). La escalera alélica (*Allelic Ladder*) se preparó de igual forma que la muestra. Posteriormente, se procedió a la desnaturalización de las muestras a 95°C durante 3 minutos, y se dejaron enfriar a -20°C durante otros 3 minutos. Seguidamente se cargó en el analizador automático *ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City, CA) y los resultados fueron analizados con el *GeneMapper™ ID software*, versión 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

## 6.3. Predicción de los haplogrupos de cromosoma Y

Para obtener una primera aproximación a los haplogrupos de cromosoma Y de la muestra estudiada, se realizó una predicción de estos en base a los haplotipos de 17 Y-STRs, mediante el *23-Haplogroup Beta Program of Haplogroup Predictor* (Athey 2006). Esta herramienta está fundamentada en una aproximación Bayesiana basada en las frecuencias alélicas, las cuales han sido calculadas de colecciones de haplotipos extraídos de artículos publicados y bases de datos (Athey 2005). Sin embargo, este método se considera solo una predicción y la determinación precisa de los haplogrupos se debe realizar mediante el análisis de Y-SNPs.

## 7. Análisis de SNPs del cromosoma Y

### 7.1. Determinación de los haplogrupos de cromosoma Y

La determinación de los haplogrupos de cromosoma Y de la muestra de Nicaragua se llevó a cabo mediante el análisis de diferentes Y-SNPs, siguiendo la jerarquía de la filogenia del cromosoma Y humano (Figura 6), en varias

reacciones multiplex. Estos análisis se realizaron en el laboratorio de Genética Forense del Instituto de Medicina Legal de la Universidad Charité (Campus Virchow-Klinikum, Berlin).

Dependiendo de la predicción de haplogrupo resultante del análisis de Y-STRs anterior, las muestras se analizaron con un multiplex determinado (Tabla 8). Las muestras presuntamente pertenecientes al haplogrupo R se analizaron con el multiplex I (comunicación personal de Maria Geppert), mientras que las que resultaron clasificadas dentro del haplogrupo G se analizaron con el multiplex III (comunicación personal de Maria Geppert). Las muestras presuntamente pertenecientes a los haplogrupos E, I, y J, fueron analizadas con los multiplex IV (haplogrupo E), V (haplogrupo I), y VI (haplogrupo J) más específicos (comunicación personal de Maria Geppert), con el fin de profundizar en la caracterización del linaje de estos tres haplogrupos. Por otro lado, las muestras que podrían pertenecer al haplogrupo Q fueron analizadas con el multiplex II, descrito en Geppert et al. (2011), el cual comprende 5 Y-SNPs centrados en los sublinajes de Q-M3. El resto de muestras fueron analizadas con el multiplex VII, el cual incluye 12 Y-SNPs que definen los principales y más frecuentes haplogrupos de cromosoma Y (Geppert et al. 2011).

Tabla 8. Multiplex utilizados para la determinación de los haplogrupos de cromosoma Y. Se muestran los Y-SNPs incluidos en cada multiplex así como el haplogrupo asociado. La elección de cada multiplex tuvo lugar en función del presunto haplogrupo asignado.

Presunto haplogrupo	Multiplex	Haplogrupo-SNP	Presunto haplogrupo	Multiplex	Haplogrupo-SNP		
<b>R</b>	I	K-M9	<b>I</b>	V	I-M170		
		P-M45			I1-M253		
		N-M231			I2-P215		
		N1c-Tat			I2a-P37.2		
		R-M207			I2b-M223		
		R1b-M343			<b>J</b>	VI	J-P209
		R1a-M198					J1-M267
		O-M175					J2-M172
							J2a-M410
		<b>Q</b>			II*	Q1a3-M346	<b>T, L, H</b>
Q1a3a-M3	BT-M42						
Q1a3a1-M19	CT-M168						
Q1a3a2-M194	C-RPS4Y711						
Q1a3a3-P292, M199	DE-M145						
<b>E, G, I, J</b>	III	CT-M168			D-M174		
		DE-M145			E-P170		
		D-M174			FT-M213		
		E-P170			K-M9		
		FT-M213			P-M45		
		G-M201			Q-M242		
		J-P209			Q1a3a-M3		
		I-M170			R-M207		
		K-M9					
<b>E</b>	IV	E-P170					
		E1a-M33					
		E1b1-P2					
		E1b1a-M2					
		E1b1b1-M35					
		E2-M75					

\* Geppert et al., 2011

## 7.2. Condiciones de amplificación

La reacción de amplificación se llevó a cabo mediante el kit *HotStaTaq Plus Master Mix* (Qiagen, Chatsworth, CA) en un termociclador *Flex Cycler* (Analytik Jena, AG, Alemania). Los reactivos y las cantidades correspondientes se muestran en la Tabla 9. Los cebadores utilizados para cada multiplex se muestran en el Anexo 2. En cada reacción se realizó un blanco de amplificación.

En todos los casos la amplificación tuvo lugar bajo las siguientes condiciones: 1) Desnaturalización inicial: 95°C 15 min; 2) 32 ciclos: 94°C 30 s, 57°C 1.30 min, 72°C 1 min; y 4) Almacenamiento: 4°C ∞; excepto para los multiplex IV, V en donde las condiciones de anillamiento fueron de 60°C 1.30 minutos, y para el multiplex VI de 61°C 1.30 minutos.

### 7.3. Comprobación del producto amplificado mediante gel de agarosa

La comprobación de los fragmentos amplificados se llevó a cabo en un gel de agarosa al 4,5 % en solución TBE 1X. El gel se preparó con 7 µl bromuro de etidio para la posterior detección de las bandas de amplificación con luz UV. En cada pocillo del gel se añadieron 2 µl del producto amplificado mezclados con 4 µl de solución de carga (1:3). La migración electroforética se realizó a un voltaje constante de 100V durante 60 minutos. Finalmente, el gel de agarosa teñido con bromuro de etidio se visualizó con luz UV.

Tabla 9. Reactivos y volúmenes utilizados en la reacción de amplificación y de extensión de único nucleótido (SBE) para cada multiplex de Y-SNPs.

Reactivos	Volúmenes (µl)						
	Multiplex I	Multiplex II	Multiplex III	Multiplex IV	Multiplex V	Multiplex VI	Multiplex VII
<b>Amplificación</b>							
Multiplex Mastermix	3	3	3	3	3	3	3,6
Primers (20 µM)	1,6	1,15	1,9	1,2	1	1	2,6
Agua destilada autoclavada	0,4	0,85	0,1	0,8	1	1	0
ADN (aprox. 1ng/µl)	1	1	1	1	1	1	1
Total	6	6	6	6	6	6	7,2
<b>Reacción SBE</b>							
SNaPshot Reaction mix	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Primers (5 µM)	1,6	1,15	1,5	1,1	1	0,65	2,3
Agua destilada autoclavada	1,4	1,85	1,5	1,9	2,35	2,35	0
Producto de PCR	1	1	1	1	1	1	1
Total	5,5	5,5	5,5	5,5	5,85	5,5	4,8

### 7.4. Purificación de los productos de amplificación

Tras la amplificación se llevó a cabo la purificación del producto mediante 2 µl de *ExoSAP-IT*<sup>®</sup> (USB) con una incubación a 37°C durante 60 minutos seguido de 75°C durante 15 minutos para la inactivación de las enzimas.

### 7.5. Reacción de extensión de una base (SBE)

La reacción SBE se realizó mediante el *ABI PRISM® SNaPshot™ Multiplex Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA) en un termociclador *Flex Cycler* (Analytik Jena, AG, Alemania). Los reactivos y volúmenes correspondientes para cada multiplex se muestran la Tabla 9. Los cebadores utilizados para cada multiplex se muestran en el Anexo 2. La reacción se llevó a cabo en 25 ciclos a 96°C 10 s, 50°C 5 s y 60°C 30 s, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

## 7.6. Purificación del producto de SBE

La purificación posterior se realizó mediante 1  $\mu$ l de *shrimp alkaline phosphatase* (USB) en una incubación a 37°C durante 60 minutos seguido de 85°C durante 15 minutos para inactivar la enzima.

## 7.7. Electroforesis capilar

Se preparó 1  $\mu$ l del producto de purificación con 19,8  $\mu$ l de solución de *Formamida Hi-Di* y 0,2  $\mu$ l de estándar de peso molecular (*GeneScan™ -120 LIZ Size Standard*), y se analizó mediante electroforesis capilar en un *ABI 3130xl Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los resultados se analizaron utilizando el *GeneMapper™ ID software*, versión 3.2.1. (Applied Biosystems, Foster City, CA). En el Anexo 2 se muestran ejemplos de electroforegramas obtenidos con cada uno de los multiplex.

## 8. Análisis de STRs del cromosoma X

### 8.1. Amplificación de STRs del cromosoma X

Se analizó el X-STR decaplex propuesto por el GEP-ISFG (Gusmao *et al.* 2008; Gusmao *et al.* 2009), el cual incluye los loci DXS8378, DXS7133, GATA172D05, DXS7423, DXS9902 (Edelmann *et al.* 2002), DXS9898, DXS6809, DXS7132, DXS6789 (Gomes *et al.* 2007a) y GATA31E08 (Gomes *et al.* 2009b). Estos análisis se realizaron en el Banco de ADN (*BIOMICs Research Group*) de la Universidad del País Vasco UPV/EHU.

Los reactivos y sus volúmenes se muestran en la Tabla 10. En cada reacción se realizó un blanco de amplificación.

Tabla 10. Reactivos y volúmenes correspondientes para la reacción del X-STR decaplex.

Reactivo	Volumen ( $\mu$ l)
2X Qiagen Multiplex PCR Master Mix	5
10X Primer Mix (10 $\mu$ M)	0,4
Agua milliQ estéril	2,6
ADN	2 (1ng/ $\mu$ l)
<b>Volumen final</b>	<b>10</b>

La reacción se llevó a cabo en un equipo *GeneAmp® PCR System 9700 Gold* (Applied Biosystems, Foster City, CA) con el protocolo siguiente: 1)

Desnaturalización inicial: 1) 95°C 15 min; 2) 10 ciclos: 94°C 30 s, 58°C 90 s, 72°C 60 s; 3) 20 ciclos: 94°C 30 s, 58°C 90 s, 72°C 60 s; 4) Elongación final: 60°C 60 min; 5) Almacenamiento: 4°C ∞.

## 8.2. Electroforesis capilar de los fragmentos

Se preparó 1 µl del producto de amplificación con 12,5 µl de *Formamida Hi-Di* y 0,5 µl de estándar de peso molecular (*GeneScan™ -500 LIZ Size Standard*). Posteriormente, se procedió a la desnaturalización de las muestras a 95°C durante 3 minutos, y se dejaron enfriar a -20°C durante otros 3 minutos.

Seguidamente se cargó en el analizador automático *ABI PRISM™ 3130 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City, CA) y los resultados fueron analizados con el *GeneMapper™ ID software*, versión 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

## 9. Análisis estadístico

### 9.1. ADN mitocondrial

De las secuencias obtenidas se analizaron diferentes parámetros de diversidad, mediante el software *Arlequin v3.5.1.2* (Excoffier y Lischer 2010):

a) Diversidad de secuencia o haplotípica (H):

Se refiere a la probabilidad de que dos secuencias o haplotipos elegidos al azar sean diferentes en la muestra. Este parámetro se estima a través de las fórmulas:

$$\hat{H} = \frac{n}{n-1} \left( 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \right)$$

$$V(\hat{H}) = \frac{2}{n(n-1)} \left\{ 2(n-2) \left[ \sum_{i=1}^k p_i^3 - \left( \sum_{i=1}^k p_i^2 \right)^2 \right] + \sum_{i=1}^k p_i^2 - \left( \sum_{i=1}^k p_i^2 \right)^2 \right\}$$

Donde  $n$  es el número de secuencias analizadas;  $k$  el número de haplotipos identificados; y  $p_i$ , la frecuencia del haplotipo  $i$  en la muestra.

La desviación estándar se calculó como:

$$s.d.(\hat{H}) = \sqrt{V(\hat{H})}$$

b) Diversidad nucleotídica ( $\pi_n$ ):

Se refiere a la probabilidad de que dos nucleótidos homólogos elegidos al azar sean diferentes en la muestra. Es similar a la diversidad haplotípica pero a un nivel nucleotídico. Este parámetro se puede estimar mediante las fórmulas:

$$\hat{\pi}_n = \frac{\sum_{i=1}^k \sum_{j<i} p_i p_j \hat{d}_{ij}}{L}$$

$$V(\hat{\pi}_n) = \frac{n+1}{3(n-1)L} \hat{\pi}_n + \frac{2(n^2+n+3)}{9n(n-1)} \hat{\pi}_n^2$$

Y la correspondiente desviación estándar se calculó mediante:

$$s.d.(\hat{\pi}_n) = \sqrt{V(\hat{\pi}_n)}$$

c) Diferencias medias entre pares de secuencias ( $\pi$  o  $M$ ):

Este parámetro representa el número promedio de diferencias nucleotídicas encontradas entre las secuencias de la muestra. Se puede calcular a través de la fórmula:

$$\hat{\pi} = \frac{n}{n-1} \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k p_i p_j \hat{d}_{ij},$$

Donde  $d_{ij}$ , es una estimación del número de mutaciones ocurridas desde la divergencia de los haplotipos  $i$  y  $j$ ;  $k$ , es el número de haplotipos;  $p_i$  es la frecuencia del haplotipo  $i$ , y  $n$  es el tamaño de la muestra. La varianza

total, asumiendo ausencia de recombinación entre posiciones y neutralidad selectiva, se obtiene como:

$$V(\hat{\pi}) = \frac{3n(n+1)\hat{\pi} + 2(n^2 + n + 3)\hat{\pi}^2}{11(n^2 - 7n + 6)}$$

La diversidad nucleotídica y de secuencia se calculó como propuso (Nei 1987). A partir del número de diferencias nucleotídicas y su frecuencia se obtuvo la distribución *mismatch*. El software Arlequin también permite calcular otros parámetros asociados como D de Tajima (Tajima 1989),  $F_s$  de Fu (Fu 1997) y valor de tau (T) (Rogers y Harpending 1992). Cuando los dos primeros valores son negativos se interpretan como una señal de selección purificadora o expansión demográfica; mientras que el parámetro T es un índice del tiempo transcurrido desde una supuesta expansión demográfica en unidades de tiempo mutacional. En términos generales, el valor T será mayor en poblaciones estacionarias y disminuirá a medida que una población haya sufrido una expansión más reciente.

Por otro lado se obtuvo una red promedio (*Median-joining network*) de las secuencias HVSI y HVSII de los haplogrupos amerindios, utilizando el software Network 4.6.0.0 (Bandelt *et al.* 1999). Para la obtención de la red promedio se les dio un valor determinado a las posiciones nucleotídicas siguiendo las recomendaciones de Brandstatter *et al.* (2008) según la tasa de mutación.

Con el objetivo de situar la variabilidad del ADN mitocondrial de la población mestiza de Nicaragua dentro del continente americano, se compararon las secuencias HVSI de los linajes amerindios de Nicaragua con 40 poblaciones americanas recopiladas de la literatura (2.494 individuos). Las poblaciones americanas en cuestión se muestran en la Tabla 11. Para este propósito se tuvo en cuenta de la posición 16056 a la 16365.

La estructura poblacional fue testada mediante el análisis de la varianza molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.* 1992). Para la comparación entre poblaciones se calculó la matriz de distancias  $F_{st}$  y el test exacto de diferenciación poblacional (Raymond y Rousset 1995) usando el software Arlequin v3.5.1.2. El estadístico  $F_{st}$  compara el nivel de variación o diferenciación genética entre 2 o más subpoblaciones en relación con el total de la población (Bamshad *et al.* 2004). La matriz de distancias  $F_{st}$  se obtiene permutando haplotipos entre poblaciones (se utilizaron 1000 permutaciones).

Además, el algoritmo también calcula la significación estadística (P) como la proporción de permutaciones que producen un valor de  $F_{st}$  mayor o igual al observado. El nivel de significación fue de 0,05, de manera que dos poblaciones con un valor de P mayor de 0,05 no presentarían heterogeneidad genética significativa.

Por otro lado, el test exacto de diferenciación poblacional evalúa la hipótesis de una distribución al azar de  $k$  haplotipos diferentes entre  $r$  poblaciones, lo cual permite determinar la existencia o no de diferenciación genética entre pares de poblaciones. El resultado da una matriz de valores de P entre pares de poblaciones. Para un nivel de significación de 0,05, los valores se interpretan de igual forma que los obtenidos en la matriz  $F_{st}$ .

Para una mejor visualización de los resultados de  $F_{st}$  se realizó un análisis de escalamiento multidimensional (EMD), en el cual las posiciones relativas de las diferentes poblaciones reflejan el grado de proximidad o similitud, en este caso genética, existente entre ellas. Dicho análisis se llevó a cabo utilizando el paquete de programas estadísticos SPSS versión 17.0.

Para estimar el origen putativo más probable (Norte, Centro o Sudamérica) de las secuencias nativo americanas de Nicaragua, se calculó la probabilidad de origen para cada región subcontinental mediante una aproximación Bayesiana (Mendizabal *et al.* 2008):

$$p_{0s} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n k_i \frac{p_{is}}{p_{ic}}$$

Donde,  $n$  es el número de secuencias de Nicaragua con una coincidencia ( $\geq 1$ ) en la base de datos continental;  $k_i$ , el número de veces que la secuencia  $i$  se encuentra en la muestra de Nicaragua;  $p_{is}$ , la frecuencia de la secuencia  $i$  en la base de datos subcontinental; y  $p_{ic}$ , la frecuencia de la secuencia  $i$  en la base de datos continental. La desviación estándar se computó mediante:

$$SD(p_{0s}) = \sqrt{\frac{p_{0s}(1-p_{0s})}{n}}$$

Tabla 11. Poblaciones americanas y su referencia, utilizadas para la comparación de HVSI del ADNmt con la población mestiza de Nicaragua. N = número de individuos.

Región continental	Poblaciones	N	Referencia
NORTEAMÉRICA	Aleuts	163	Rubicz et al., 2003
	Triqui	107	Sandoval et al., 2009
	Tarahumara	15	Sandoval et al., 2009
	Purepecha	34	Sandoval et al., 2009
	Otomí	68	Sandoval et al., 2009
	Mixtec	19	Sandoval et al., 2009
	Xochimilco	35	Sandoval et al., 2009
	Zitlala	14	Sandoval et al., 2009
	Ixhuatlancillo	10	Sandoval et al., 2009
	Necoxtla	25	Sandoval et al., 2009
	Yucatec Maya	52	Sandoval et al., 2009
	Pima	98	Sandoval et al., 2009
	Nuu-Chah-Nulth	63	Ward et al., 1991
	Haida	40	Ward et al., 1993
	Bella Coola	40	Ward et al., 1993
	Navajo	120	Budowle et al., 2002
	Apache	144	Budowle et al., 2002
	Poblaciones Muskogean	48	Bolnick et al., 2003
	Yakima	41	Shields et al., 1993
	CENTROAMÉRICA	El Salvador	86
Cuba		81	Mendizabal et al., 2008
Huetar		27	Santos et al., 1994
Embera		44	Kolman et al., 1997
Wounan		31	Kolman et al., 1997
Ngöbe		46	Kolman et al., 1995
Kuna		63	Batista et al., 1995
SUDAMÉRICA	Colombia	109	Melton et al., 2007
	Guahibo	59	Vona et al., 2005
	Cayapa	120	Rickards et al., 1999
	Waorani	30	Baeta et al., 2009
	Arequipa	22	Fuselli et al., 2003
	Tayacaja	60	Fuselli et al., 2003
	San Martin	21	Fuselli et al., 2003
	Quechua	22	Sandoval et al., 2009
	Yanomami	50	Easton et al., 1996
	Bolivia	106	Alfonso Costa et al., 2010
	Ache	63	Schmitt et al., 2004
	Araucarian	72	Horai et al., 1993
	Uruguay	41	Pagano et al., 2005
Coyas	60	Álvarez Iglesias et al., 2007	

$$\begin{aligned} \text{PD (hombres)} &= 1 - \sum p_i^2 \\ \text{PE (trío)} &= 1 - \sum p_i^2 + \sum p_i^4 - \left(\sum p_i^2\right)^2 \\ \text{PE (spadre-hija)} &= 1 - 2\left(\sum p_i^2\right) + \sum p_i^3 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{PD (hombres)} &= 1 - \sum p_i^2 \\ \text{PE (trío)} &= 1 - \sum p_i^2 + \sum p_i^4 - \left(\sum p_i^2\right)^2 \\ \text{PE (spadre-hija)} &= 1 - 2\left(\sum p_i^2\right) + \sum p_i^3 \end{aligned}$$

## 9.2. Cromosoma Y

La diversidad haplotípica, diversidad por locus, frecuencias alélicas, así como el valor *Fst* entre pares de poblaciones y el test exacto de diferenciación

poblacional se calcularon utilizando el software Arlequin v3.5.1.2. La comparación entre poblaciones se realizó para Nicaragua y las poblaciones referidas en la Tabla 12. Para maximizar el número de loci y muestras solapantes entre las diferentes poblaciones, se consideraron 9 Y-STRs (DYS19, DYS389I/II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, y DYS385a/b) para este propósito. Se realizó un análisis EMD mediante la matriz de distancias *Fst* entre las poblaciones antes mencionadas. Dicho análisis se llevó a cabo utilizando el paquete de programas estadísticos SPSS versión 17.0.

Tabla 12. Poblaciones utilizadas para la comparación de haplotipos de Y-STRs con la población mestiza de Nicaragua y su referencia. N = número de individuos.

Región geográfica	Población	N	Referencia
Europa	España	148	Martin et al., 2004
	Italia	693	Capelli et al., 2007
	Alemania	89	Rodig et al., 2007
	Reino Unido	249	Ballard et al., 2005
	Francia	100	Keyser-Tracqui et al., 2003
África	Marruecos	109	Quintana-Murci et al., 2004
	Guinea Bissau	161	Rosa et al., 2006
	Angola	236	Coelho et al., 2009
América	Ecuador	203	González-Andrade et al., 2009a
	Guatemala	107	Martínez-Gonzalez et al., 2011
	El Salvador	120	Martínez-Jarreta et al., 2005
	Colombia	303	Romero et al., 2008
	Argentina	133	Blanco-Verea et al., 2010
	Illinois (USA)	68	Frank et al., 2006
Asia	Taiwan	199	Hwa et al., 2010
	China	101	Wu et al., 2011

### 9.3. Cromosoma X

Las frecuencias alélicas, la diversidad, el poder de discriminación de cada locus y el cálculo de desequilibrio de ligamiento se determinó mediante el programa Arlequin v3.5.1.2.

El cálculo de desequilibrio de ligamiento se realizó utilizando 100.000 etapas en la cadena de Markov, con 1000 etapas de dememorización.

Los parámetros de eficiencia forense calculados han sido el poder de discriminación (PD) y la probabilidad de exclusión de paternidad "a priori" (PE) según se trate de tríos (supuesto padre-madre-hija) o solamente supuesto padre-hija.

Las fórmulas utilizadas en cada caso han sido las propuestas por (Desmarais *et al.* 1998):

$$\begin{aligned} \text{PD (mujeres)} &= 1 - 2\left(\sum p_i^2\right)^2 + \sum p_i^4 \\ \text{PD (hombres)} &= 1 - \sum p_i^2 \\ \text{PE (trío)} &= 1 - \sum p_i^2 + \sum p_i^4 - \left(\sum p_i^2\right)^2 \\ \text{PE (spadre-hija)} &= 1 - 2\left(\sum p_i^2\right) + \sum p_i^3 \end{aligned}$$

Mediante el software Arlequin también se realizó el cálculo de la matriz  $F_{st}$  y el test exacto de diferenciación poblacional, a partir de la comparación de las frecuencias alélicas de 7 X-STR, entre los mestizos de Nicaragua y las poblaciones (individuos varones) de Antioquia (Colombia), Costa Rica, Buenos Aires (Argentina), Sao Paulo (Brasil), Cantabria, Galicia (Gusmao *et al.* 2009), hispanos y asiáticos de EEUU (Gomes *et al.* 2007b), Taiwan (Hwa *et al.* 2009), noreste de España (García *et al.* 2011), Uganda, Mozambique y Angola (Gomes *et al.* 2007a) en base a las frecuencias alélicas de los loci X-STR. Dado que para las poblaciones africanas e hispana los loci DXS9902, DXS7133 y GATA31E08 no fueron analizados, no se tuvieron en cuenta para los cálculos. Utilizando la matriz de distancias de los valores  $F_{st}$  se construyó un árbol con el método *neighbor-joining* (Saitou y Nei 1987) implementado en el paquete de programas PHYLIP versión 3.69 (Felsenstein 2005), y se visualizó mediante el software TreeView 1.6.6 (Page 1996).

#### 9.4. STRs autosómicos

Las frecuencias alélicas y otros parámetros usados comúnmente en la práctica forense fueron obtenidos mediante el programa PowerStats 1.2 (Tereba 1999). La heterozigosidad observada y esperada, y el test exacto sobre el equilibrio HW fueron obtenidos usando el software Arlequin v3.5.1.2.

Por otro lado se calculó la proporción de mezcla genética basada en 15 STRs autosómicos mediante el software Admix 2.0 (Dupanloup y Bertorelle 2001). Para ello se incluyeron las poblaciones de España (Camacho *et al.* 2007), amerindios de México (Barrot *et al.* 2005), y Guinea ecuatorial (Alves *et al.* 2005) junto con Angola (Beleza *et al.* 2004) como poblaciones ancestrales.

Las proporciones de mezcla y sus desviaciones estándar fueron estimadas mediante 100.000 iteraciones *bootstrap*. Este programa puede computar el estimador  $mY$ , inicialmente descrito por Bertorelle y Excoffier (1998), y

extenderlo a cualquier número de poblaciones parentales (Dupanloup y Bertorelle 2001). Este parámetro tiene en cuenta las frecuencias de los diferentes alelos como también el grado de divergencia molecular entre ellos. En el caso de los marcadores multilocus, esta aproximación es solo posible cuando todos los loci tienen aproximadamente la misma tasa de mutación (Bertorelle y Excoffier 1998). Debido a que los 15 STRs autosómicos analizados en el presente estudio no tienen un ratio de mutación similar (*Short Tandem Repeat DNA Internet DataBase*, [www.cstl.nist.gov/strbase/](http://www.cstl.nist.gov/strbase/)), se han calculado los coeficientes de mezcla para tres clases de loci con similares tasas de mutación, separadamente: a) TH01 y TPOX; b) D8S1179, D7S820, D3S1358, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, D5S818, D21S11, CSF1PO, and vWA; c) D18S51 y FGA. Finalmente, se obtuvo una estimación final a partir de la media obtenida de las tres clases, teniendo en cuenta el número de loci en cada clase.



## RESULTADOS

### 1. Cuantificación de ADN

Los resultados de cuantificación proporcionaron un rango variable de ADN de 0,298-4,952 ng/ $\mu$ l. En ningún caso se observó inhibición durante la cuantificación de las muestras objeto de estudio.

### 2. ADN mitocondrial

#### 2.1. Análisis de las secuencias de la región control (HVS I y HVS II) del ADNmt

En el presente estudio se han analizado los segmentos HVS I y HVS II de la región control de un total de 165 muestras de la población mestiza de Nicaragua. Debido a la obtención de secuencias inconclusas, dos muestras fueron descartadas, siendo por lo tanto el total de secuencias obtenidas de 163.

El segmento HVS I fue secuenciado y editado entre las posiciones 16024 y 16365, mientras que el segmento HVS II, entre las posiciones 60 y 340, ambas inclusive en todos los casos. Sin embargo, para facilitar los análisis comparativos interpoblacionales, se consideró el rango 16056-16365 de la región HVS I.

Debido a que las inserciones localizadas en las regiones homopoliméricas de citosinas de los segmentos HVS I y HVS II carecen de interés filogenético, no fueron incluidas en los análisis estadísticos.

Los haplotipos de ADNmt de las regiones HVS I y HVS II de las muestras analizadas se muestran en el Anexo 1.

##### 2.1.1. Análisis de HVS I

En la muestra poblacional de Nicaragua (N=163) se obtuvieron 63 haplotipos de HVS I diferentes (teniendo en cuenta el rango de posiciones 16024-16365). Como se ha comentado anteriormente no se tuvieron en cuenta las inserciones en el tracto homopolimérico de citosinas de HVS I, por lo que no se incluyeron en los análisis.

Los haplotipos más frecuentes y su frecuencia se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Haplotipos de la región HVSI más frecuentes en la muestra analizada y su frecuencia.

HAPLOTIPO HVSI	N
16111T 16187T 16223T 16290T 16319A 16362C	31
16111T 16223T 16290T 16319A 16362C	16
16183C 16189C 16217C	12
16111T 16223T 16290T 16299G 16319A 16362C	12

El segmento HVSI resultó tener 69 posiciones polimórficas, entre las cuales las más variables fueron 16111, 16183, 16187, 16189, 16217, 16223, 16290, 16299, 16319 y 16362.

El tracto homopolimérico de la región HVSI rico en citosinas se encuentra entre las posiciones 16184 y 16193. En casi todos los casos se han observado heteroplasmas de longitud en esta región cuando la posición 16189 presenta la transición T→C, resultando en una serie de 10Cs ininterrumpidas (Bendall y Sykes 1995). Esta mutación facilita la incorporación de citosinas por parte de la ADN polimerasa, y en gran parte de los casos resulta en heteroplasma de longitud (Hauswirth y Clayton 1985; Lee *et al.* 2004; Santos *et al.* 2005).

En la presente muestra de Nicaragua (N=163) se han obtenido 43 secuencias con la transición T→C en la posición 16189. De estas secuencias 31 presentaron heteroplasma de longitud, entre las cuales 4 exhibieron solo la transición T16189C, 19 presentaron además la transversión A16183C, y otras 8 además de A16183C y T16189C mostraron la transversión A16182C.

Sin embargo, 11 secuencias con las transiciones C16187T y T16189C, así como 1 con la transición T16189C, no mostraron heteroplasma de longitud. Estos resultados indicarían que la inestabilidad de la región poli-C del segmento HVSI no está exclusivamente ligada a la transición T16189C.

En el análisis de las secuencias HVSI con la herramienta de EMPOP no se observó ninguna posición no plausible.

### 2.1.2. Análisis de HVSII

Sin tener en cuenta las inserciones de citosinas en el tracto homopolimérico de la región HVSII, se encontraron 53 haplotipos diferentes.

El haplotipo más frecuente fue 64T, 73G, 146C, 153G, 235G y 263G con una frecuencia de 71 individuos.

El segmento HVSII resultó tener 50 posiciones polimórficas, entre las cuales las más variables fueron la 64, 146, 152, 153, y 235.

El análisis de plausibilidad de secuencia de HVSII realizado con la herramienta de EMPOP determinó que la inserción 189.1A y la delección de 3 citosinas en 306d no se han observado en la base de datos. La posición 189 se considera

un punto caliente de mutación (*mutational hotspot*) (Malyarchuk *et al.* 2002), mientras que la posición 306 se encuentra dentro del tracto homopolimérico de citosinas de la región HVSII, por lo que la ocurrencia de inserciones y deleciones en esta región es frecuente.

Tres individuos pertenecientes al haplogrupo A2 mostraron la deleción de 6 pb entre las posiciones 106-111. Esta deleción se ha observado en grupos Chibcha dentro del haplogrupo A (Kolman *et al.* 1995; Santos *et al.* 1994) y en el grupo Aymara de Chile dentro del haplogrupo D (Merriwether 1993).

### 2.1.3. Análisis conjunto de HVSI y HVSII

Cuando se tuvieron en cuenta las dos regiones hipervariables se obtuvieron 89 haplotipos diferentes en la muestra de Nicaragua. El haplotipo más observado fue 16111T, 16187T, 16223T, 16290T, 16319A, 16362C en HVSI, y 64T, 73G, 146C, 153G, 235G y 263G en HVSII, presente en 26 individuos.

## 2.2. Parámetros de diversidad del ADNmt de la población mestiza de Nicaragua

En este apartado se muestran los valores de diversidad haplotípica (H) y nucleotídica ( $\pi$ ) para cada una de las regiones hipervariables y las mismas para las regiones conjuntamente (Tabla 14).

Tabla 14. Diversidad haplotípica (H) y nucleotídica ( $\pi$ ) para cada región hipervariable del ADNmt y ambas regiones conjuntamente.

Región hipervariable	Diversidad haplotípica (H)	Diversidad nucleotídica ( $\pi$ )
HVSI	0,9414 $\pm$ 0,0108	0,0165 $\pm$ 0,0088
HVSII	0,7991 $\pm$ 0,0330	0,0128 $\pm$ 0,0072
HVSI+HVSII	0,9646 $\pm$ 0,0091	0,0148 $\pm$ 0,0076

La diversidad haplotípica resultó mayor en la región HVSI (0,9414  $\pm$  0,0108) que en HVSII (0,7991  $\pm$  0,0330). Por otro lado, como es de esperar, cuando se analizan las dos regiones conjuntamente el valor de diversidad haplotípica fue superior al estimado para las regiones por separado (0,9646  $\pm$  0,0091). En cuanto a la diversidad nucleotídica, ésta también fue mayor para el segmento HVSI (0,0165  $\pm$  0,0088). Cuando se combinan ambos segmentos el valor resultó ser intermedio al de cada segmento por separado (0,0148  $\pm$  0,0076).

### 2.3. Diferencias entre pares de nucleótidos y parámetros de interés forense

El parámetro de diversidad conocido como número promedio de diferencias entre pares de nucleótidos (*Mean number of pairwise differences*) representa el número medio de diferencias nucleotídicas encontradas entre las secuencias de una población, y por lo tanto la diversidad de los haplotipos de una población. Cuanto más variables sean las secuencias de una población, menor será la probabilidad de que dos secuencias escogidas aleatoriamente sean idénticas. Esta probabilidad se conoce como probabilidad de coincidencia al azar (PC). Por otro lado, el poder de discriminación (PD), calculado como la inversa de PC, se refiere a la capacidad de discriminación entre dos secuencias. Ambos parámetros son parámetros “a priori” que evalúan la eficiencia del marcador genético en cuestión y son de gran utilidad en genética forense.

En la Tabla 15 se muestran los valores de diferencias promedio entre pares de nucleótidos, la probabilidad de coincidencia al azar y el poder de discriminación para cada uno de los segmentos HVSI y HVSII, así como para el conjunto de ambos.

Tabla 15. M = número de diferencias promedio entre pares de nucleótidos; PC = probabilidad de coincidencia al azar; PD = poder de discriminación.

Nicaragua	M	PC	PD
HVSI	5,636 ± 2,718	0,064	0,935
HVSII	3,621 ± 1,845	0,206	0,794
HVSI+HVSII	9,257 ± 4,276	0,041	0,959

El número de diferencias promedio entre pares de nucleótidos para el segmento HVSI fue mayor que para HVSII (5,636 ± 2,718 y 3,621 ± 1,845, respectivamente). Por otro lado, como cabe esperar, el número de diferencias promedio fue superior cuando se tuvieron en cuenta ambos segmentos (9,257 ± 4,276).

En cuanto a PC, observamos que fue mayor en el segmento HVSII (0,206) que en el segmento HVSI (0,064), dado su menor grado de polimorfismo. Cuando se tuvieron en cuenta ambas regiones, el valor de PC disminuye (0,041).

El PD de los segmentos, a raíz de los resultados anteriores, resultó mayor en la región HVSI (0,935) que en la HVSII (0,794). Mientras que al analizar ambos fragmentos conjuntamente el PD fue de 0,959.

## 2.4. Distribución *mismatch*

En el gráfico 1 se muestra la distribución *mismatch* para cada región hipervariable por separado y para ambas en conjunto.

La distribución en todos los segmentos parece ser bimodal, aunque HVSII tiende hacia la multimodalidad. El fragmento HVS I tendría su moda en 2 y 9 diferencias, HVSII en 0 y 5, y ambos segmentos juntos resultan en modas de 2-4 y 15 diferencias.

El mayor número de diferencias observadas entre pares de haplotipos es de 18 para HVS I, 24 para HVSII y de 39 para ambos segmentos juntos.

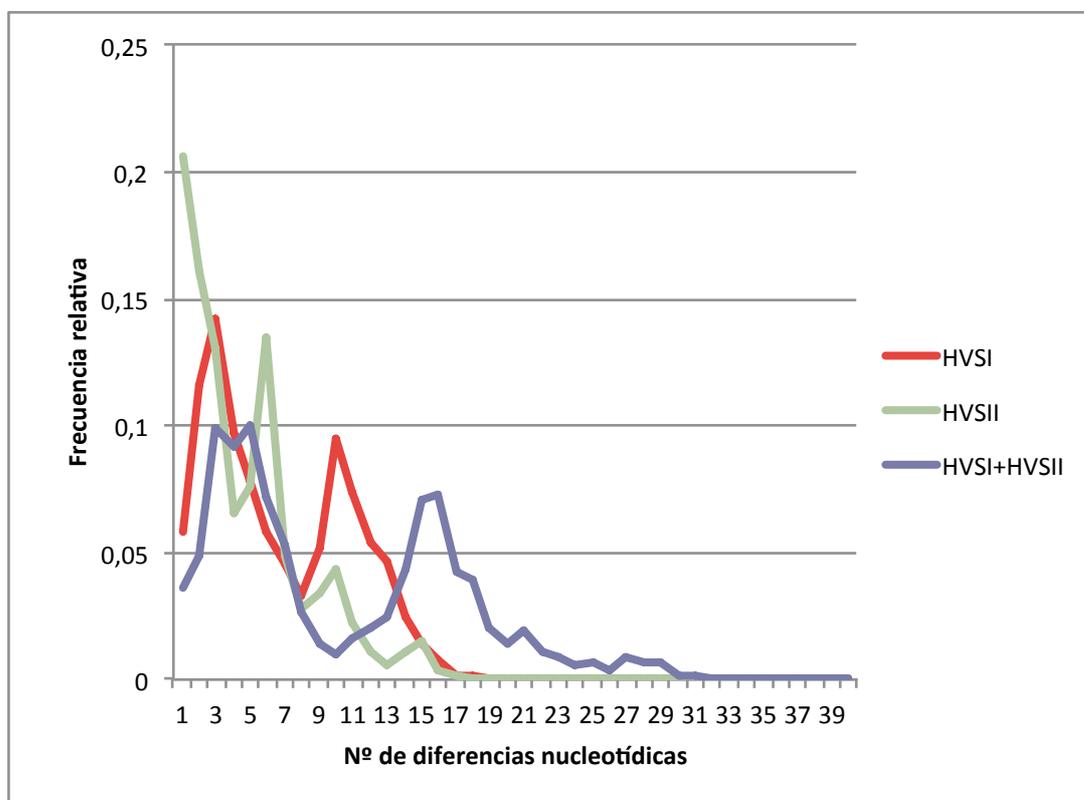


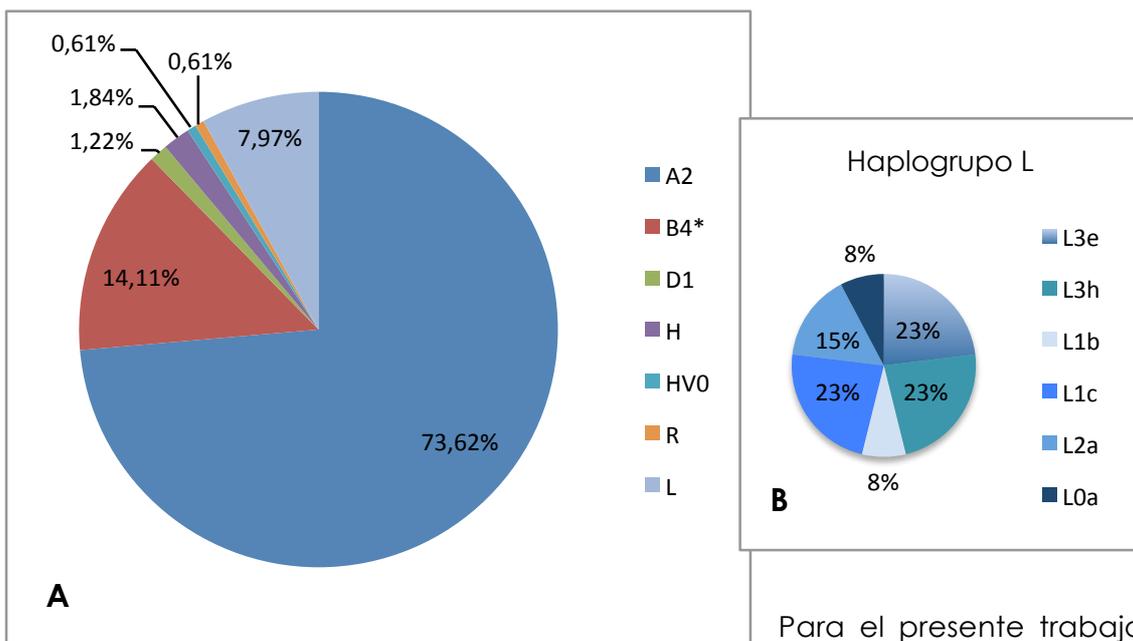
Gráfico 1. Distribución de las diferencias entre pares de nucleótidos del ADNmt de la población mestiza de Nicaragua. Se muestran los resultados para HVS I, HVS II y HVS I junto con HVS II. El valor  $D$  de Tajima para ambas regiones hipervariables (HVS I/II) fue de  $-1,66$  ( $P = 0,01$ ), mientras que el valor  $F_s$  de  $F_u$  fue de  $-24,36$  ( $P = 0$ ). Al ser valores negativos se interpretarían como señal de selección purificadora o expansión demográfica. La región conjunta HVS I/II dio un valor de tau de  $1,12$ , lo cual indicaría un suceso de expansión poblacional reciente.

## 2.5. Composición de haplogrupos

El haplogrupo más frecuente en la muestra de Nicaragua fue el haplogrupo nativo americano A2 (73,62%) (A, Figura 10), seguido del haplogrupo B4\* (14,11%). Los haplotipos clasificados dentro del haplogrupo B podrían ser considerados pertenecientes al común subclado nativo americano B2 (Achilli *et al.* 2008), pero debido a que no se han tipado las posiciones codificantes que lo determinan, se clasificarán como haplogrupos B4\*.

El haplogrupo nativo americanos D1 también se ha observado pero con una frecuencia muy baja (1,22%). Otros linajes nativo americanos como C1, X2a y D4h3 (Perego *et al.* 2009; Tamm *et al.* 2007) están ausentes en la muestra de Nicaragua.

En cuanto a linajes no nativo americanos, se han observado en bajas frecuencias los haplogrupos L (7,97%), H (1,84%), HV0 (0,61%), R (0,61%) (A, Figura 10). Dentro del haplogrupo L se observaron los sublinajes L0a (8%), L1b (8%), L1c (23%), L2a (15%), L3e (23%), y L3h (23%) (B, Figura 10). Estos últimos haplogrupos no fueron considerados en los análisis posteriores.



Para el presente trabajo se recopilaron las secuencias HVSI de diferentes poblaciones americanas de la literatura. La figura 10 muestra la frecuencia de los haplogrupos americanos para cada población clasificada según el área continental correspondiente.

Las frecuencias de los haplogrupos nativo americanos en la muestra poblacional de Nicaragua concuerdan con el patrón americano observado.

Como se puede observar en la figura 11, el haplogrupo A2 muestra una amplia distribución en todo el continente. Frecuencias similares a la observada para la población mestiza de Nicaragua se pueden observar en casi todas las poblaciones utilizadas en el análisis, de Norte y Centroamérica. En cuanto a Sudamérica, con la excepción de las poblaciones de Colombia (67%), los

Waorani de Ecuador (93,3%), y los Guahibo de Venezuela (47,4%), la mayoría de poblaciones presentan unas frecuencias del haplogrupo A2 bajas (<37%).

El haplogrupo B\* se encuentra con baja frecuencia en Nicaragua (14,11%), así como en la mayoría de poblaciones de Norteamérica y Centroamérica. En el Norte se observa con elevada frecuencia en la población Yakima (67,5%) y Navajo (43,8%) y Necoxtla de México (52%), mientras que en el resto de poblaciones es menor del 33% y en algunas está ausente (Aleuts, Haida, Zitlala). En Centroamérica el patrón es similar siendo la frecuencia más alta para la población Embera (52,3%), para el resto de poblaciones es menor del 32%, y estaría ausente en la población Huetar de Costa Rica. En cambio, en las poblaciones sudamericanas recopiladas, la frecuencia de este haplogrupo es en general elevada. A excepción de Colombia, Guahibo, Waorani, Yanomami y Araucarian, el resto de poblaciones presenta frecuencias del 32 al 90%.

En cuanto al tercer haplogrupo nativo americano C1, en Norteamérica las frecuencias son bajas excepto en las poblaciones mexicanas Tarahumara (78,6%) y Pima (85,5%). Por otro lado, en Centroamérica la frecuencia observada en la población Wounan de Panamá no alcanza el 50%, y aún son menores en la población Embera (25%), Cuba (16%) y El Salvador (2,3%). Este haplogrupo está ausente en la población de Nicaragua (presente estudio) y las poblaciones Chibcha parlantes Huetar, Kuna y Ngöbé. Respecto a Sudamérica, C1 presenta su mayor frecuencia en la población Yanomami (63,2%), mientras que en las demás poblaciones varía del 49 (Guahibo) al 4,5% (San Martín) o esta ausente (Waorani y Ache).

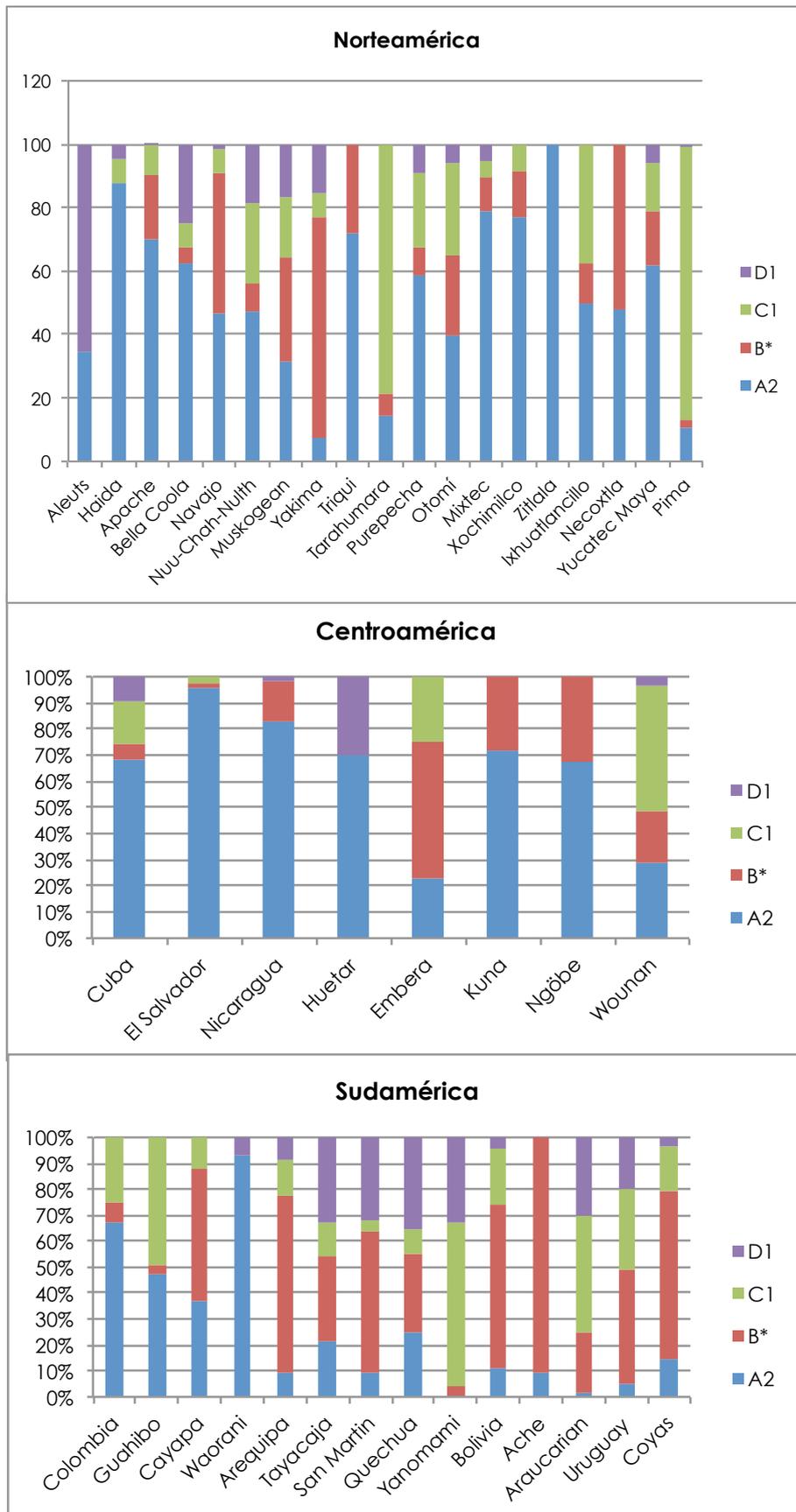


Figura 11. Frecuencia de los haplogrupos nativo americanos observados en las poblaciones americanas recopiladas para el presente estudio y clasificadas según el área continental correspondiente (Norte, Centro y Sudamérica).

Finalmente, el haplogrupo D1 parece presentar un patrón discontinuo de frecuencias. En Nicaragua está casi ausente (1,22%) al igual que en las poblaciones mexicanas y de Centroamérica. En Norteamérica la mayor frecuencia se observa entre los Aleuts (65,6%) y decrece hacia el sur, mientras que en Sudamérica no se observa en Colombia, Venezuela (Guahibo) y Ecuador (Cayapa) y en el resto las frecuencias son moderadas/bajas (32,7-3,7%).

### 2.6. Red promedio (*Median-joining network*)

La figura 12 muestra la red promedio obtenida de las secuencias HVSI y HVSII de la población mestiza de Nicaragua, y los haplogrupos amerindios correspondientes.

La red promedio resultó en varias reticulaciones, es decir, rutas filogenéticas alternativas que conectan los haplotipos observados, debido al fenómeno de homoplasia (Salas 2007), sobre todo entre los haplotipos A2 (Figura 12).

El haplogrupo A2 de la población de Nicaragua estudiada muestra una filogenia de forma estrellada. La raíz se encuentra en las posiciones diagnósticas C16111T, T16223C, C16290T, G16319A, y T16362C en la región HVSI, y C64T, A73G, T146C, A153G, A235G, y A263G en la región HVSII (1 en Figura 12), haplotipo presente en 16 individuos de la muestra.

El haplotipo referido en la figura 12 como 2 es el más frecuente en la muestra nicaragüense (31 individuos) e incluye C16111T, C16187T, T16223C, C16290T, G16319A, T16362C, C64T, A73G, T146C, A153G, A235G, y A263G. Por otro lado, el haplotipo 3 (Figura 12) presente en 12 individuos C16111T, T16223C, C16290T, A16299G, G16319A, T16362C, C64T, A73G, T146C, A153G, A235G, y A263G.

### 2.7. Comparación de HVSI de las secuencias de origen amerindio de Nicaragua con la de diversas poblaciones americanas

Los resultados estadísticos en relación a la diversidad de secuencia de la región HVSI del ADNmt, teniendo en cuenta el rango de posiciones 16056 a 16365, para la muestra de Nicaragua y el resto de poblaciones americanas estudiadas se muestran en la Tabla 16.

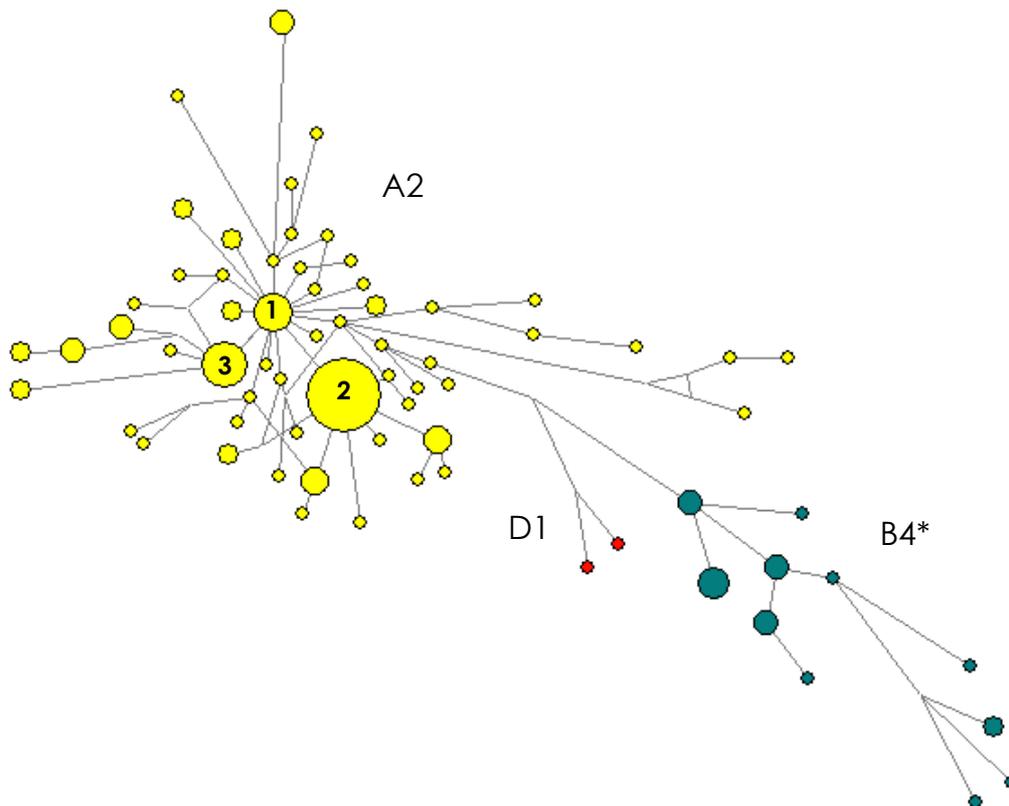


Figura 12. Red promedia resultante para los haplogrupos amerindios identificados en la población mestiza de Nicaragua en base a los segmentos HVSI y HVSII del ADNmt. El tamaño de los nodos es proporcional al número de individuos. Los nodos indicados con números representan los haplotipos: 1) C16111T, T16223C, C16290T, G16319A, T16362C, C64T, A73G, T146C, A153G, A235G, y A263G; 2) C16111T, C16187T, T16223C, C16290T, G16319A, T16362C, C64T, A73G, T146C, A153G, A235G, y A263G; 3) C16111T, T16223C, C16290T, A16299G, G16319A, T16362C, C64T, A73G, T146C, A153G, A235G, y A263G. En amarillo se representan los linajes del haplogrupo A2, en verde de B4\* y en rojo de D1.

Los valores de diversidad mostrados en la Tabla 16, muestran un rango variable de diversidad del ADNmt. Esta variabilidad debe entenderse teniendo en cuenta la naturaleza de las poblaciones estudiadas, ya que por ejemplo algunas corresponden a poblaciones nativo americanas, las cuales podrían haber pasado por cuellos de botella ancestrales.

Los valores de diversidad haplotípica, nucleotídica y número medio de diferencias entre pares de bases de la población nicaragüense estudiada fueron de 0,960 ( $\pm 0,011$ ), 0,014 ( $\pm 0,008$ ) y 4,52 ( $\pm 2,23$ ), respectivamente. Estos valores muestran una elevada diversidad genética del ADNmt de la población mestiza de Nicaragua, similar a la de otras poblaciones americanas (Tabla 16). Sin embargo, comparando la diversidad del ADNmt de la población mestiza de Nicaragua con la de otras poblaciones mestizas americanas estudiadas y de la literatura, la diversidad de la población mestiza de Nicaragua, teniendo

en cuenta el número medio de diferencias entre pares de nucleótidos (M), resulta ser menor. Con excepción de El Salvador, la población mestiza de Nicaragua presenta una diversidad menor que la de poblaciones mestizas como Cuba, Bolivia, Uruguay (Tabla 16), Colombia (Salas *et al.* 2008), Argentina (Bobillo *et al.* 2010) y México (Guardado-Estrada *et al.* 2009).

### 2.8. Análisis AMOVA

Todas las poblaciones americanas utilizadas en el presente estudio se clasificaron según tres regiones geográficas (grupos) principales: Norte, Central y Sur.

El análisis AMOVA mostró que el 22,87% de la variabilidad se encuentra entre poblaciones dentro de los grupos geográficos. Por otro lado, un 72,65% de la variabilidad se observa dentro de las poblaciones, y un 4,48% entre los grupos. Estos resultados indican una heterogeneidad genética en las tres regiones subcontinentales y una carencia de estructura continental.

### 2.9. Estimación del origen geográfico

Con el objetivo de obtener una aproximación sobre el origen geográfico de los linajes de ADNmt nicaragüenses a una escala continental, se compararon los haplotipos de ADNmt de Nicaragua (únicamente las secuencias con haplogrupo nativo americano) con las de 40 poblaciones americanas, clasificadas según tres regiones geográficas principales: a) Norteamérica (N =1136), Centroamérica (N =378) y Sudamérica (N =835).

Tabla 16. Parámetros de diversidad de las poblaciones americanas estudiadas, considerando el rango de secuencia 16056-16365 de la región HVSI del ADNmt.

Población	N	k	H (s.d)	n (s.d)	M (s.d)
NORTEAMÉRICA					
Aleuts	163	14	0.737 (0.034)	0.010 (0.006)	3.18 (1.65)
Triqui	107	15	0.550 (0.056)	0.014 (0.008)	4.49 (2.23)
Tarahumara	15	7	0.771 (0.100)	0.005 (0.003)	1.54 (0.97)
Purepecha	34	23	0.973 (0.014)	0.020 (0.011)	6.37 (3.10)
Otomí	68	32	0.966 (0.008)	0.021 (0.011)	6.60 (3.15)
Mixtec	19	10	0.824 (0.083)	0.011 (0.007)	3.60 (1.90)
Xochimilco	35	21	0.930 (0.034)	0.016 (0.010)	5.07 (2.52)
Zitlala	14	5	0.600 (0.144)	0.004 (0.003)	1.41 (0.91)
Ixhuatlancillo	10	8	0.955 (0.060)	0.024 (0.014)	7.42 (3.80)
Necoxtla	25	14	0.910 (0.043)	0.020 (0.011)	6.24 (3.06)
Yucatec Maya	52	20	0.922 (0.021)	0.020 (0.010)	5.86 (2.84)
Pima	98	8	0.553 (0.056)	0.010 (0.006)	3.06 (1.61)
Nuu-Chah-Nulth	63	28	0.954 (0.012)	0.020 (0.010)	5.30 (2.60)
Haida	40	9	0.700 (0.062)	0.007 (0.004)	2.30 (1.30)
Bella Coola	40	11	0.904 (0.020)	0.016 (0.010)	5.00 (2.50)
Navajo	120	33	0.900 (0.020)	0.020 (0.010)	6.00 (3.00)
Apache	144	25	0.720 (0.040)	0.013 (0.010)	4.16 (2.10)
Poblaciones Muskogean	48	27	0.965 (0.012)	0.010 (0.006)	3.04 (1.61)
Yakima	41	19	0.890 (0.033)	0.015 (0.008)	4.83 (2.41)
CENTROAMÉRICA					
Nicaragua	145	81	0.960 (0.011)	0.014 (0.008)	4.52 (2.23)
El Salvador	86	50	0.960 (0.012)	0.010 (0.005)	2.80 (1.50)
Cuba	81	39	0.970 (0.010)	0.020 (0.010)	5.62 (2.72)
Huetar	27	7	0.710 (0.070)	0.011 (0.007)	3.50 (1.84)
Embera	44	20	0.942 (0.021)	0.018 (0.010)	5.54 (2.71)
Wounan	31	14	0.912 (0.030)	0.020 (0.010)	6.26 (3.05)
Ngöbe	46	7	0.763 (0.040)	0.014 (0.007)	4.26 (2.15)
Kuna	63	7	0.600 (0.060)	0.010 (0.006)	3.30 (1.72)
SUDAMÉRICA					
Colombia	109	14	0.900 (0.016)	0.015 (0.010)	4.80 (2.35)
Guahibo	59	12	0.860 (0.022)	0.016 (0.010)	4.98 (2.45)
Cayapa	120	13	0.780 (0.030)	0.016 (0.010)	5.01 (2.45)
Waorani	30	2	0.130 (0.080)	0.003 (0.002)	0.90 (0.64)
Arequipa	22	18	0.980 (0.021)	0.016 (0.010)	4.96 (2.50)
Tayacaja	60	41	0.970 (0.015)	0.020 (0.010)	5.90 (2.86)
San Martín	21	14	0.933 (0.040)	0.016 (0.010)	5.06 (2.55)
Quechua	22	21	0.996 (0.015)	0.023 (0.012)	7.06 (3.45)
Yanomami	50	23	0.820 (0.055)	0.012 (0.007)	3.68 (1.90)
Bolivia	106	63	0.954 (0.013)	0.020 (0.011)	6.27 (3.00)
Ache	63	3	0.204 (0.064)	0.003 (0.002)	1.10 (0.72)
Araucarian	72	41	0.973 (0.010)	0.020 (0.010)	5.36 (2.62)
Uruguay	41	36	0.993 (0.007)	0.021 (0.011)	6.67 (3.21)
Coyas	60	48	0.990 (0.006)	0.020 (0.011)	6.31 (3.04)

N= tamaño poblacional; k= número de haplotipos diferentes; H= diversidad haplotípica;  $\pi$ = diversidad nucleotídica; M= número medio de diferencias entre pares de bases.

La distribución de las secuencias nativo americanas nicaragüenses podría ser descrita como perteneciente a:

Origen geográfico	%	s.d (%)
Norteamérica	32,83	4,7
Centroamérica	55,24	4,9
Sudamérica	11,93	3,2

Las proporciones promedio de las secuencias de Nicaragua encontradas en cada región geográfica pueden utilizarse como una aproximación para inferir la relación de esta población dentro del continente.

Del mismo modo se calculó la aproximación al origen geográfico clasificando las poblaciones según otro criterio: Norteamérica, Mesoamérica y Sudamérica. Considerando Mesoamérica como una entidad cultural, la cual incluye Centroamérica y México. De este modo, la distribución de las secuencias nativo americanas nicaragüenses podría ser descrita de la forma siguiente:

Origen geográfico	%	s.d (%)
Norteamérica	8,98	2,8
Mesoamérica	79,08	4
Sudamérica	11,93	3,2

Cuando se tiene en cuenta la clasificación Norte, Centro y Sudamérica, el conjunto de secuencias de ADNmt de Nicaragua muestra una relación más cercana con las poblaciones centroamericanas (55,24%). Sin embargo, cuando se tiene en cuenta la segunda clasificación, el 79,08% de los linajes de ADNmt de la población mestiza de Nicaragua podrían ser adscritos a Mesoamérica.

En total, 19 haplotipos de la región HVSI de la población de Nicaragua han sido observados en la base de datos de poblaciones americanas recopilada, lo que representa un 30,15% del total de haplotipos HVSI encontrados en la muestra de Nicaragua.

El haplotipo HVSI nicaragüense más observado entre las poblaciones americanas fue el haplotipo 1 (Tabla 17 y 1 en Figura 12). Tomando la segunda clasificación mencionada anteriormente, este haplotipo se observó mayoritariamente entre las poblaciones mesoamericanas, seguido de las norteamericanas y con menor frecuencia en Sudamérica.

Tabla 17. Haplotipos de la región HVSI de la población mestiza de Nicaragua (N=145) que se han observado entre las poblaciones americanas recopiladas de Norteamérica (N=659), Mesoamérica (N=855) y Sudamérica (N=835).

ID	Haplotipo	Nicaragua	Norteamérica	Mesoamérica	Sudamérica
1	16111T 16223C 16290T 16319A 16362C	16	86	177	14
2	16223T 16325C 16362C	1	11	9	20
3	16111T 16189C 16223T 16290T 16319A 16362C	1	2	11	25
4	16183C 16189C 16217C	12	7	3	20
5	16111T 16209C 16223T 16290T 16319A 16362C	1	1	1	0
6	16223T 16290T 16319A 16362C	2	0	17	24
7	16182C 16183C 16189C 16217C	2	0	23	5
8	16093C 16182C 16183C 16189C 16217C	1	0	1	0
9	16111T 16223T 16290T 16311C 16319A 16362C	2	0	3	3
10	16111T 16187T 16189C 16223T 16290T 16319A 16362C	5	0	2	0
11	16223T 16240G 16290T 16319A 16362C	1	0	1	0
12	16111T 16187T 16223T 16290T 16319A 16362C	31	0	26	0
13	16111T 16182C 16183C 16189C 16223T 16290T 16319A 16362C	2	0	7	0
14	16111T 16187T 16209C 16223T 16290T 16319A 16362C	4	0	1	0
15	16111T 16223T 16290T 16299G 16319A 16362C	12	0	5	0
16	16111T 16223T 16290T 16319A 16360T 16362C	1	0	19	0
17	16111T 16223T 16290T 16300G 16319A 16362C	2	0	1	0
18	16111T 16126C 16223T 16290T 16319A 16362C	1	0	4	0
19	16111T 16193T 16223T 16290T 16319A 16362C	2	0	2	0
	Total	99	107	313	111

Los h2-4 y h6 también se han observado más de una vez entre las poblaciones americanas de todo el continente, aunque con una mayor frecuencia en Sudamérica (Tabla 17).

Ningún haplotipo de Nicaragua se ha observado únicamente en Norteamérica o Sudamérica. Sin embargo, varios haplotipos parecen observarse exclusivamente en Mesoamérica con diferentes frecuencias (h08 y h10-19). Específicamente, las poblaciones mesoamericanas que comparten haplotipos con Nicaragua son Otomí (h10 y 11), Maya (h10, 12 y 13) y Xochimilco (h12) de México, El Salvador (h12-17), Cuba (h12 y 18), Huetar (Costa Rica) (h16), y las poblaciones de Panamá Ngöbé (h12 y 16), Kuna (h16), Embera (h18) y Wounan (h18 y 19).

Cabe destacar que el h15, uno de los más frecuentes en la muestra de Nicaragua, que consta de una transversión en 16299 A→G únicamente se ha observado en El Salvador.

## 2.10. Análisis interpoblacional

Con el objetivo de comparar la población de Nicaragua con cada una de las poblaciones americanas recopiladas, se han estimado las distancias *F<sub>st</sub>* entre pares de poblaciones (Tabla 18).

Los valores más bajos de *Fst* fueron para Nicaragua y Mixtec (0,026), Xochimilco (0,03), Triqui (0,053) y Zitlala (0,063) de México; y Ngöbé (0,048) y El Salvador (0,038) de Centroamérica. Todos los valores sugieren heterogeneidad poblacional ya que presentan una significación  $p < 0,05$ , excepto el valor para Nicaragua y Mixtec ( $P = 0,063$ ). Sin embargo, el test exacto de diferenciación poblacional resultó en valores  $p < 0,05$  en todos los casos (datos no mostrados) confirmando la diferenciación genético poblacional entre Nicaragua y el resto de poblaciones.

Para visualizar mejor las distancias entre pares de poblaciones se realizó un análisis EMD (Figura 13). Como se puede observar en el EMD, no existe ningún agrupamiento diferencial entre las diversas poblaciones de Norte, Centro y Sudamérica (Figura 13). Nicaragua se encuentra cercana a las poblaciones anteriormente mencionadas, y en general, a poblaciones del norte y centro de América.

Tabla 18. Distancias *Fst* entre pares de poblaciones basadas en secuencias HVSI entre Nicaragua y las poblaciones americanas estudiadas. \*  $P=0,063$ .

Población	Nicaragua	Población	Nicaragua
Aleuts	0,308	Cuba	0,075
Haida	0,084	Huetar	0,103
Bella Coola	0,098	Embera	0,307
Nuu-Chah-Nulth	0,164	Wounan	0,303
Navajo	0,127	Ngobe	0,048
Apache	0,302	Kuna	0,201
Muskogean	0,383	Guahibo	0,233
Yakima	0,382	Colombia	0,105
Tarahumara	0,087	Ache	0,485
Pima	0,546	Cayapa	0,277
Purepecha	0,124	Waorani	0,344
Necoxtla	0,206	Arequipa	0,395
Xochimilco	0,03	Tayacaja	0,262
Otomi	0,178	San Martin	0,339
Ixhuatlancillo	0,178	Quechua	0,22
Triqui	0,053	Yanomami	0,512
Mixtec	0,026*	Bolivia	0,354
Maya	0,094	Araucarian	0,317
Zitlala	0,063	Coyas	0,35
El Salvador	0,038	Uruguay	0,357

Todas las poblaciones sudamericanas serían las más diferenciadas de Nicaragua, con valores de *Fst*  $>0,2$ , excepto Colombia que sería la más

cercana ( $F_{st} = 0,105$ ) (Tabla 18, Figura 13). En la figura 13 destacan las poblaciones Waorani, Ache, Yanomami y Pima por estar claramente diferenciadas del resto.

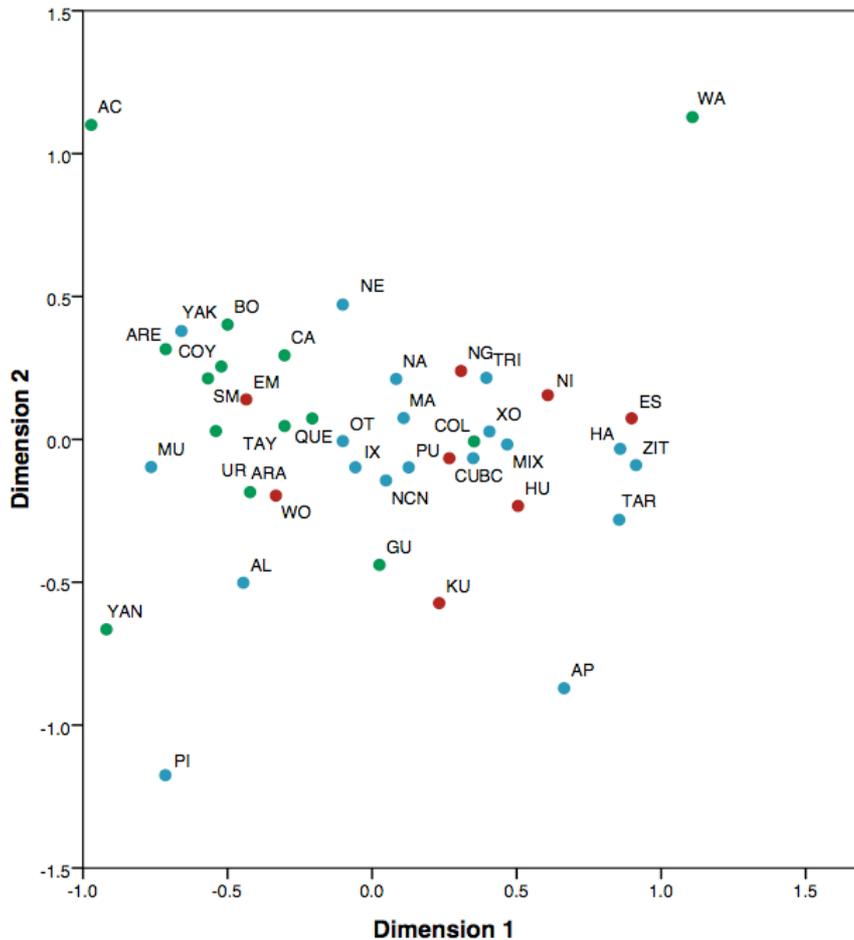


Figura 13. Análisis EMD de las distancias  $F_{st}$  de los haplotipos amerindios de ADNmt de las diversas poblaciones americanas estudiadas. AL=Aleut; HA=Haida; BC=Bella Coola; NCN=Nuu-Chah-Nulth; NA=Navajo; AP=Apache; MU=poblaciones Muskogean; YAK=Yakima; TAR=Tarahumara; PI=Pima; PU=Purepecha; NE=Necotla; XO=Xochimilco; OT=Otomí; IX=Ixhuatlancillo; TRI=Triqui; MIX=Mixtec; ZIT=Zitlala; MA=Maya; ES= El Salvador; CU=Cuba; NI=Nicaragua; HU=Huetar; EM=Embera; WO=Wounan; NG=Ngöbé; KU=Kuna; GU=Guahibo; COL=Colombia; AC=Ache; CA=Cayapa; WA=Waorani; ARE=Arequipa; TAY=Tayacaja; SM=San Martín; QUE=Quechua; YAN=Yanomami; ARA=Araucarian; BO=Bolivia; COY=Coyas; UR=Uruguay. Los colores indican la procedencia geográfica: Azul=Norteamérica; Rojo=Centroamérica; Verde=Sudamérica. Valor de estrés = 0.026.

### 3. Cromosoma Y

#### 3.1. Poder de discriminación por locus Y-STR

Las frecuencias alélicas de los 17 Y-STRs se muestran en el Anexo 4. El número de alelos y PD por locus, el cual muestra el grado de polimorfismo o diversidad por marcador, se muestra en la Tabla 19.

Tabla 19. Número de alelos y poder de discriminación (PD) por locus para una muestra de N= 165.

Locus	Nº alelos	PD
DYS19	5	0.64394
DYS389I	4	0.49798
DYS389II	7	0.69699
DYS390	6	0.64752
DYS391	5	0.56955
DYS392	8	0.67689
DYS393	5	0.52469
DYS385 a	8	0.76571
DYS385 b	11	0.75018
DYS438	6	0.72321
DYS439	4	0.66175
DYS437	4	0.56593
DYS448	5	0.68225
DYS456	6	0.66804
DYS458	8	0.77724
DYS635	7	0.68944
GATA H4	5	0.63319

El marcador DYS458 presenta el valor más alto de PD (0,77724), seguido de DYS385. Éste último incluye una duplicación génica por lo que se espera que sea el más polimórfico. Aunque la estimación de la diversidad ha sido calculada para cada loci de DYS385 por separado (a y b), ambos presentan valores elevados de diversidad. De acuerdo con su elevada diversidad, estos loci presentaron el mayor número de alelos (Tabla 19). Por otro lado, el locus DYS389I resultó ser el menos variable (PD = 0,49798).

### 3.2. Diversidad haplotípica

Del un total de 165 individuos mestizos de Nicaragua, se han obtenido 156 haplotipos distintos (basándose en 17 polimorfismos STR del cromosoma Y). Dichos haplotipos se muestran en el Anexo 3. Estos resultados se han incluido en la base de datos YHRD (Número de acceso: YA003692).

Entre los haplotipos encontrados en la muestra poblacional de mestizos nicaragüenses se han observado duplicaciones en 5 marcadores (DYS389I: 12, 13; DYS389II: 28, 29; DYS439: 11, 12; DYS448: 19, 20 y DYS19: 15, 16), las cuales se observan también en varias poblaciones de la base de datos YHRD. Cada una de estas duplicaciones se ha observado en un haplotipo, excepto la del marcador DYS19 que se presentó en 2 haplotipos distintos. Las duplicaciones en DYS389I y DYS389II forman parte del mismo haplotipo. Por otro lado, se ha observado la microvariante 17.2 en el marcador DYS458 en 8 haplotipos de la muestra (1 dentro del haplogrupo E y las 7 restantes dentro del haplogrupo J). Esta variante también se observa en la YHRD, principalmente en poblaciones europeas y semíticas.

Debido a que los loci Y-STR se encuentran en la región no recombinante del cromosoma Y, la diversidad por locus por sí misma no es necesariamente el valor más significativo para estimar el poder de discriminación (Budowle *et al.* 2005). En estos casos cobra mayor importancia la diversidad haplotípica. En la muestra de Nicaragua se ha obtenido una elevada diversidad haplotípica o poder de discriminación de  $0.9993 \pm 0.0008$ , dando lugar a un valor de 0.0007 de probabilidad de coincidencia al azar.

### 3.3. Composición de haplogrupos

La predicción realizada de los haplogrupos mediante los haplotipos de 17 Y-STRs proporcionó una primera aproximación a los linajes de cromosoma Y de la muestra de Nicaragua. El análisis posterior de los Y-SNPs que definen los principales haplogrupos de cromosoma Y confirmó esta predicción en todos los casos excepto en 8 ocasiones. Los resultados de la predicción de haplogrupo así como la confirmación del haplogrupo mediante el tipado de Y-SNPs se muestran en el Anexo 3.

La figura 14 (A) muestra la frecuencia de los haplogrupos encontrados en la muestra de Nicaragua tras el análisis de diversos Y-SNPs en varias reacciones multiplex.

La mayoría de linajes de cromosoma Y de la población mestiza de Nicaragua pueden clasificarse dentro del acervo genético euroasiático. El haplogrupo

predominante en la muestra fue R (47,24%), particularmente el sublinaje R1b-M343 (B, Figura 14).

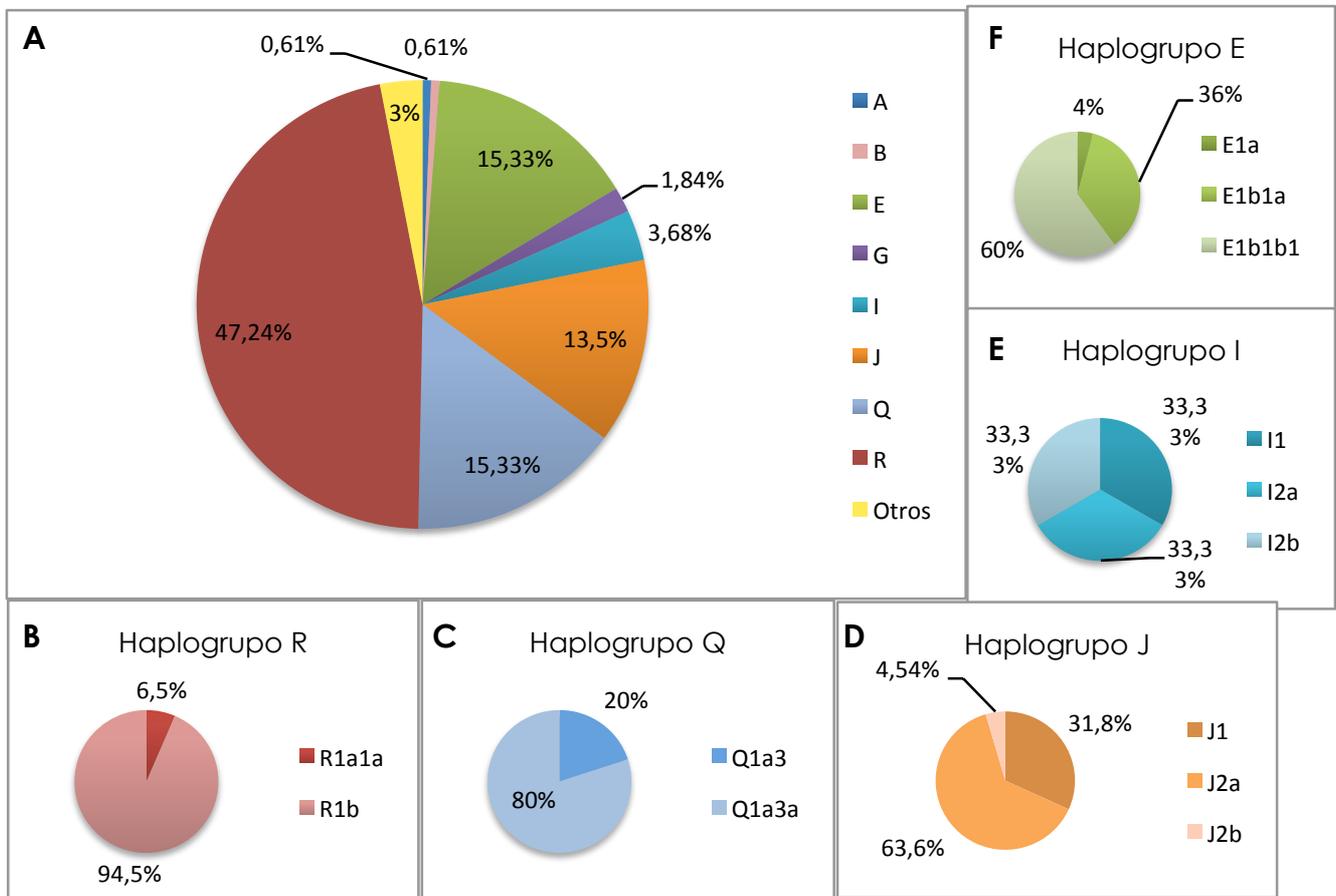


Figura 14. A) Frecuencia de los haplogrupos de cromosoma Y observados en la población mestiza de Nicaragua. B, C, D, E y F) Frecuencia de los sublinajes observados de los haplogrupos R, Q, J, I y E, respectivamente.

A esto le siguen otros haplogrupos euroasiáticos con menor frecuencia, J (13,5%), I (3,68%), G (1,84%), y otros (3%) (A, Figura 14). El haplogrupo J está formado principalmente por el sublinaje J2a (63,6%), seguido de J1 (31,8%) y J2b (4,54%) (D, Figura 14). El haplogrupo I se subdivide a su vez en I1, I2a y I2b, todos presentes en la misma proporción (33,3%) (E, Figura 14). El grupo de "otros" incluye 4 individuos KT-M9 derivado pero con el alelo ancestral para O-M175, PQR-M45, R-207, N-M231, pudiendo pertenecer a los haplogrupos K, L, M, S o T; y 1 individuo FT-M213 derivado pero con el alelo ancestral para KT-M9, DE-M145, I-M170, J-P209, y G-M201, pudiendo pertenecer al haplogrupo H. Dado que no se realizaron análisis más detallados en estos casos, estas muestras se han clasificado como "otros".

Por otro lado, se observó el haplogrupo nativo americano Q en un 15,33% del total de la muestra (A, figura 14), el cual se subdivide en Q1a3-M346 (20%) y su sublinaje Q1a3a-M3 (80%) (C, Figura 14). Finalmente, también se han observado los haplogrupos E (15,33%), A (0,61%) y B (0,61%) de origen africano principalmente (A, Figura 14). La muestra clasificada como haplogrupo A se

determinó por presentar el estado ancestral en todos los alelos analizados con el multiplex VII, mientras que la perteneciente al haplogrupo B presentó el alelo ancestral para los mismos alelos excepto para BT-M42. Dentro del haplogrupo E, los sublinajes observados han sido E1b1a-M2 (36%), E1b1b1-M35 (60%), y E1a (4%) (F, Figura 14).

### 3.4. Análisis interpoblacional

La matriz de distancias genéticas de valores  $F_{st}$  se muestra en la Tabla 20. Los valores  $F_{st}$  más bajos fueron para Nicaragua con las poblaciones mestizas de El Salvador ( $F_{st}=-0.03298$ ), Colombia ( $F_{st}=0.00198$ ), Illinois ( $F_{st}=0.00511$ ) y Ecuador ( $F_{st}=0.00934$ ), y amerindios de Argentina ( $F_{st}=0.00603$ ). Estos valores resultaron ser no significativos con un nivel de significación de  $p > 0.005$  (tras la corrección de Bonferroni). Sin embargo, el test de diferenciación poblacional resultó en valores de  $p < 0.005$  en todos los casos, sugiriendo diferenciación poblacional entre Nicaragua y las poblaciones analizadas (datos no mostrados).

Seguidamente las poblaciones europeas son las más afines a la población mestiza de Nicaragua (Tabla 20), en particular España con un valor de  $F_{st} = 0.01443$ . Más diferenciadas se encontrarían las poblaciones Kichwa de Ecuador ( $F_{st}=0.08134$ ) y Maya de Guatemala ( $F_{st}=0.1091$ ), seguidas de las poblaciones Árabe de Marruecos ( $F_{st}= 0.11682$ ), las poblaciones asiáticas de Taiwán ( $F_{st}=0.13056$ ) y China ( $F_{st}=0.13837$ ), la población Bereber de Marruecos ( $F_{st}=0.18541$ ) y finalmente, Guinea Bissau ( $F_{st}=0.19620$ ) y Angola ( $F_{st}=0.22053$ ).

El análisis EMD (Figura 15) muestran una cierta agrupación entre las poblaciones de las diferentes áreas geográficas. En el centro de la figura 15 quedarían las poblaciones europeas y americanas. Éstas últimas incluyen las poblaciones mestizas de Illinois, Colombia, El Salvador, Ecuador, y la población de Argentina. La población mestiza de Nicaragua quedaría incluida dentro de este grupo y cercana a las poblaciones europeas, en particular a España de acuerdo con el valor de distancia obtenido (Tabla 20).

Más alejadas quedarían agrupadas por un lado las poblaciones africanas Angola y Guinea-Bissau, y por otro las poblaciones árabe y bereber parlantes de Marruecos, ambos grupos claramente diferenciados entre ellos. Taiwán y China se observan agrupadas en el cuadrante superior derecho (Figura 15).

Tabla 20. Valores Fst entre Nicaragua y diversas poblaciones basadas en los haplotipos de 9 Y-STRs (debajo de la diagonal), y valores de significación (p) (encima de la diagonal).

	Nicaragua	El Salvador	Ecuador	Colombia	Illinois	Kichwa	Maya	Argentina	España	Italia	Alemania	UK	Francia	Árabe	Berber	Guinea Bissau	Angola	Taiwan	China
Nicaragua	0	0.99902	0.01172	0.11523	0.08984	0	0	0.02930	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
El Salvador	-0.03298	0	0.99902	0.99902	0.99902	0.99902	0	0.99902	0.99902	0	0	0	0.54590	0	0	0	0	0	0
Ecuador	0.00934	-0.03968	0	0.00293	0.14941	0	0	0.03223	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Colombia	0.00198	-0.03309	0.01128	0	0.10352	0	0	0	0.00098	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Illinois	0.00511	-0.03920	0.00428	0.00422	0	0	0	0.03223	0.00195	0	0.00098	0	0	0	0	0	0	0	0
Kichwa	0.08134	-0.00799	0.03996	0.08593	0.06936	0	0.00195	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Maya	0.10910	0.02917	0.07520	0.12069	0.11119	0.01457	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Argentina	0.00603	-0.04441	0.00789	0.01037	0.00880	0.04595	0.07506	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
España	0.01443	-0.00625	0.02178	0.00994	0.02054	0.12627	0.17107	0.03235	0	0	0	0.00488	0.05371	0	0	0	0	0	0
Italia	0.06278	0.02725	0.07599	0.06049	0.06320	0.13243	0.15767	0.06721	0.08175	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Alemania	0.02898	0.01359	0.04765	0.02395	0.03317	0.12339	0.16891	0.04306	0.04597	0.07252	0	0	0	0	0	0	0	0	0
UK	0.02740	0.01771	0.04393	0.02366	0.04166	0.15075	0.19275	0.04471	0.00855	0.09463	0.04290	0	0	0	0	0	0	0	0
Francia	0.02560	-0.00067	0.03604	0.01723	0.03231	0.14086	0.19483	0.04181	0.00573	0.09344	0.04410	0.00634	0	0	0	0	0	0	0
Árabe	0.11682	0.06176	0.12176	0.11821	0.09034	0.15880	0.20254	0.11714	0.16170	0.14851	0.14216	0.20691	0.18968	0	0.00684	0	0	0	0
Berber	0.18541	0.12226	0.17893	0.18119	0.15948	0.20457	0.25911	0.18420	0.22467	0.21562	0.21570	0.27134	0.25783	0.03334	0	0	0	0	0
Guinea Bissau	0.19620	0.14630	0.20896	0.17630	0.18508	0.21049	0.24085	0.19011	0.25276	0.19395	0.18355	0.27884	0.27123	0.23035	0.30314	0	0	0	0
Angola	0.22053	0.17895	0.24073	0.19551	0.21969	0.25863	0.28666	0.22956	0.26993	0.21631	0.21230	0.28935	0.28637	0.27230	0.34785	0.06643	0	0	0
Taiwan	0.13056	0.07001	0.12646	0.12177	0.11640	0.14613	0.17185	0.10513	0.15476	0.13761	0.15274	0.18204	0.17022	0.20847	0.29320	0.24290	0.29223	0	0.19434
China	0.13837	0.07580	0.12944	0.12568	0.11846	0.14437	0.17283	0.11087	0.16439	0.14197	0.15819	0.19212	0.18142	0.22395	0.31185	0.24153	0.29632	0.00165	0

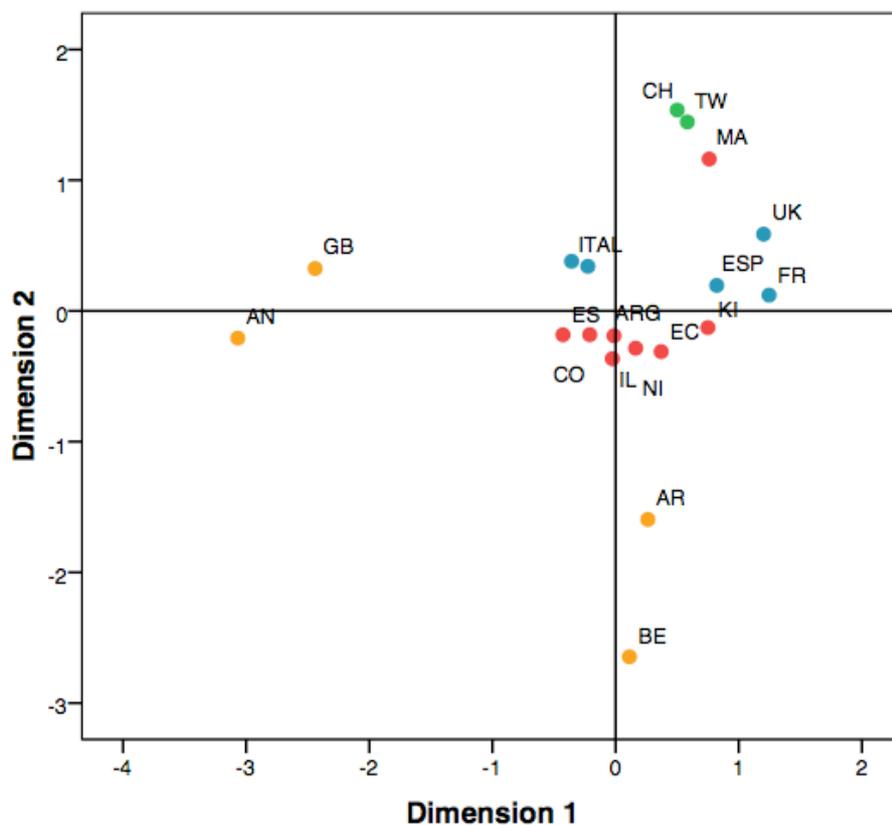


Figura 15. Análisis EMD de las distancias  $F_{st}$  de los haplotipos de Y-STRs entre poblaciones europeas (azul), africanas (naranja), americanas (rojo) y asiáticas (verde). ESP=España, IT=Italia, FR=Francia, AL=Alemania, UK=Reino Unido, AR=Árabe, BE= Bereber, GB=Guinea Bissau AN=Angola, NI=Nicaragua, ES=El Salvador, CO=Colombia, ARG=Argentina, IL=Illinois, EC=Ecuador, KI=Kichwa, MA=Maya, TW=Taiwan, CH=China. Valor de estrés: 0,188.

## 4. CROMOSOMA X

### 4.1. Diversidad haplotípica

Los haplotipos de X-STRs de la población mestiza de Nicaragua estudiada se muestran en el Anexo 5.

Todos los haplotipos obtenidos únicamente se han observado una vez en la muestra de la población mestizo de Nicaragua, es decir, se han observado 165 haplotipos diferentes tantos como individuos estudiados.

### 4.2. Análisis de desequilibrio de ligamiento

Con el objetivo de descartar la posibilidad de que algunos de los loci estudiados se encuentren estrechamente relacionados, se llevó a cabo el

análisis de desequilibrio de ligamiento. No se ha observado evidencia de desequilibrio de ligamiento entre los loci estudiados para un nivel de significación de  $p = 0,0011$  (tras la corrección de Bonferroni) (Tabla 21).

Estos resultados concuerdan con lo esperado ya que las distancias entre los loci estudiados son mayores de 5Mb, excepto para DXS6809 y DXS6789 (Gusmao 2009). Sin embargo, la ausencia de evidencia de asociación entre los alelos de estos dos STRs permitiría utilizar las frecuencias alélicas para predecir las frecuencias haplotípicas en la población estudiada.

Tabla 21. Valores de P de desequilibrio de ligamiento entre los loci DXS8378 (0), DXS9902 (1), DXS7132 (2), DXS9898 (3), DXS6809 (4), DXS6789 (5), DXS7133 (6), GATA172D05 (7), GATA31E08 (8), DXS7423 (9).

Par (0, 1) Exact P=0.23931 +- 0.00137	Par (2, 7) Exact P=0.68752 +- 0.00168
Par (0, 2) Exact P=0.93950 +- 0.00106	Par (3, 7) Exact P=0.99396 +- 0.00049
Par (1, 2) Exact P=1.00000 +- 0.00000	Par (4, 7) Exact P=0.67069 +- 0.00461
Par (0, 3) Exact P=0.11832 +- 0.00192	Par (5, 7) Exact P=0.04584 +- 0.00134
Par (1, 3) Exact P=0.74861 +- 0.00320	Par (6, 7) Exact P=0.42901 +- 0.00269
Par (2, 3) Exact P=0.59446 +- 0.00095	Par (0, 8) Exact P=0.15158 +- 0.00219
Par (0, 4) Exact P=0.41743 +- 0.00226	Par (1, 8) Exact P=0.56960 +- 0.00224
Par (1, 4) Exact P=0.80713 +- 0.00237	Par (2, 8) Exact P=0.12307 +- 0.00251
Par (2, 4) Exact P=0.93257 +- 0.00190	Par (3, 8) Exact P=0.52921 +- 0.00160
Par (3, 4) Exact P=0.27871 +- 0.00284	Par (4, 8) Exact P=0.58366 +- 0.00310
Par (0, 5) Exact P=0.71109 +- 0.00186	Par (5, 8) Exact P=0.41208 +- 0.00290
Par (1, 5) Exact P=0.84337 +- 0.00268	Par (6, 8) Exact P=0.98139 +- 0.00079
Par (2, 5) Exact P=0.61921 +- 0.00222	Par (7, 8) Exact P=0.94257 +- 0.00191
Par (3, 5) Exact P=0.35950 +- 0.00278	Par (0, 9) Exact P=0.91851 +- 0.00149
Par (4, 5) Exact P=0.34119 +- 0.00371	Par (1, 9) Exact P=0.84970 +- 0.00209
Par (0, 6) Exact P=0.18495 +- 0.00112	Par (2, 9) Exact P=0.01267 +- 0.00104
Par (1, 6) Exact P=0.00228 +- 0.00042	Par (3, 9) Exact P=0.98436 +- 0.00069
Par (2, 6) Exact P=0.70990 +- 0.00197	Par (4, 9) Exact P=0.63891 +- 0.00330
Par (3, 6) Exact P=0.04545 +- 0.00154	Par (5, 9) Exact P=0.35792 +- 0.00203
Par (4, 6) Exact P=0.17139 +- 0.00224	Par (6, 9) Exact P=0.22099 +- 0.00317
Par (5, 6) Exact P=0.55564 +- 0.00266	Par (7, 9) Exact P=0.33881 +- 0.00314
Par (0, 7) Exact P=0.45743 +- 0.00218	Par (8, 9) Exact P=0.65634 +- 0.00417
Par (1, 7) Exact P=0.34634 +- 0.00229	

#### 4.3. Poder de discriminación por locus

Las frecuencias alélicas de los 10 X-STRs analizados en la muestra de Nicaragua se muestran en el Anexo 6.

El PD (igual a la diversidad génica) para hombres y mujeres, y el número de alelos por locus se muestran en la Tabla 22. Los loci con mayor número de alelos fueron DXS7132, DXS6789 y DXS6809 (12, 10 y 10, respectivamente), así

mismo presentaron un elevado PD tanto en hombres (0,77014, 0,77199 y 0,77797, respectivamente) como en mujeres (0,87021, 0,87342 y 0,87814, respectivamente). Sin embargo, GATA172D05 presentó el valor más elevado de diversidad (PD hombres = 0,80813, PD mujeres = 0,91229) aunque su número de alelos fue menor (8 alelos). Por el contrario, DXS7133 fue el locus con un valor de diversidad destacablemente menor al resto (PD hombres = 0,55684, PD mujeres = 0,45311).

Tabla 22. Número de alelos y poder de discriminación por locus X-STR para hombres y mujeres.

Locus	Nº alelos	PD hombres	PD mujeres
DXS6789	10	0,77199	0,91183
DXS6809	10	0,77797	0,9168
DXS7132	12	0,77014	0,91025
DXS7133	7	0,55684	0,75067
DXS7423	5	0,6963	0,85313
DXS8378	6	0,67051	0,82751
DXS9898	8	0,71478	0,87453
DXS9902	7	0,67132	0,826
GATA172D05	8	0,80813	0,93313
GATA31E08	7	0,74449	0,90157

El PD para el conjunto de los 10 X-STRs en la muestra poblacional de Nicaragua fue de 0,99999727 para hombres, mientras que el PD para mujeres fue de 0,999999944.

Tabla 23. Probabilidad de exclusión de paternidad en el caso de tríos y dúos supuesto padre/hija.

Locus	PE tríos	PE (spadre/hija)
DXS6789	0,7338	0,6011
DXS6809	0,7416	0,6112
DXS7132	0,7308	0,598
DXS7133	0,5035	0,3569
DXS7423	0,6403	0,495
DXS8378	0,6053	0,4581
DXS9898	0,6692	0,5271
DXS9902	0,6042	0,4583
GATA172D05	0,7754	0,6511
GATA31E08	0,7095	0,5721
TOTAL	0,99998885	0,99958036

El locus que ofrece mayor PE tanto en tríos como en casos donde la madre está ausente fue GATA172D05 (Tabla 23), mientras que el locus que presenta un valor de PE menor fue DXS7133.

El valor de PE combinado que se obtiene del análisis del decaplex utilizado en la población mestizo de Nicaragua fue de 0,99998885 en el caso de tríos padre/madre/hija, y de 0,99958036 en el caso de dúos supuesto padre/hija.

#### 4.4. Análisis interpoblacional

Se analizaron las distancias genéticas (*Fst*) entre Nicaragua y diversas poblaciones, en base a la distribución de las frecuencias alélicas de 7 X-STRs (Tabla 24).

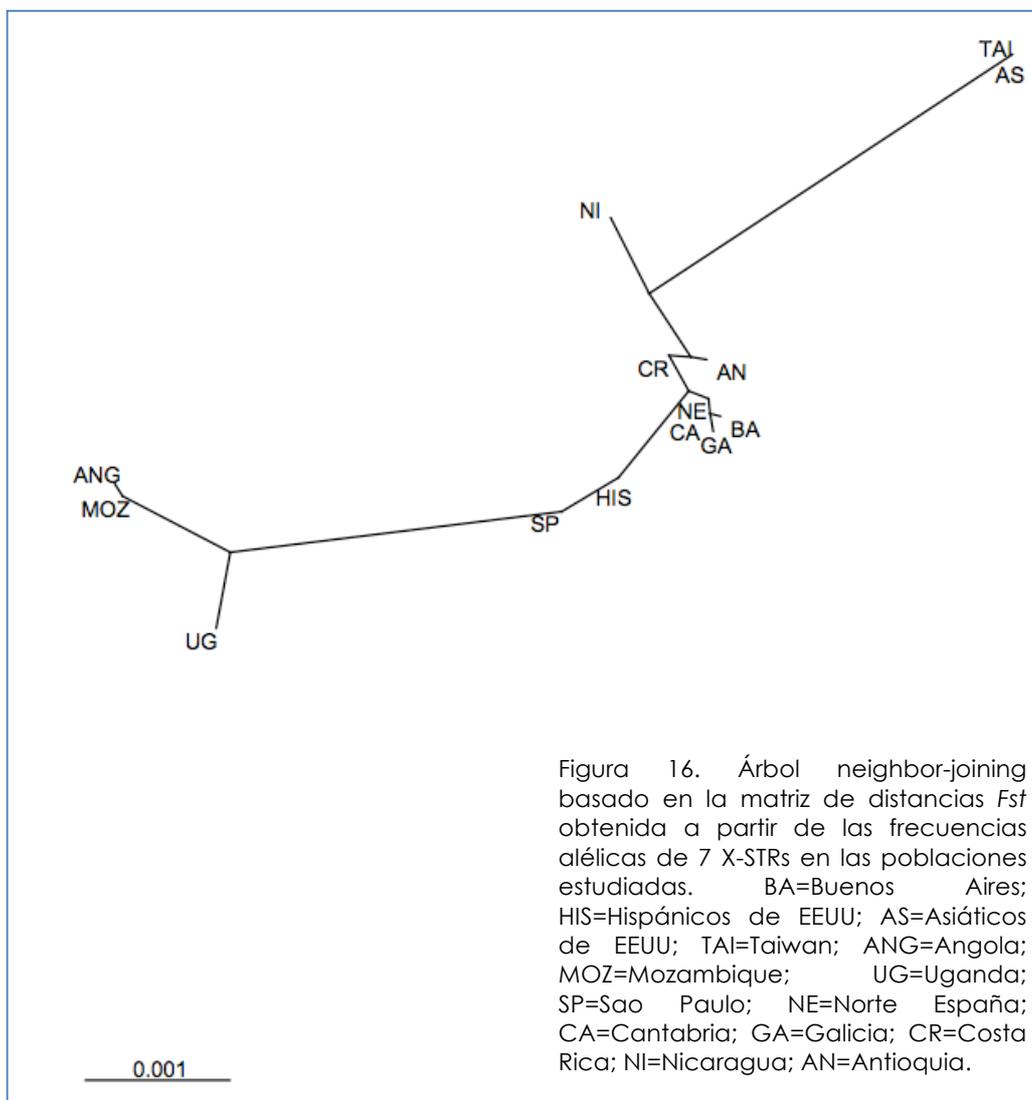
Los valores de *Fst* para Nicaragua y el resto de poblaciones han resultado muy bajos en todos los casos. Aún así los valores de *p* son significativos ( $P < 0,007$ , tras corrección de Bonferroni) excepto para Nicaragua y Costa Rica ( $P = 0,02$ ), aunque los resultados del test exacto de diferenciación poblacional indican diferenciación genética en todos los casos ( $p < 0,007$ ) (datos no mostrados).

Los valores de diferenciación más bajos serían para Nicaragua y las poblaciones latino americanas de Costa Rica, Antioquia (Colombia), Buenos Aires (Argentina) y la población del Norte de España. Seguidamente, se encontrarían el resto de poblaciones latino americanas y españolas; y ligeramente más alejadas las poblaciones asiáticas.

Por otro lado, los valores de *Fst* más elevados serían para Nicaragua y las poblaciones africanas.

Tabla 24. Valores *Fst* entre Nicaragua y diversas poblaciones basadas en la frecuencia alélica de 7 X-STRs (debajo de la diagonal), y valores de significación (*p*) (por encima de la diagonal).

	Antioquia	Costa Rica	Nicaragua	Buenos Aires	Sao Paulo	Hispanos USA	Norte España	Cantabria	Galicia	Uganda	Mozambique	Angola	Asiáticos USA	Taiwan
Antioquia	0	0.12305	0.00195	0.00391	0	0.00488	0.07812	0.05469	0.02930	0	0	0	0	0
Costa Rica	0.00031	0	0.02051	0.00098	0	0.01465	0.04395	0.03027	0.18262	0	0	0	0	0
Nicaragua	0.00101	0.00049	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Buenos Aires	0.00068	0.00045	0.00153	0	0	0.00098	0.39648	0.51172	0.26758	0	0	0	0	0
Sao Paulo	0.00137	0.00089	0.00209	0.00054	0	0.68750	0.18457	0.05176	0.01270	0	0	0	0	0
Hispanos USA	0.00090	0.00058	0.00178	0.00063	-0.00010	0	0.16895	0.02734	0.05469	0	0	0	0	0
Norte España	0.00037	0.00035	0.00157	0.00002	0.00013	0.00020	0	0.91016	0.78125	0	0	0	0	0
Cantabria	0.00069	0.00074	0.00295	-0.00003	0.00044	0.00081	-0.00038	0	0.77051	0	0	0	0	0
Galicia	0.00080	0.00023	0.00196	0.00012	0.00065	0.00058	-0.00024	-0.00034	0	0	0	0	0	0
Uganda	0.00544	0.00453	0.00552	0.00488	0.00232	0.00259	0.00345	0.00373	0.00447	0	0.01758	0.05957	0	0
Mozambique	0.00511	0.00430	0.00491	0.00475	0.00169	0.00153	0.00349	0.00453	0.00469	0.00124	0	0.90723	0	0
Angola	0.00669	0.00537	0.00626	0.00552	0.00193	0.00197	0.00402	0.00523	0.00540	0.00101	-0.00051	0	0	0
Asiáticos USA	0.00386	0.00438	0.00359	0.00352	0.00292	0.00354	0.00412	0.00485	0.00425	0.00706	0.00550	0.00615	0	0.86328
Taiwan	0.00359	0.00411	0.00331	0.00331	0.00283	0.00328	0.00370	0.00483	0.00393	0.00703	0.00509	0.00580	-0.00031	0



Tal y como vemos en la Figura 16, Nicaragua se muestra cercana a Costa Rica, y a la población colombiana de Antioquia, así como a las poblaciones españolas. Por otro lado, las poblaciones asiáticas quedarían agrupadas más alejadas, al igual que el grupo de las poblaciones africanas bien diferenciado del resto.

## 5. STRs AUTOSÓMICOS

Los genotipos de los 15 loci STRs autosómicos de los 165 individuos mestizos de Nicaragua se muestran en el Anexo 7. Las frecuencias alélicas y los parámetros estadísticos de interés forense se muestran en la Tabla 25.

Tabla 25. Frecuencias alélicas de los 15 loci STR autosómicos en la población mestiza de Nicaragua y parámetros estadísticos de interés forense.

Alelo	D8S1179	D21S11	D7S820	CSFIPO	D3S1358	TH01	D13S17	D16S539	D2S1338	D19S433	vWA	TPOX	D18S51	D5S818	FGA
6			0,003			0,4						0,012			
7			0,006	0,012		0,221						0,003	0,042		
8	0,006		0,073	0,012		0,073	0,073	0,018				0,479	0,018		
9	0,006		0,064	0,037		0,115	0,209	0,133				0,067	0,115		
9.3						0,179									
10	0,088		0,287	0,224		0,012	0,088	0,212				0,045	0,058		
11	0,064		0,293	0,252			0,239	0,239		0,012		0,261	0,009	0,376	
12	0,13		0,238	0,39			0,188	0,245		0,085		0,13	0,098	0,279	
13	0,336		0,034	0,064	0,003		0,13	0,13		0,258	0,003		0,082	0,109	
13.2										0,112					
14	0,245		0,003	0,009	0,109		0,07	0,021		0,233	0,03	0,003	0,137	0,003	
14.2										0,033					
15	0,112				0,418		0,003			0,17	0,109		0,155		
15.2										0,067					
16	0,003				0,264				0,018	0,009	0,358		0,125		
16.2										0,006					
17	0,006				0,109				0,136		0,297		0,192		
18	0,003				0,091				0,055		0,139		0,088		0,018
19					0,003				0,148		0,058		0,049		0,113
20					0,003				0,127		0,006		0,018		0,071
21									0,027				0,015		0,098
22									0,082				0,024		0,107
22.2															0,003
23									0,233				0,003		0,153
23.2															
24									0,091						144
25									0,067						0,135
25.2															
26									0,012						0,126
27		0,012							0,003						0,025
28		0,07													0,006
29		0,258													
30		0,209													
30.2		0,03													
31		0,064													
31.2		0,124													
32		0,024													
32.2		0,124													
33		0,006													
33.2		0,052													
34		0,006													
34.2		0,015													
36.2		0,006													
NA	11	14	9	8	8	6	8	7	12	11	8	8	14	8	12
H0	0,794	0,891	0,774	0,724	0,685	0,745	0,867	0,842	0,812	0,818	0,758	0,709	0,872	0,739	0,877
He	0,787	0,848	0,767	0,731	0,726	0,743	0,831	0,804	0,868	0,827	0,75	0,681	0,879	0,753	0,884
P	0,003*	0,924	0,095	0,269	0,533	0,899	0,63	0,693	0,315	0,135	0,118	0,107	0,133	0,324	0,052
MP	0,085	0,044	0,097	0,119	0,116	0,104	0,059	0,074	0,035	0,057	0,111	0,165	0,034	0,094	0,033
PD	0,915	0,956	0,903	0,881	0,884	0,896	0,941	0,926	0,965	0,943	0,889	0,835	0,966	0,906	0,967
PE	0,588	0,777	0,552	0,466	0,405	0,502	0,728	0,68	0,622	0,633	0,523	0,442	0,739	0,492	0,749
PIC	0,76	0,83	0,73	0,69	0,68	0,7	0,81	0,77	0,85	0,8	0,71	0,63	0,86	0,71	0,87
TPI	2,43	4,58	2,22	1,81	1,59	1,96	3,75	3,17	2,66	2,75	2,06	1,72	3,9	1,92	4,08

NA: número de alelos; H<sub>o</sub>: heterozigosis observada; H<sub>e</sub>: heterozigosis esperada; P: test exacto de equilibrio Hardy-Weinberg (1.000.000 pasos en la cadena de Markov y 100.000 pasos de dememoración); MP: probabilidad de coincidencia (*matching probability*); PD: poder de discriminación; PE: poder de exclusión; PIC: contenido informativo de polimorfismo; TPI: índice típico de paternidad; heterozigosis media observada = 0.794 (desviación estándar = 0.064); heterozigosis media esperada = 0.792 (desviación estándar = 0.060).

No se han encontrado desviaciones significativas del equilibrio HW en los datos analizados (Tabla 25). Los loci D21S11 y D18S51 son los que tienen un número mayor de alelos (14) comparados con TH01 con únicamente 6 alelos. El locus

FGA muestra el PD más elevado (0.967) seguido por D18S51 y D2S1338 con PD=0.966 y 0.965, respectivamente. El PD global para los 15 STR fue  $> 0,99999999$  y el PE combinado de  $0,99999993$ .

### 5.1. Proporciones de mezcla genética basadas en STRs autosómicos

Las proporciones de mezcla basadas en 15 STRs autosómicos fueron calculadas utilizando las poblaciones española, africana (Guinea ecuatorial y Angola) y amerindia de México como poblaciones ancestrales.

La proporción de mezcla en la población mestiza de Nicaragua resultó en un  $0.69 \pm 0.113$  española,  $0.203 \pm 0.089$  africana y  $0.106 \pm 0.079$  amerindia. Las elevadas desviaciones estándar son el reflejo de la leve distancia genética entre las poblaciones ancestrales.

Actualmente, existe una variedad de paneles de marcadores para el análisis de ascendencia (Chen *et al.* 2010; Halder *et al.* 2008; Nassir *et al.* 2009; Santos *et al.* 2010). Para obtener unas estimaciones de mezcla precisas, se debe tener en cuenta la elección de las poblaciones ancestrales y la diferencia promedio de la frecuencia alélica entre las poblaciones ancestrales y la elección de estas poblaciones (Barnholtz-Sloan *et al.* 2008). Aunque en este estudio se han utilizado poblaciones ancestrales representativas, la diferencia promedio de la frecuencia alélica entre las poblaciones no es  $> 0.1$ . Por lo tanto, estos resultados deberían considerarse como una aproximación de ascendencia.

## 6. Proporciones de mezcla en la población mestiza de Nicaragua

La estimación de mezcla en la presente población de Nicaragua se muestra en el gráfico 2.

Las proporciones de mezcla basadas en el ADNmt y cromosoma Y se basan en la frecuencia de los haplogrupos encontrada en la presente población mestiza nicaragüense, agrupando los haplogrupos como nativo americanos (haplogrupos A2, B4\* y D1 del ADNmt; y Q del cromosoma Y), euroasiáticos (haplogrupos H, HV0 y R del ADNmt; y R, I, G, J2 y "otros" de cromosoma Y) y africanos (haplogrupo L de ADNmt; y A, B, E, y J1 de cromosoma Y).

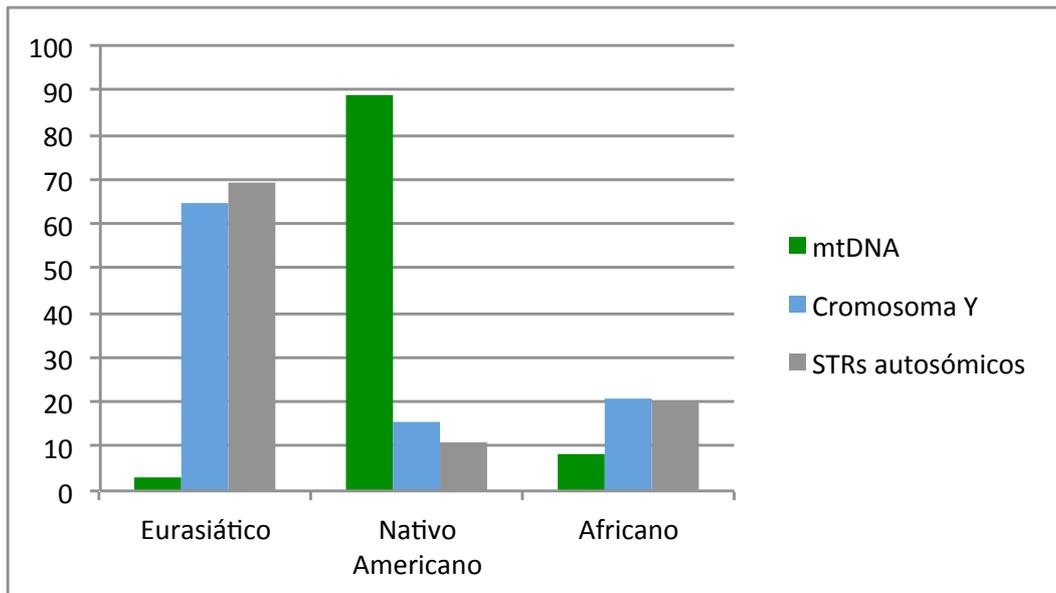


Gráfico 2. Proporciones de mezcla basadas en los haplogrupos de ADNmt y cromosoma Y y los resultados de los STRs autosómicos.

Los resultados muestran una mayoritaria contribución euroasiática en base tanto a los STRs autosómicos (69%) como a la frecuencia de los haplogrupos de cromosoma Y (64,46%), mientras que el componente amerindio es básicamente de origen materno (88,95%). También se puede observar una moderada contribución africana, siendo mayor en los STRs autosómicos (20,3%) y cromosoma Y (20,8%) que en el ADNmt (7,97%). Habría que puntualizar que la estimación del componente africano en base a los haplogrupos del cromosoma Y podría ser una sobreestimación ya que se incluyó la frecuencia del haplogrupo E1b1b1, que aunque es más frecuente en el norte de África también se observa en Europa y oeste asiático, además de J1 que también se observa en Oriente Medio.

## DISCUSIÓN

En este trabajo se ha caracterizado el acervo genético de 165 individuos mestizos de la población de Nicaragua mediante los principales marcadores genéticos utilizados en la rutina forense. La importancia del presente estudio queda de manifiesto por el hecho de que este trabajo es el primero que ha caracterizado, desde un punto de vista genético-forense y genético-poblacional, a la población mestiza de Nicaragua.

Desde la comunidad científico forense internacional existe consenso sobre la importancia de la caracterización genética de las poblaciones humanas, para de esta manera evaluar la eficacia de los marcadores genético forenses en las diferentes poblaciones e incrementar las bases de datos poblacionales, tan valiosas en esta área de conocimiento.

Desde un punto de vista de identificación individual, ya se ha comentado previamente en la *introducción* la importancia de los marcadores genéticos estudiados, en especial de tipo microsatélite, para las diferentes aplicaciones en genética forense. Los STRs autosómicos son la herramienta básica en los laboratorios forenses por el elevado valor discriminativo que otorgan, cualidad que ha quedado demostrada en un gran número de casos de identificación (Budimlija *et al.* 2003; Clayton *et al.* 1995b; Leclair *et al.* 2004; Marjanovic *et al.* 2007; Olaisen *et al.* 1997). Del mismo modo, los STRs del cromosoma Y también son muy valiosos en las investigaciones medico-legales, sobretudo si se tiene en cuenta que la mayoría de los crímenes violentos y delitos sexuales son cometidos por varones (Jobling *et al.* 1997; Rand y Robinson 2011). En cuanto a los STRs del cromosoma X, a pesar de que aún no son tan utilizados para las diversas aplicaciones forenses, presentan muy buenas perspectivas al respecto (Szibor 2007).

El disponer del completo panorama genético de las poblaciones humanas con el estudio de una gran variedad de marcadores, permite aproximarse al origen del individuo al cual pertenece un vestigio biológico encontrado en el escenario de un crimen. Esto es debido a que las diferentes poblaciones presentan haplotipos o alelos con unas frecuencias características dependiendo de la región geográfica. Los haplotipos de ADNmt y diversos SNPs del cromosoma Y se pueden clasificar en haplogrupos, los cuales presentan unos patrones geográficos característicos (Kayser y de Knijff 2011; Wallace *et al.* 1999). El tener una aproximación al origen geográfico de una determinada evidencia podría permitir delimitar un grupo de sospechosos en una investigación policial.

Por otro lado, el disponer de bases de datos de estos marcadores genéticos es fundamental a la hora de evaluar e interpretar las evidencias en genética forense. En este contexto, hay que destacar la influencia de las migraciones humanas sobre las poblaciones residentes, lo cual repercute en la generación de estas bases de datos. Por ejemplo, en España existe ya una amplísima comunidad de ciudadanos de origen latino americano, hecho a tener en cuenta cuando se evalúan los vestigios biológicos pertenecientes a casos de delitos en los que la población inmigrante está involucrada como víctima o como agresora. En el caso de la población de Nicaragua, las oleadas migratorias tienen sus principales destinos en EEUU y Costa Rica (Baumeister 2006). La población inmigrante puede generar un patrón de subestructura poblacional, la cual se hace más evidente por ejemplo en los casos de haplotipos de Y-STRs, y hay que valorar a la hora de escoger la base de datos poblacional para determinar la frecuencia de los haplotipos (Budowle *et al.* 2005; Budowle *et al.* 2009c; Kayser *et al.* 2002; Lessig *et al.* 2003).

En otro sentido, este trabajo es pionero en la aproximación a los orígenes genéticos de la población mestiza de Nicaragua, tanto desde la vertiente de los linajes maternos como paternos. La expansión europea hacia las Américas resultó en unos movimientos poblacionales masivos desde el Viejo al Nuevo Mundo. Durante el periodo de dominio Ibérico (s. XV-XIX) alrededor de un millón de españoles y portugueses migraron hacia el Nuevo Mundo (Burkholder y Johnson 2003). Además, el resultado del comercio de esclavos a través del Atlántico introdujo millones de africanos en las Américas (Curtin 1969). La colonización europea produjo un declive considerable de la población nativa, siendo hacia finales del siglo XVI un 10% de su tamaño original (Salzano y Bortolini 2002; Sanchez-Albornoz 1974). Estos cambios finalmente condujeron al establecimiento de poblaciones con varios niveles de mezcla a través del continente.

Muchos estudios han investigado esta mezcla étnica a través de la genética de las poblaciones, y lo que se ha observado es una considerable asimetría genética sexual, la cual involucra un componente nativo americano mayoritario por parte de los linajes maternos y un componente europeo en el lado masculino (Carvajal-Carmona *et al.* 2000; Corach *et al.* 2010; Gonzalez-Andrade *et al.* 2007; Lao *et al.* 2010; Martinez *et al.* 2007; Mendizabal *et al.* 2008; Merriwether *et al.* 1997; Mesa *et al.* 2000).

Seguidamente se discutirán los diferentes resultados obtenidos en este trabajo para cada uno de los marcadores estudiados desde un contexto médico-legal y antropológico.

## 1. ADN mitocondrial

### 1.1 Parámetros de diversidad e interés forense

El acervo genético materno de la población mestiza de Nicaragua estudiada presenta una elevada diversidad genética. El análisis de las regiones HVSI y HVSII del ADNmt de la población mestiza de Nicaragua para las posiciones 16024-16365 y 60-340, proporcionó diversos valores de diversidad. Estos resultados de diversidad conducen a una serie de parámetros de interés forense, el poder de coincidencia al azar y el poder de discriminación. Ambos parámetros resultaron mayores para HVSI (PC=0,064; PD=0,935) que para HVSII (PC=0,206; PD=0,794) ya que HVSI presenta una mayor variabilidad. Al combinar ambos segmentos el PC resultó ser de 0,041 y el PD de 0,959. Estos valores son elevados dentro de lo esperado para el ADNmt, aunque no lo son tanto si se comparan con los obtenidos para otros marcadores genéticos (STRs autosómicos), ya que como se conoce las regiones HVSI y HVSII tienen un limitado poder de discriminación en un contexto forense (Parsons y Coble 2001; Salas *et al.* 2007).

### 1.2. Análisis de expansión poblacional

La distribución *mismatch* representa la distribución del número de diferencias nucleotídicas de las secuencias de una población, y es de gran utilidad para determinar diferentes sucesos poblacionales (Harpending 1994). La forma que adopta esta distribución depende de la tasa de mutación y del momento de la expansión poblacional. Las poblaciones que han estado en crecimiento presentan una distribución *mismatch* lisa y con un pico, el cual refleja el suceso de expansión. Cuanto más hacia el eje de abscisas se encuentre el pico de la distribución, más reciente habrá sido la expansión.

La distribución *mismatch* de la población de Nicaragua tiene un carácter bimodal, lo cual podría reflejar dos eventos de expansión poblacional y/o la existencia de un cuello de botella en la historia de esta población.

La distribución del segmento HVSI presenta una moda en 9 diferencias y una secundaria en 2 diferencias. La moda en 9 diferencias podría reflejar la sucesos antiguos en la historia demográfica de Nicaragua, mientras que la moda en 2 diferencias podría mostrar una expansión poblacional más reciente, como la resultante de oleadas migratorias procedentes del norte, de grupos de las

familias lingüísticas uto-azteca y oto-mangue que se establecieron en Nicaragua (Tous 2003). Un evento adicional de expansión, aunque mucho más reciente, pudo haber tenido lugar tras el drástico declive demográfico producido por la llegada de los colonos españoles a la región (Tous 2003). Por otro lado, los valores negativos de los parámetros D de Tajima (-1,66) y  $F_s$  de Fu (-24,36) también apoyarían la hipótesis de una expansión en esta población, la cual sería relativamente reciente de acuerdo con el bajo valor de tau obtenido (1,12).

Cuando analizamos la red promedio de los linajes de ADNmt nativo americanos de la población mestiza de Nicaragua también observamos evidencias de una posible expansión poblacional. Los linajes correspondientes al haplogrupo A2 presentan una forma estrellada, con nodos alrededor de un nodo fundador determinado por el haplotipo 16111T, 16223C, 16290T, 16319A, 16362C, 64T, 73G, 146C, 153G, 235G, y 263G. Las agrupaciones en forma estrellada son características de sucesos históricos de expansión poblacional (Bandelt *et al.* 1999).

### 1.3. Análisis de haplogrupos del ADNmt

De la misma forma que se ha observado en otros estudios de poblaciones mestizas del continente americano, la mayoría de linajes de ADNmt de la población mestiza de Nicaragua (88,95%) presentan un origen nativo americano.

Dentro de estos linajes, el principal haplogrupo observado ha sido A2 con una frecuencia del 73,62%. La elevada frecuencia de este haplogrupo en Nicaragua está de acuerdo con las frecuencias observadas en otras poblaciones de Norte y Centroamérica principalmente (Batista *et al.* 1995; Boles *et al.* 1995; Budowle *et al.* 2002; Kolman y Bermingham 1997; Kolman *et al.* 1995; Salas *et al.* 2009; Sandoval *et al.* 2009; Santos *et al.* 1994; Ward *et al.* 1993).

El segundo haplogrupo más frecuente en la muestra de Nicaragua es el haplogrupo B4\* (14,11%). Su frecuencia es baja en esta población, similar a la de las poblaciones mexicanas de Norteamérica (Sandoval *et al.* 2009) y poblaciones panameñas de Centroamérica (Batista *et al.* 1995; Kolman *et al.* 1995; Kolman y Bermingham 1997).

El haplogrupo D1 también se ha observado en la muestra de Nicaragua pero con una mínima frecuencia (1,22%). Este linaje muestra una discontinuidad más marcada dentro del panorama americano estudiado, ya que se observa con mayor frecuencia en el norte de Norteamérica (Rubicz *et al.* 2003) y en

Sudamérica (Fuselli *et al.* 2003; Sandoval *et al.* 2009), mientras que en Mesoamérica está prácticamente ausente (Batista *et al.* 1995; Kolman y Bermingham 1997; Kolman *et al.* 1995; Mendizabal *et al.* 2008; Salas *et al.* 2009). En cuanto a los otros linajes nativos americanos C1, X2a y D4h3 (Achilli *et al.* 2008; Perego *et al.* 2009; Tamm *et al.* 2007) están ausentes en la muestra de Nicaragua. En el caso del haplogrupo C1, se encuentran elevadas frecuencias en México (Green *et al.* 2000; Sandoval *et al.* 2009) y poblaciones Chocó de Panamá (Kolman y Bermingham 1997), y bajas frecuencias en Guatemala (Boles *et al.* 1995) y El Salvador (Salas *et al.* 2009), mientras que en Nicaragua, y en las poblaciones Chibcha de Costa Rica (Santos *et al.* 1994) y Panamá (Kolman *et al.* 1995; Batista *et al.* 1995) está ausente. La ausencia de este haplogrupo en la muestra de Nicaragua podría indicar la relación de esta población con las poblaciones Chibcha, ya que estos grupos también carecen de este haplogrupo (Santos *et al.* 1994; Batista *et al.* 1995; Kolman *et al.* 1995).

Por otro lado, se ha observado un bajo porcentaje (11,05%) de linajes de ADNmt no nativos americanos en la población mestiza de Nicaragua, lo cual indicaría que, a diferencia de lo que ocurre en otras regiones latinoamericanas (Benn Torres *et al.* 2007; Mendizabal *et al.* 2008; Palencia *et al.* 2010), la influencia de los colonizadores españoles y otras poblaciones europeas ha sido poco significativa en cuanto al acervo genético materno de Nicaragua. Analizando en detalle esta influencia no nativa americana, encontramos el macrohaplogrupo R, los haplogrupos H y HV0 característicos de las poblaciones europeas (Achilli *et al.* 2004; Pereira *et al.* 2005; Richards *et al.* 2002; Torroni *et al.* 1996), especialmente el haplogrupo H, que se observa en elevadas frecuencias en España (Alfonso-Sanchez *et al.* 2008; Alvarez *et al.* 2007; Cardoso *et al.* 2011) y diversos sublinajes del haplogrupo L (L0, L1, L2 y L3) de origen africano, los cuales también se observan en otras poblaciones americanas debido en gran parte al tráfico de esclavos africanos durante los siglos XV y XIX (Salas *et al.* 2004; Stefflova *et al.* 2011). La existencia de estos linajes en Nicaragua podrían ser el resultado de la llegada de poblaciones españolas y africanas durante el período colonial o de migraciones más recientes al país.

#### 1.4. Análisis interpoblacional

La mayoría de estudios genéticos poblacionales basados en el ADNmt se han venido centrando, desde sus inicios, en el estudio exclusivo del segmento HVSI (Bertranpetit *et al.* 1995; Corte-Real *et al.* 1996; Richards *et al.* 1996), por lo que

existen escasos en la literatura que hayan caracterizado también el segmento HVSI. Por ello la comparación interpoblacional de la población mestiza de Nicaragua se ha realizado en base al segmento HVSI, específicamente entre las posiciones 16056-16365.

#### 1.4.1. Parámetros de diversidad del segmento HVSI

Comparando la diversidad haplotípica de Nicaragua con la del resto de poblaciones estudiadas, Nicaragua muestra una mayor diversidad que varios grupos nativo americanos. Esto no resulta sorprendente ya que estas poblaciones representan grupos nativo americanos que podrían haber pasado por diversos procesos que pudieron haber reducido su diversidad genética (Baeta *et al.* 2009; Kolman y Bermingham 1997; Kolman *et al.* 1995; Santos *et al.* 1994; Schmitt *et al.* 2004).

Sin embargo, la diversidad de los linajes nativo americanos de la población mestiza de Nicaragua ( $M=4,52$ ) resulta inferior que la de otras poblaciones mestizas, como Cuba ( $M=5,62$ ), México ( $M=5,02$ ) (Guardado-Estrada *et al.* 2009), Colombia ( $M=7$ ) (Salas *et al.* 2008), Bolivia ( $M=6,27$ ), Uruguay ( $M=6,67$ ), e incluso de otros grupos nativo americanos como Purepecha ( $M=6,37$ ), Otomí ( $M=6,60$ ), Ixhuatlancillo ( $M=7,42$ ), Wounan ( $M=6,26$ ), Tayacaja ( $M=5,90$ ), Quechua ( $M=7,06$ ) y Araucarian ( $M=5,36$ ). Esta relativa baja diversidad podría ser una evidencia de la significativa reducción de la población nativo americana durante el período colonial, estimada en un 90-95% (Tous 2003), que conduciría a la reducción de la diversidad de los linajes de ADNmt.

#### 1.4.2. Origen geográfico de los linajes nativo americanos de ADNmt de los mestizos de Nicaragua

Cuando los colonizadores españoles llegaron a Nicaragua encontraron un área densamente poblada con diversos grupos etnolingüísticos. Algunos de los principales grupos que habitaron Nicaragua durante el período pre-colombino migrarían hacia el sur desde México, pudiendo ser los descendientes de culturas como la Azteca de Mesoamérica. Incluso, grupos pertenecientes a la familia lingüística Chibcha habitarían la región montañosa central y la costa Caribeña de Nicaragua. La influencia de estos grupos en Nicaragua se puede intuir actualmente en un contexto lingüístico ya que dentro de las familias lingüísticas presentes en Nicaragua se encuentran lenguas derivadas de las familias oto-mangue, uto-azteca y Chibcha (Lewis 2009).

Estos sucesos en la historia de Nicaragua se conocen gracias a las crónicas históricas, pero no han sido estudiados desde un punto de vista genético. En este trabajo se han investigado por primera vez desde los linajes nativos americanos del ADNmt de la población mestiza de Nicaragua, y la comparación de estos linajes con los de otras poblaciones americanas confirmaría estos acontecimientos.

La estimación del origen geográfico de los linajes de HVSI del ADNmt de la población mestiza de Nicaragua, a una escala continental, se realizó teniendo en cuenta dos clasificaciones. Por un lado, separando las poblaciones según Norteamérica, Centroamérica y Sudamérica, y por otra parte, considerando Mesoamérica como las poblaciones centroamericanas y México.

Según la primera clasificación, el 55,24% de los linajes mitocondriales de Nicaragua podrían ser adscritos a Centroamérica, el 32,83% a Norteamérica y un 11,93% a Sudamérica. Sin embargo, utilizando la segunda clasificación, Mesoamérica sería el principal origen de los linajes de ADNmt nicaragüenses (79,08%). Dado que dentro de Mesoamérica se han incluido las poblaciones mexicanas estudiadas y de esta forma el porcentaje de similitud ha incrementado, se podría decir que México tiene una significativa influencia en cuanto al origen de las secuencias mitocondriales de Nicaragua.

Al analizar con más detalle la distribución de los haplotipos de HVSI de la muestra de Nicaragua que se observan en las otras poblaciones americanas, observamos en efecto la similitud con Mesoamérica. Varios haplotipos se han observado en todas las áreas geográficas, pero 11 de 19 únicamente se encuentran en Mesoamérica.

Teniendo en cuenta estos haplotipos exclusivos de Mesoamérica, podemos determinar que la influencia de México viene dada por las poblaciones Otomí (de la familia lingüística oto-mangue), Maya y Xochimilco (de la familia lingüística uto-azteca).

El Salvador es la población con la cual Nicaragua comparte mayor número de haplotipos, tres de los cuales exclusivamente con esta población. Uno de estos haplotipos compartidos solo con El Salvador, y que es uno de los más frecuentes en la muestra de Nicaragua, es el que representa la raíz de la red promedio de los haplotipos del haplogrupo A2 (16111T, 16223T, 16290T, 16319A y 16362C) pero con la transversión 16299 A→G. El hecho de no observar este haplotipo en otras poblaciones norteamericanas o centroamericanas, podría reflejar un origen reciente en la región que abarca El Salvador y Nicaragua. Dada la proximidad geográfica de estas dos poblaciones y que El Salvador fue habitado por descendientes de la cultura Azteca y Tolteca de México (Salas et

al. 2009), no es de extrañar que estas poblaciones hayan tenido una historia muy parecida, la cual se refleja en las similitudes del panorama mitocondrial.

Por otro lado, otros haplotipos nicaragüenses de los que solo se observan en Mesoamérica corresponden a Cuba, Embera, Wounan y a las poblaciones de la familia lingüística Chibcha (Huetar, Ngöbé y Kuna).

La relación de algunos linajes de la población mestiza de Nicaragua con las poblaciones Chibcha parlantes se puede establecer también al observar la presencia de la deleción de 6 pb entre las posiciones 106-111 en la región HVSII en tres individuos. Esta deleción fue reportada por Santos (1994) en un estudio sobre la población Huetar (Chibcha parlante) y se propuso que podría ser específica de los grupos Chibcha, o al menos que estaría presente en la población ancestral de estos grupos. Por otro lado, Merriwether (1993) también observó la deleción en dos individuos Aymara del norte de Chile, indicando que esta deleción no solo se extendería a estos grupos de Centroamérica. Sin embargo, la deleción en la población Aymara se encontró dentro del contexto del haplogrupo D, mientras que en los grupos Chibcha se observa en el haplogrupo A (Santos et al. 1994; Kolman et al. 1995; Batista et al. 1995), tal y como sucede en los 3 individuos de la presente muestra.

Cuando se analiza la distancia o diferenciación genética (*Fst*) entre pares de poblaciones teniendo en cuenta el segmento HVSI (16056-16365), de nuevo se encuentran similitudes entre Nicaragua y las poblaciones mesoamericanas anteriormente mencionadas. En particular, las poblaciones que presentan una menor distancia genética con Nicaragua fueron las poblaciones mexicanas Triqui y Mixtec de la familia lingüística oto-mangue, Xochimilco y Zitlala de la familia lingüística uto-azteca; y las poblaciones de El Salvador y Ngöbé (de la familia lingüística Chibcha) de Panamá.

## 2. Cromosoma Y

### 2.1. Parámetros de diversidad e interés forense

La diversidad observada al analizar 17 Y-STRs en la muestra de la población mestiza de Nicaragua ha sido elevada. Se han obtenido 156 haplotipos distintos del total de la muestra (N=165), lo cual corresponde a un poder de discriminación de  $0.9993 \pm 0.0008$ , y una probabilidad de coincidencia al azar de 0.0007. Estos parámetros indican que el conjunto de los 17 loci Y-STR es un

buen sistema para discriminar entre varones no relacionados en esta población.

## 2.2. Análisis de haplogrupos del cromosoma Y

A diferencia de lo observado para el ADNmt, la mayoría de haplogrupos de cromosoma Y presentan un origen euroasiático.

El principal haplogrupo encontrado en la presente muestra ha sido el haplogrupo R1b (43,63% del total de la muestra). Este haplogrupo es el más común en el oeste de Europa (Rosser *et al.* 2000; Semino *et al.* 2000) y se observa con una particular alta frecuencia en las poblaciones españolas (Adams *et al.* 2008; Flores *et al.* 2004; YHRD). La otra variante del linaje R1 (R1a), más abundante al este de Europa, así como al oeste y centro de Asia (Underhill *et al.* 2010) también se ha observado pero con una baja frecuencia (3,06%).

El linaje I representa uno de los dos principales haplogrupos de cromosoma Y europeos (Hammer *et al.* 2001; Jobling y Tyler-Smith 2003; Rootsi *et al.* 2004), junto con R. Sin embargo, a diferencia del linaje R, se distribuye exclusivamente en Europa (Karafet *et al.* 2008). Por un lado, el sublinaje I1 se encuentra principalmente en el norte de Europa, mientras que I2 es mayoritario en el este de Europa y los Balcanes (Rootsi *et al.* 2004). En el presente trabajo, estos haplogrupos se han observado en bajas frecuencias (3,68% en total).

El haplogrupo J también muestra una frecuencia moderada en la muestra de Nicaragua (J1: 4,30%; J2: 9,2%). El haplogrupo J2 parece presentar un gradiente de frecuencia decreciente desde Oriente Medio hacia el oeste de Europa (área mediterránea), mientras que J1 muestra sus mayores frecuencias en Oriente Medio, el norte de África y Etiopía (Semino *et al.* 2004).

El haplogrupo E es el más observado en África y en la muestra de Nicaragua se observa con una frecuencia del 15,33%. Dentro de este linaje se han observado los haplogrupos E1b1b1 y E1b1a, principalmente. El primero es el más observado en el norte de África (Arredi *et al.* 2004), pero también se encuentra en Europa (Semino *et al.* 2000) y oeste de Asia (Underhill *et al.* 2000). Por otro lado, E1b1a se restringe a África, distribuyéndose con diferentes frecuencias a través del continente, con mayor frecuencia en el oeste de África (Coelho *et al.* 2009).

Los haplogrupos A y B, casi completamente restringidos al África sub-Sahariana (Hammer et al. 2001; Underhill et al. 2001, Karafet 2008), solo se han encontrado en dos individuos de la población mestiza de Nicaragua.

Es interesante resaltar que el patrón general de frecuencias de los haplogrupos de cromosoma Y observado en la población mestiza de Nicaragua, podría reflejar el patrón observado en la península ibérica, y en particular en España. A parte de la elevada frecuencia del haplogrupo R1b, como se ha comentado anteriormente, se ha observado que la península presenta unas proporciones de mezcla considerables de origen norte africano (10,6%) y sefardí (19,8%) (Adams et al. 2008). La influencia del norte de África, que se vería reflejada por la proporción del haplogrupo E1b1b principalmente, sería consecuencia de la ocupación Islámica de la península durante los siglos VIII y XV. Por otro lado, el estudio de Adams et al. (2008) reveló moderadas frecuencias de los haplogrupos J2 y G, los cuales son frecuentes en las poblaciones sefardíes, aunque estos haplogrupos también pudieron llegar a la península a través de otras poblaciones del este del Mediterráneo. La influencia de estos haplogrupos, así como de otros observados en Oriente Medio (E1b1b1 y R1a), en la población nicaragüense bajo estudio podría ser debida también a la inmigración reciente al país de población siria, armenia, palestina, judía y libanesa que conforma una comunidad de unos 30.000 habitantes.

Como hemos visto, los haplogrupos euroasiáticos en la población de Nicaragua, principalmente R1b, podrían evidenciar la herencia de los inmigrantes españoles que llegaron al país durante el período colonial. En cuanto a los haplogrupos africanos E1b1a, E1b1b, e incluso J1, que se observa con alta frecuencia en el norte de África, podrían ser el legado de los soldados españoles con ascendencia norteafricana o de varones del oeste africano traídos al país como esclavos, ya que el oeste de África fue uno de las principales fuentes de esclavos en las Américas (Rout 1976). Por supuesto hay que tener en cuenta, que posibles migraciones más recientes hayan podido influir en las frecuencias de los haplogrupos.

Otro de los haplogrupos presente en un 14,7% de la población mestiza de Nicaragua es el haplogrupo nativo americano Q1a3a (Q-M3), el más frecuente observado en las poblaciones nativo americanas (Bortolini et al. 2003; Zegura et al. 2004). Si analizamos en detalle las 24 muestras que presentan este haplogrupo, 21 de estos individuos presentan linajes de ADNmt de origen nativo americano. Esto es interesante desde un punto de vista cultural, ya que estos individuos aún teniendo descendencia nativo americana

en los linajes tanto paterno como materno se reconocen a ellos mismos como mestizos.

### 2.3. Análisis interpoblacional

El análisis de las distancias genéticas ( $F_{st}$ ) de los haplotipos de Y-STRs entre poblaciones muestra, en primer lugar, una clara correspondencia entre los mestizos de Nicaragua y el resto de poblaciones mestizas. Después de las poblaciones mestizas, las europeas son las que presentan mayor similitud con Nicaragua, especialmente España. Estos resultados en conjunto con los de los haplogrupos de cromosoma Y comentados anteriormente, resaltan la huella genética dejada por los colonos españoles en Nicaragua.

El que la población mestiza de Nicaragua sea similar a otras poblaciones mestizas es lógico si se tiene en cuenta que han podido atravesar sucesos similares durante la colonización por parte de las poblaciones europeas.

Con la población que más cercanos genéticamente se encuentran los mestizos de Nicaragua analizados son los mestizos de El Salvador. Dada su proximidad geográfica, ambos países han podido compartir parte de su historia, sobretodo la que involucra la llegada de los colonos europeos. Del mismo modo que ocurre en Nicaragua, la mayoría de la población salvadoreña es mestiza (CONCULTURA 2000). El análisis de los haplotipos de STRs del cromosoma Y de esta población realizado por Vasquez (2002) detectó también la presencia de la herencia española. Por otro lado, Lovo-Gomez et al. (2007) analizaron la proporción de haplogrupos de cromosoma Y en población general de El Salvador y obtuvieron una mayoría del haplogrupo R1b (43%) seguido del haplogrupos Q (31,2%) y otros no amerindios. Estas proporciones son muy similares a las obtenidas en el presente trabajo para el haplogrupo R1b (47,24%). Este patrón de ascendencia europea (particularmente española) y amerindia en El Salvador y en el resto de poblaciones mestizas estudiadas hace que sean similares a la población mestiza de Nicaragua.

A raíz de la similitud observada entre las poblaciones mestizas estudiadas, la población mestiza de Nicaragua se podría agrupar con estas poblaciones en una misma base de datos de Y-STRs ya que no se observa una significativa subestructura o diferenciación poblacional. Lo mismo sucedería cuando la población mestiza de Nicaragua se compara con la población hispana de Texas en base al análisis de Y-STRs (Anexo 8).

Siguiendo con el análisis de diferenciación genética, después de las poblaciones europeas la población más afín a Nicaragua serían los grupos

nativo americanos Kichwa de Ecuador y Maya de Guatemala, lo cual se explicaría por la frecuencia observada del haplogrupo nativo americano Q1a3a en la muestra nicaragüense.

Por otro lado, las poblaciones asiáticas presentan un valor de distancia genética menor que las poblaciones africanas (excepto la población Árabe) con Nicaragua. Estos resultados se explicarían dado el componente amerindio presente en los linajes paternos de la población mestiza de Nicaragua, y que Asia sería el origen de las poblaciones nativo americanas.

En cuanto a las poblaciones africanas, aunque las cuatro poblaciones presentan unos valores de diferenciación elevados con Nicaragua, las poblaciones del norte de África (Árabe y Bereber) muestran los valores más bajos, especialmente la población Árabe. Estos resultados están de acuerdo con la ligera mayor frecuencia del haplogrupo E1b1b, más frecuente en el norte de África, en comparación con E1b1a, el cual está más representado en el oeste africano.

### 3. Cromosoma X

#### 3.1. Parámetros de diversidad e interés forense

El sistema de 10 X-STRs estudiado en el presente trabajo ha proporcionado una diversidad haplotípica muy elevada. No se ha obtenido ningún haplotipo compartido en el total de la muestra (N=165). Por lo tanto, la diversidad haplotípica es 1.

Del mismo modo, la diversidad génica de los distintos X-STRs también fue, en general, elevada. El marcador DXS7133 fue el que mostró unos valores de diversidad más bajos en ambos sexos, tal y como se ha observado en otros estudios (Gomes *et al.* 2009a; Gusmao *et al.* 2009). Contrariamente, el loci más discriminativo fue GATA172D05 (PD hombres = 0,80813, PD mujeres = 0,93313), lo cual también se ha visto en otros trabajos (Edelman *et al.* 2001; Zarrabeitia *et al.* 2009).

Estos parámetros de diversidad derivan en un elevado PD global, que fue de 0,99999727 para hombres y de 0,99999944 para mujeres. La diferencia en el valor del PD entre hombres y mujeres se explica por el hecho de que las mujeres presentan dos copias de cromosoma X, lo cual determina que sea mayor en mujeres. Ambos valores de PD muestran la alta eficiencia forense de estos 10 X-STRs para la población mestiza de Nicaragua.

Cuando calculamos el valor de PE "a priori", observamos que éste varía según tengamos en cuenta el trío padre/madre/hija o al dúo supuesto padre/hija sin datos de la madre. Lógicamente, la PE es inferior si no se dispone de información sobre la madre (PE tríos = 0,99998885, PE dúos = 0,99958036). En el caso de investigación de paternidad de tríos el elevado valor de PE indicaría que no sería necesario el tipado de marcadores adicionales, ya que el sistema de 10 X-STRs sería suficientemente eficaz. Sin embargo, en el caso de investigar la paternidad entre supuesto padre e hija, sí sería recomendable analizar marcadores adicionales para aumentar el poder de discriminación.

Por otro lado, no se han encontrado evidencias significativas de desequilibrio de ligamiento entre los loci estudiados. Esta falta de LD sugiere la ausencia de ligamiento o asociaciones significativas debidas a subestructura genética en la población mestiza de Nicaragua para los marcadores analizados. Por lo tanto, estos marcadores podrían considerarse independientes, y se podría aplicar la regla del producto para el cálculo estadístico del LR correspondiente.

### 3.2. Análisis interpoblacional

Aún existen pocos estudios poblacionales sobre marcadores X-STRs, y en particular, sobre el decaplex analizado. Sin embargo, se seleccionaron varias poblaciones de América, España y África, las cuales sí han sido tipadas para casi todos los marcadores, para el cálculo de distancia genética en base a las frecuencias alélicas de 7 X-STRs.

Los valores de *Fst* son muy bajos para Nicaragua y el resto de poblaciones, sugiriendo una baja diferenciación poblacional. A pesar de ello se puede observar una mayor diferenciación entre la población mestiza de Nicaragua y las poblaciones africanas, en consonancia con las distancias genéticas estimadas para los Y-STRs.

Las poblaciones más similares a Nicaragua serían las poblaciones americanas de Costa Rica, Colombia (Antioquia) y Argentina (Buenos Aires), concordando con los resultados de distancia genética basados en Y-STRs en donde Nicaragua resulta más cercana a las poblaciones mestizas americanas estudiadas. El resto de poblaciones latino americanas y las poblaciones españolas comparadas con Nicaragua reflejan una notable baja diferenciación de Nicaragua, en particular la población del Norte de España. Estos resultados junto con el hecho de que la población mestiza de Nicaragua estudiada se compone de varones, y que el componente paterno (cromosoma Y) ha resultado mayoritariamente europeo (español) y el materno

(ADNmt) amerindio, el cromosoma X debería estar reflejando una ascendencia materna tanto mestiza como amerindia.

Debido a la falta de estudios poblacionales sobre STRs del cromosoma X, no se ha podido comparar la población de Nicaragua con poblaciones nativo americanas, análisis que sería muy interesante para aportar más información sobre el patrón de mezcla genética.

#### **4. STRs autosómicos**

##### 4.1. Parámetros de diversidad e interés forense

Los STRs autosómicos son la herramienta fundamental en los laboratorios forenses dado su alto potencial para la identificación individual. En el presente trabajo se confirma esta eficacia, ya que los valores de diversidad génica de los 15 STRs autosómicos estudiados proporcionan un poder de discriminación y de exclusión global muy elevados ( $PD > 0,999999999$ ;  $PE = 0,99999993$ ). Por lo tanto, este sistema de 15 STRs es una buena herramienta para la discriminación individual en la población mestiza de Nicaragua.

#### **5. Proporciones de mezcla**

El estudio del acervo genético de la población mestiza de Nicaragua ha revelado un patrón de mezcla genética compuesto por un componente europeo mayoritario. Este componente deriva principalmente de los linajes paternos, mientras que los linajes maternos son mayoritariamente de origen nativo americano, confirmando el patrón de emparejamiento asimétrico que se producía durante el período colonial entre mujeres amerindias y varones europeos.

Las proporciones de mezcla basadas en STRs autosómicos muestran una contribución española predominante (69%), seguida por un 20,3% africana y un 10,6% amerindia al acervo genético de la población mestiza de Nicaragua. Proporciones similares de herencia española se han encontrado en mestizos mexicanos (Cerdeira-Flores *et al.* 2002; Rubi-Castellanos *et al.* 2009; Simms *et al.* 2008), y en áreas con una densidad relativamente baja de nativo americanos previa al período colombino (Valle Central de Costa Rica, Medellín en Colombia, y Rio Grande do Sul de Brazil) (Wang *et al.* 2008). Sin embargo, esto

no parece concordar con la situación de Nicaragua, la cual estaba altamente poblada cuando llegaron los españoles (Tous 2003).

Las estimaciones de mezcla obtenidas para el ADNmt contrastan claramente con las obtenidas para el cromosoma Y y los marcadores autosómicos, los cuales muestran un patrón de mezcla similar, en donde predomina el componente euroasiático, seguido del africano y nativo americano.

Un emparejamiento inicial involucrando principalmente varones inmigrantes y mujeres nativo americanas podría explicar las proporciones de mezclas observadas para el ADNmt y el cromosoma Y, pero no para los STRs autosómicos. Por lo tanto, en este contexto, se necesitaría una posterior asimetría en el emparejamiento principalmente entre mujeres mestizas y varones europeos, con un trasfondo de decrecimiento de la población nativo americana, para explicar estos resultados.

Esta hipótesis se vería sustentada por los resultados de distancias genéticas basadas en los X-STRs, ya que la población mestiza de Nicaragua resulta próxima a las poblaciones españolas.

La proporción de herencia africana es también evidente para los marcadores STR autosómicos (20,3%) y cromosoma Y (16,56%). Los valores más elevados de ascendencia africana en cuanto a microsatélites autosómicos y de cromosoma Y se han encontrado en mestizos de áreas caribeñas y sudamericanas con un extenso pasado de inmigración africana (Benn Torres *et al.* 2007; Mendizabal *et al.* 2008; Palha Tde *et al.* 2011; Simms *et al.* 2008; Wang *et al.* 2008; Zuniga *et al.* 2006).

Actualmente, también es notable la proporción de ascendencia africana en Nicaragua en el censo de la población (INIDE 2005). Los grupos afro-indígenas como los Miskitos, Sumus, Garifundas y Ramas se estiman en aproximadamente un 30% de la población nicaragüense principalmente distribuidos en a lo largo de la costa Atlántica.

## CONCLUSIONES

A raíz de los diferentes análisis llevados a cabo en la esta tesis doctoral puede concluirse lo siguiente:

1. El conjunto de 15 STRs autosómicos, 17 Y-STRs y 10 X-STRs estudiados en la población mestiza de Nicaragua son altamente polimórficos. Estos resultados derivan a su vez en un poder de discriminación y de exclusión significativamente elevados, lo cual indica que estos sistemas genéticos son muy apropiados para fines forenses de identificación en la población estudiada.
2. La caracterización genética de la población mestiza de Nicaragua mediante los marcadores estudiados presenta el beneficio adicional de proporcionar nueva información genética para el estudio de la historia humana en las Américas.
3. El análisis del ADNmt ha evidenciado que los linajes nativo americanos actuales de la población mestiza de Nicaragua podrían ser los descendientes de poblaciones de habla uto-azteca y oto-mangue del norte de Mesoamérica, así como de grupos pertenecientes a la familia lingüística Chibcha.
4. La determinación y análisis de los haplogrupos de ADNmt y de cromosoma Y, junto con el estudio de las distancias genéticas con otras poblaciones, ha revelado un componente materno mayoritariamente nativo americano (89%), mientras que los linajes paternos derivarían principalmente de Eurasia (68,75%), particularmente de España. Esto confirma el patrón de emparejamiento asimétrico unidireccional que se producía durante el periodo colonial, el cual involucraba principalmente mujeres nativo americanas y varones españoles. Este patrón también ha sido observado en otras poblaciones de Latino América con historias de colonización similares.
5. Las proporciones de mezcla estimadas en base a los STRs autosómicos también desenmascaran un componente español principal (69%), el cual se explicaría mediante un emparejamiento inicial de mujeres nativas y hombres españoles, seguido de sucesivos emparejamientos de mujeres mestizas con hombres no nativos. Así mismo, esta hipótesis se

vería sustentada por los resultados obtenidos de las distancias genéticas basadas en el análisis de X-STRs.

6. La proporción del componente africano, es considerable en la población mestiza de Nicaragua, tanto en los resultados de mezcla de STRs autosómicos (20,3%) como en el análisis de cromosoma Y (16,56%). Esta observación reflejaría la herencia de colonos españoles con ascendencia norteafricana o la influencia de esclavos africanos traídos a Nicaragua durante el período colonial.

## CONCLUSIONS

The various analyses carried out in this doctoral thesis led to the following conclusions:

1. The 15 autosomal STR, 17 Y-STR and 10 X-STR systems analysed in the Nicaraguan mestizo population are highly polymorphic. Consequently, these genetic markers provide a high discrimination power and exclusion probability results. Thus, forensic analyses with these genetic systems are extremely useful for forensic identification purposes in this population.
2. The genetic characterization of the Nicaraguan mestizo population by means of the studied markers has the ancillary benefit of providing new genetic data for the study of human history in the Americas.
3. The mtDNA sequence data shows that current Native American lineages of Nicaraguan mestizo population could be the descendants of Uto-aztec and Oto-mangue speaking populations from North Mesoamerica and Chibchan-speaking groups.
4. The mtDNA and Y chromosome haplogroup analyses together with the study of genetic distances among populations have shown a predominant Native American maternal component (89%), while paternal lineages belong mainly to Eurasia (68,75%), particularly to Spain. These results confirm the asymmetric unidirectional mating pattern that occurred during colonial times. This pattern have been observed in other Latin American populations, basically involving Amerindian women and Spanish men.
5. The admixture proportions estimated by means of autosomal STRs also identify a main Spanish component (69%), which could be explained by an initial mating between native women and immigrant men, followed by subsequent matings of mestizo women and non-native men. This hypothesis is also supported by the genetic distance results based on X-STRs.
6. The proportion of African ancestry is also quantifiable in the Nicaraguan mestizo population, for both autosomal STRs (20,3%) and Y chromosome (16,56%) results. This observation may reflect the inheritance of Spanish *colonos* with North African ancestry and/or the influence of African slaves brought to Nicaragua during the colonial period.

## REFERENCIAS

- VIII Censo de Población y IV de Vivienda, 2005. 2005. <http://www.inide.gob.ni>
- Achilli A, Perego UA, Bravi CM, Coble MD, Kong QP, Woodward SR, Salas A, Torroni A, y Bandelt HJ. 2008. The phylogeny of the four pan-American mtDNA haplogroups: implications for evolutionary and disease studies. *PLoS ONE* 3(3):e1764.
- Achilli A, Rengo C, Magri C, Battaglia V, Olivieri A, Scozzari R, Cruciani F, Zeviani M, Briem E, Carelli V *et al.* 2004. The molecular dissection of mtDNA haplogroup H confirms that the Franco-Cantabrian glacial refuge was a major source for the European gene pool. *Am J Hum Genet* 75(5):910-918.
- Adams SM, Bosch E, Balaesque PL, Ballereau SJ, Lee AC, Arroyo E, Lopez-Parra AM, Aler M, Grifo MS, Brion M *et al.* 2008. The genetic legacy of religious diversity and intolerance: paternal lineages of Christians, Jews, and Muslims in the Iberian Peninsula. *Am J Hum Genet* 83(6):725-736.
- Afonso Costa H, Carvalho M, Lopes V, Balsa F, Bento AM, Serra A, Andrade L, Anjos MJ, Vide MC, Pantoja S *et al.* 2010. Mitochondrial DNA sequence analysis of a native Bolivian population. *J Forensic Leg Med* 17(5):247-253.
- Ahmadian A, Gharizadeh B, Gustafsson AC, Sterky F, Nyren P, Uhlen M, y Lundeberg J. 2000. Single-nucleotide polymorphism analysis by pyrosequencing. *Anal Biochem* 280(1):103-110.
- Alfonso-Sanchez MA, Cardoso S, Martinez-Bouzas C, Pena JA, Herrera RJ, Castro A, Fernandez-Fernandez I, y De Pancorbo MM. 2008. Mitochondrial DNA haplogroup diversity in Basques: a reassessment based on HVI and HVII polymorphisms. *Am J Hum Biol* 20(2):154-164.
- Allen JF. 1993. Control of gene expression by redox potential and the requirement for chloroplast and mitochondrial genomes. *J Theor Biol* 165(4):609-631.
- Allen M, Engstrom AS, Meyers S, Handt O, Saldeen T, von Haeseler A, Paabo S, y Gyllensten U. 1998. Mitochondrial DNA sequencing of shed hairs and saliva on robbery caps: sensitivity and matching probabilities. *J Forensic Sci* 43(3):453-464.
- Alonso A, Martin P, Albarran C, Garcia P, Fernandez de Simon L, Jesus Iturralde M, Fernandez-Rodriguez A, Atienza I, Capilla J, Garcia-Hirschfeld J *et al.* 2005. Challenges of DNA profiling in mass disaster investigations. *Croat Med J* 46(4):540-548.
- Alvarez JC, Johnson DL, Lorente JA, Martinez-Espin E, Martinez-Gonzalez LJ, Allard M, Wilson MR, y Budowle B. 2007. Characterization of human control region sequences for Spanish individuals in a forensic mtDNA data set. *Leg Med (Tokyo)* 9(6):293-304.
- Alvarez-Iglesias V, Jaime JC, Carracedo A, y Salas A. 2007. Coding region mitochondrial DNA SNPs: targeting East Asian and Native American haplogroups. *Forensic Sci Int Genet* 1(1):44-55.
- Alves C, Gusmao L, Lopez-Parra AM, Soledad Mesa M, Amorim A, y Arroyo-Pardo E. 2005. STR allelic frequencies for an African population sample (Equatorial Guinea) using AmpFISTR Identifiler and Powerplex 16 kits. *Forensic Sci Int* 148(2-3):239-242.

- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F *et al.* 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290(5806):457-465.
- Andreasson H, Asp A, Alderborn A, Gyllensten U, y Allen M. 2002. Mitochondrial sequence analysis for forensic identification using pyrosequencing technology. *Biotechniques* 32(1):124-126, 128, 130-123.
- Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, y Howell N. 1999. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet* 23(2):147.
- Arctander P. 1999. Mitochondrial recombination? *Science* 284(5423):2090-2091.
- Arredi B, Poloni ES, Paracchini S, Zerjal T, Fathallah DM, Makrelouf M, Pascali VL, Novelletto A, y Tyler-Smith C. 2004. A predominantly neolithic origin for Y-chromosomal DNA variation in North Africa. *Am J Hum Genet* 75(2):338-345.
- Arunkumar KP, Metta M, y Nagaraju J. 2006. Molecular phylogeny of silkmoths reveals the origin of domesticated silkmoth, *Bombyx mori* from Chinese *Bombyx mandarina* and paternal inheritance of *Antheraea proylei* mitochondrial DNA. *Mol Phylogenet Evol* 40(2):419-427.
- Athey TW. 2005. Haplogroup prediction from Y-STR values using an allele frequency approach. *J Genet Geneal* 1:1-7.
- Athey TW. 2006. Haplogroup prediction from Y-STR values using a Bayesian-allele-frequency approach. *J Genet Geneal* 2:34-39.
- Avise JC. 1991. Ten unorthodox perspectives on evolution prompted by comparative population genetic findings on mitochondrial DNA. *Annu Rev Genet* 25:45-69.
- Awadalla P, Eyre-Walker A, y Smith JM. 1999. Linkage disequilibrium and recombination in hominid mitochondrial DNA. *Science* 286(5449):2524-2525.
- Ayub Q, Mohyuddin A, Qamar R, Mazhar K, Zerjal T, Mehdi SQ, y Tyler-Smith C. 2000. Identification and characterisation of novel human Y-chromosomal microsatellites from sequence database information. *Nucleic Acids Res* 28(2):e8.
- Bacher J, Schumm, J.W. 1998. Development of Highly Polymorphic Pentanucleotide Tandem Repeat Loci with Low Stutter. *Profiles in DNA* 2(2):3-6.
- Baeta M, Nunez C, Gascon S, Gonzalez-Andrade F, y Martinez Jarreta B. 2010. Analysis of Reduced Size STR Amplicons as Tools for the Study of Degraded DNA. In: Gonzalez-Andrade F, editor. *Forensic Genetics Research Progress*. New York: Nova Publishers. p in press.
- Baeta M, Núñez C, Gonzalez-Andrade F, Sosa C, Casalod Y, Bolea M, Zweynert S, Vacas Cruz OW, Gonzalez-Andrade J, Geppert M *et al.* 2009. Mitochondrial analysis revealed high homogeneity in the Waorani population— The last nomadic group of hunter-gatherers from Ecuador. *Forensic Sci Int: Genetic Supplement Series* 2(1):313-314.
- Balding DJ. 1995. Estimating products in forensic identification using DNA profiles. *Journal of the American Statistical Association* 90:839-844.
- Balding DJ, y Nichols RA. 1994. DNA profile match probability calculation: how to allow for population stratification, relatedness, database selection and single bands. *Forensic Sci Int* 64(2-3):125-140.
- Ballantyne KN, Goedbloed M, Fang R, Schaap O, Lao O, Wollstein A, Choi Y, van Duijn K, Vermeulen M, Brauer S *et al.* 2010. Mutability of Y-

- chromosomal microsatellites: rates, characteristics, molecular bases, and forensic implications. *Am J Hum Genet* 87(3):341-353.
- Ballard DJ, Phillips C, Thacker CR, Robson C, Revoir AP, y Syndercombe Court D. 2005. Y chromosome STR haplotypes in three UK populations. *Forensic Sci Int* 152(2-3):289-305.
- Bamshad M, Wooding S, Salisbury BA, y Stephens JC. 2004. Deconstructing the relationship between genetics and race. *Nat Rev Genet* 5(8):598-609.
- Bandelt HJ, Forster P, y Rohl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16(1):37-48.
- Bandelt HJ, Lahermo P, Richards M, y Macaulay V. 2001. Detecting errors in mtDNA data by phylogenetic analysis. *Int J Legal Med* 115(2):64-69.
- Bandelt HJ, Quintana-Murci L, Salas A, y Macaulay V. 2002. The fingerprint of phantom mutations in mitochondrial DNA data. *Am J Hum Genet* 71(5):1150-1160.
- Bar W, Brinkmann B, Budowle B, Carracedo A, Gill P, Holland M, Lincoln PJ, Mayr W, Morling N, Olaisen B *et al.* 2000. DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics: guidelines for mitochondrial DNA typing. *Int J Legal Med* 113(4):193-196.
- Barnholtz-Sloan JS, McEvoy B, Shriver MD, y Rebbeck TR. 2008. Ancestry estimation and correction for population stratification in molecular epidemiologic association studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17(3):471-477.
- Barr CM, Neiman M, y Taylor DR. 2005. Inheritance and recombination of mitochondrial genomes in plants, fungi and animals. *New Phytol* 168(1):39-50.
- Barrot C, Sanchez C, Ortega M, Gonzalez-Martin A, Brand-Casadevall C, Gorostiza A, Huguet E, Corbella J, y Gene M. 2005. Characterisation of three Amerindian populations from Hidalgo State (Mexico) by 15 STR-PCR polymorphisms. *Int J Legal Med* 119(2):111-115.
- Batista O, Kolman CJ, y Bermingham E. 1995. Mitochondrial DNA diversity in the Kuna Amerinds of Panama. *Hum Mol Genet* 4(5):921-929.
- Baumeister E. 2006. Migración Internacional y desarrollo en Nicaragua. CEPAL Serie Población y Desarrollo 67.
- Becker D, Rodig H, Augustin C, Edelmann J, Gotz F, Hering S, Szibor R, y Brabetz W. 2008. Population genetic evaluation of eight X-chromosomal short tandem repeat loci using Mentype Argus X-8 PCR amplification kit. *Forensic Sci Int Genet* 2(1):69-74.
- Beckman JS, y Weber JL. 1992. Survey of human and rat microsatellites. *Genomics* 12(4):627-631.
- Beleza S, Alves C, Reis F, Amorim A, Carracedo A, y Gusmao L. 2004. 17 STR data (AmpF/STR Identifiler and Powerplex 16 System) from Cabinda (Angola). *Forensic Sci Int* 141(2-3):193-196.
- Beleza S, Gusmao L, Amorim A, Carracedo A, y Salas A. 2005. The genetic legacy of western Bantu migrations. *Hum Genet* 117(4):366-375.
- Bendall KE, y Sykes BC. 1995. Length heteroplasmy in the first hypervariable segment of the human mtDNA control region. *Am J Hum Genet* 57(2):248-256.
- Benn Torres J, Kittles RA, y Stone AC. 2007. Mitochondrial and Y chromosome diversity in the English-speaking Caribbean. *Ann Hum Genet* 71(Pt 6):782-790.

- Bergen AW, Wang CY, Tsai J, Jefferson K, Dey C, Smith KD, Park SC, Tsai SJ, y Goldman D. 1999. An Asian-Native American paternal lineage identified by RPS4Y resequencing and by microsatellite haplotyping. *Ann Hum Genet* 63(Pt 1):63-80.
- Bergstrom CT, y Pritchard J. 1998. Germline bottlenecks and the evolutionary maintenance of mitochondrial genomes. *Genetics* 149(4):2135-2146.
- Bertorelle G, y Excoffier L. 1998. Inferring admixture proportions from molecular data. *Mol Biol Evol* 15(10):1298-1311.
- Bertranpetit J, Sala J, Calafell F, Underhill PA, Moral P, y Comas D. 1995. Human mitochondrial DNA variation and the origin of Basques. *Ann Hum Genet* 59(Pt 1):63-81.
- Bianchi NO, Catanesi CI, Bailliet G, Martinez-Marignac VL, Bravi CM, Vidal-Rioja LB, Herrera RJ, y Lopez-Camelo JS. 1998. Characterization of ancestral and derived Y-chromosome haplotypes of New World native populations. *Am J Hum Genet* 63(6):1862-1871.
- Birky CW, Jr. 1995. Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes: mechanisms and evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(25):11331-11338.
- Blanco-Verea A, Jaime JC, Brion M, y Carracedo A. 2010. Y-chromosome lineages in native South American population. *Forensic Sci Int Genet* 4(3):187-193.
- Bobillo MC, Zimmermann B, Sala A, Huber G, Rock A, Bandelt HJ, Corach D, y Parson W. 2010. Amerindian mitochondrial DNA haplogroups predominate in the population of Argentina: towards a first nationwide forensic mitochondrial DNA sequence database. *Int J Legal Med* 124(4):263-268.
- Bogdanowicz W, Allen M, Branicki W, Lembring M, Gajewska M, y Kupiec T. 2009. Genetic identification of putative remains of the famous astronomer Nicolaus Copernicus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(30):12279-12282.
- Bohossian HB, Skaletsky H, y Page DC. 2000. Unexpectedly similar rates of nucleotide substitution found in male and female hominids. *Nature* 406(6796):622-625.
- Boles TC, Snow CC, y Stover E. 1995. Forensic DNA testing on skeletal remains from mass graves: a pilot project in Guatemala. *J Forensic Sci* 40(3):349-355.
- Bolnick DA, Shook BA, Campbell L, y Goddard I. 2004. Problematic use of Greenberg's linguistic classification of the Americas in studies of Native American genetic variation. *Am J Hum Genet* 75(3):519-522.
- 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(4):336-354.
- Bonatto SL, y Salzano FM. 1997. A single and early migration for the peopling of the Americas supported by mitochondrial DNA sequence data. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(5):1866-1871.
- Bortolini MC, Salzano FM, Thomas MG, Stuart S, Nasanen SP, Bau CH, Hutz MH, Layrisse Z, Petzl-Erler ML, Tsuneto LT *et al.* 2003. Y-chromosome evidence for differing ancient demographic histories in the Americas. *Am J Hum Genet* 73(3):524-539.

- Bosch E, Calafell F, Perez-Lezaun A, Clarimon J, Comas D, Mateu E, Martinez-Arias R, Morera B, Brakez Z, Akhayat O *et al.* 2000. Genetic structure of north-west Africa revealed by STR analysis. *Eur J Hum Genet* 8(5):360-366.
- Bosch E, Calafell F, Rosser ZH, Norby S, Lynnerup N, Hurles ME, y Jobling MA. 2003. High level of male-biased Scandinavian admixture in Greenlandic Inuit shown by Y-chromosomal analysis. *Hum Genet* 112(4):353-363.
- Brandstatter A, Zimmermann B, Wagner J, Gobel T, Rock AW, Salas A, Carracedo A, y Parson W. 2008. Timing and deciphering mitochondrial DNA macro-haplogroup R0 variability in Central Europe and Middle East. *BMC Evol Biol* 8:191.
- Brenner CH, y Weir BS. 2003. Issues and strategies in the DNA identification of World Trade Center victims. *Theor Popul Biol* 63(3):173-178.
- Brown MD, Hosseini SH, Torroni A, Bandelt HJ, Allen JC, Schurr TG, Scozzari R, Cruciani F, y Wallace DC. 1998. mtDNA haplogroup X: An ancient link between Europe/Western Asia and North America? *Am J Hum Genet* 63(6):1852-1861.
- Brown WM. 1980. Polymorphism in mitochondrial DNA of humans as revealed by restriction endonuclease analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77(6):3605-3609.
- Buckleton JS, Curran JM, y Walsh SJ. 2006. How reliable is the sub-population model in DNA testimony? *Forensic Sci Int* 157(2-3):144-148.
- Budimilija ZM, Prinz MK, Zelson-Mundorff A, Wiersema J, Bartelink E, MacKinnon G, Nazzaruolo BL, Estacio SM, Hennessey MJ, y Shaler RC. 2003. World Trade Center human identification project: experiences with individual body identification cases. *Croat Med J* 44(3):259-263.
- Budowle B. 2004. SNP typing strategies. *Forensic Sci Int* 146 Suppl:S139-142.
- Budowle B, Adamowicz M, Aranda XG, Barna C, Chakraborty R, Cheswick D, Dafoe B, Eisenberg A, Frappier R, Gross AM *et al.* 2005. Twelve short tandem repeat loci Y chromosome haplotypes: genetic analysis on populations residing in North America. *Forensic Sci Int* 150(1):1-15.
- Budowle B, Allard MW, Fisher CL, Isenberg AR, Monson KL, Stewart JE, Wilson MR, y Miller KW. 2002. HVI and HVII mitochondrial DNA data in Apaches and Navajos. *Int J Legal Med* 116(4):212-215.
- Budowle B, Allard MW, Wilson MR, y Chakraborty R. 2003a. Forensics and mitochondrial DNA: applications, debates, and foundations. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 4:119-141.
- Budowle B, y Chakraborty R. 2001. Population variation at the CODIS core short tandem repeat loci in Europeans. *Leg Med (Tokyo)* 3(1):29-33.
- Budowle B, Eisenberg AJ, y van Daal A. 2009a. Validity of low copy number typing and applications to forensic science. *Croat Med J* 50(3):207-217.
- Budowle B, Ge J, Aranda XG, Planz JV, Eisenberg AJ, y Chakraborty R. 2009b. Texas population substructure and its impact on estimating the rarity of Y STR haplotypes from DNA evidence\*. *J Forensic Sci* 54(5):1016-1021.
- Budowle B, Ge J, y Chakraborty R. 2007. Basic principles for estimating the rarity of Y-STR haplotypes derived from forensic evidence. Eighteenth International Symposium on Human Identification: Promega Corporation, Madison, Wisconsin.
- Budowle B, Ge J, Low J, Lai C, Yee WH, Law G, Tan WF, Chang YM, Perumal R, Keat PY *et al.* 2009c. The effects of Asian population substructure on Y STR forensic analyses. *Leg Med (Tokyo)* 11(2):64-69.

- Budowle B, Moretti TR, Niezgoda SJ, y Brown BL. 1998. CODIS and PCR-based short tandem repeat loci: law enforcement tools. Proceedings of the Second European Symposium on Human Identification. Innsbruck, Austria: Madison, WI: Promega Corporation. p 73-88.
- Budowle B, Sinha SK, Lee HS, y Chakraborty R. 2003b. Utility of Y-chromosome STR haplotypes in forensic applications. *Forensic Sci Rev* 15:153-164.
- Budowle B, y van Daal A. 2008. Forensically relevant SNP classes. *Biotechniques* 44(5):603-608, 610.
- Burkholder MA, y Johnson LL. 2003. Colonial Latin America. Oxford: Oxford University Press.
- Burzynski A, Zbawicka M, Skibinski DO, y Wenne R. 2006. Doubly uniparental inheritance is associated with high polymorphism for rearranged and recombinant control region haplotypes in Baltic *Mytilus trossulus*. *Genetics* 174(3):1081-1094.
- Butler JM. 2005. *Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers*. New York: Elsevier Academic Press.
- Butler JM. 2006. Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used in human identity testing. *J Forensic Sci* 51(2):253-265.
- Butler JM, Schoske R, Vallone PM, Kline MC, Redd AJ, y Hammer MF. 2002. A novel multiplex for simultaneous amplification of 20 Y chromosome STR markers. *Forensic Sci Int* 129(1):10-24.
- Butler JM, Shen Y, y McCord BR. 2003. The development of reduced size STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA. *J Forensic Sci* 48(5):1054-1064.
- Camacho MV, Benito C, y Figueiras AM. 2007. Allelic frequencies of the 15 STR loci included in the AmpFISTR Identifiler PCR Amplification Kit in an autochthonous sample from Spain. *Forensic Sci Int* 173(2-3):241-245.
- Cann RL, Stoneking M, y Wilson AC. 1987. Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature* 325(6099):31-36.
- Capelli C, Brisighelli F, Scarnicci F, Arredi B, Caglia A, Vetrugno G, Tofanelli S, Onofri V, Tagliabracci A, Paoli G *et al.* 2007. Y chromosome genetic variation in the Italian peninsula is clinal and supports an admixture model for the Mesolithic-Neolithic encounter. *Mol Phylogenet Evol* 44(1):228-239.
- Capelli C, Redhead N, Romano V, Cali F, Lefranc G, Delague V, Megarbane A, Felice AE, Pascali VL, Neophytou PI *et al.* 2006. Population structure in the Mediterranean basin: a Y chromosome perspective. *Ann Hum Genet* 70(Pt 2):207-225.
- Capelli C, Wilson JF, Richards M, Stumpf MP, Gratrix F, Oppenheimer S, Underhill P, Pascali VL, Ko TM, y Goldstein DB. 2001. A predominantly indigenous paternal heritage for the Austronesian-speaking peoples of insular Southeast Asia and Oceania. *Am J Hum Genet* 68(2):432-443.
- Cardoso S, Alfonso-Sanchez MA, Valverde L, Odriozola A, Perez-Miranda AM, Pena JA, y de Pancorbo MM. 2011. The maternal legacy of Basques in northern Navarre: New insights into the mitochondrial DNA diversity of the Franco-Cantabrian area. *Am J Phys Anthropol* 145(3):480-488.
- Carracedo A, D'Aloja E, Dupuy B, Jangblad A, Karjalainen M, Lambert C, Parson W, Pfeiffer H, Pfitzinger H, Sabatier M *et al.* 1998. Reproducibility of mtDNA analysis between laboratories: a report of the European DNA Profiling Group (EDNAP). *Forensic Sci Int* 97(2-3):165-170.

- Carracedo A, Lareu, M.V. 1998. Development of New STRs for Forensic Casework: Criteria for Selection, Sequencing & Population Data and Forensic Validation. Proceedings from the Ninth International Symposium on Human Identification. Madison, Wisconsin: Promega Corporation. p 89-107.
- Carvajal-Carmona LG, Soto ID, Pineda N, Ortiz-Barrientos D, Duque C, Ospina-Duque J, McCarthy M, Montoya P, Alvarez VM, Bedoya G *et al.* 2000. Strong Amerind/white sex bias and a possible Sephardic contribution among the founders of a population in northwest Colombia. *Am J Hum Genet* 67(5):1287-1295.
- Cavalli-Sforza LL. 1997. Genes, peoples, and languages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(15):7719-7724.
- Cavalli-Sforza LL, Menozzi, P., Piazza, A. 1994. The History and Geography of Human Genes. Princeton, NJ: Princeton University Press.
- Cerda-Flores RM, Budowle B, Jin L, Barton SA, Deka R, y Chakraborty R. 2002. Maximum likelihood estimates of admixture in Northeastern Mexico using 13 short tandem repeat loci. *Am J Hum Biol* 14(4):429-439.
- Chakraborty R. 1985. Paternity testing with genetic markers: are Y-linked genes more efficient than autosomal ones? *Am J Med Genet* 21(2):297-305.
- Chakraborty R. 1992. Sample size requirements for addressing the population genetic issues of forensic use of DNA typing. *Hum Biol* 64(2):141-159.
- Chakraborty R, Kimmel M, Stivers DN, Davison LJ, y Deka R. 1997. Relative mutation rates at di-, tri-, and tetranucleotide microsatellite loci. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(3):1041-1046.
- Chakraborty R, Stivers DN, Su B, Zhong Y, y Budowle B. 1999. The utility of short tandem repeat loci beyond human identification: implications for development of new DNA typing systems. *Electrophoresis* 20(8):1682-1696.
- Chandrasekar A, Kumar S, Sreenath J, Sarkar BN, Urade BP, Mallick S, Bandopadhyay SS, Barua P, Barik SS, Basu D *et al.* 2009. Updating phylogeny of mitochondrial DNA macrohaplogroup m in India: dispersal of modern human in South Asian corridor. *PLoS ONE* 4(10):e7447.
- Chen G, Shriner D, Zhou J, Doumatey A, Huang H, Gerry NP, Herbert A, Christman MF, Chen Y, Dunston GM *et al.* 2010. Development of admixture mapping panels for African Americans from commercial high-density SNP arrays. *BMC Genomics* 11:417.
- Chen YS, Torroni A, Excoffier L, Santachiara-Benerecetti AS, y 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(1):133-149.
- CIA. World Factbook. 2011. <http://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/>
- Cina SJ, Collins KA, Pettenati MJ, y Fitts M. 2000. Isolation and identification of female DNA on postcoital penile swabs. *Am J Forensic Med Pathol* 21(2):97-100.
- Clayton TM, Whitaker JP, Fisher DL, Lee DA, Holland MM, Weedn VW, Maguire CN, DiZinno JA, Kimpton CP, y Gill P. 1995a. Further validation of a quadruplex STR DNA typing system: a collaborative effort to identify victims of a mass disaster. *Forensic Sci Int* 76(1):17-25.

- Clayton TM, Whitaker JP, y Maguire CN. 1995b. Identification of bodies from the scene of a mass disaster using DNA amplification of short tandem repeat (STR) loci. *Forensic Sci Int* 76(1):7-15.
- Clement-Jones M, Schiller S, Rao E, Blaschke RJ, Zuniga A, Zeller R, Robson SC, Binder G, Glass I, Strachan T *et al.* 2000. The short stature homeobox gene SHOX is involved in skeletal abnormalities in Turner syndrome. *Hum Mol Genet* 9(5):695-702.
- Coelho M, Sequeira F, Luiselli D, Beleza S, y Rocha J. 2009. On the edge of Bantu expansions: mtDNA, Y chromosome and lactase persistence genetic variation in southwestern Angola. *BMC Evol Biol* 9:80.
- CONCULTURA. 2000. Biblioteca de Historia Salvadoreña, El Salvador, Historia de sus pueblos, villas y ciudades. Consejo Nacional para la Cultura y el Arte.
- Constenla A. 2002. Acerca de la relación genealógica de las lenguas lenca y las lenguas misumalpa. First Archaeological Congress of Nicaragua. *Revista de Filología y Lingüística de la Universidad de Costa Rica* 28:189-205.
- Corach D, Lao O, Bobillo C, van Der Gaag K, Zuniga S, Vermeulen M, van Duijn K, Goedbloed M, Vallone PM, Parson W *et al.* 2010. Inferring continental ancestry of argentineans from Autosomal, Y-chromosomal and mitochondrial DNA. *Ann Hum Genet* 74(1):65-76.
- Corte-Real HB, Macaulay VA, Richards MB, Hariti G, Issad MS, Cambon-Thomsen A, Papiha S, Bertranpetit J, y Sykes BC. 1996. Genetic diversity in the Iberian Peninsula determined from mitochondrial sequence analysis. *Ann Hum Genet* 60(Pt 4):331-350.
- Cosmides LM, y Tooby J. 1981. Cytoplasmic inheritance and intragenomic conflict. *J Theor Biol* 89(1):83-129.
- Crubezy E, Amory S, Keyser C, Bouakaze C, Bodner M, Gibert M, Rock A, Parson W, Alexeev A, y Ludes B. 2010. Human evolution in Siberia: from frozen bodies to ancient DNA. *BMC Evol Biol* 10:25.
- Curran JM, Buckleton JS, y Triggs CM. 2003. What is the magnitude of the subpopulation effect? *Forensic Sci Int* 135(1):1-8.
- Curtin PD. 1969. *The Atlantic Slave Trade: A Census*. Madison: University Wisconsin Press, .
- Davis C, Ge J, Chidambaram A, King J, Turnbough M, Collins M, Dym O, Chakraborty R, Eisenberg AJ, y Budowle B. 2011. Y-STR loci diversity in native Alaskan populations. *Int J Legal Med* 125(4):559-563.
- Dawid IB, y Blackler AW. 1972. Maternal and cytoplasmic inheritance of mitochondrial DNA in *Xenopus*. *Dev Biol* 29(2):152-161.
- de Knijff P. 2000. Messages through bottlenecks: on the combined use of slow and fast evolving polymorphic markers on the human Y chromosome. *Am J Hum Genet* 67(5):1055-1061.
- de Knijff P, Kayser M, Caglia A, Corach D, Fretwell N, Gehrig C, Graziosi G, Heidorn F, Herrmann S, Herzog B *et al.* 1997. Chromosome Y microsatellites: population genetic and evolutionary aspects. *Int J Legal Med* 110(3):134-149.
- Denaro M, Blanc H, Johnson MJ, Chen KH, Wilmsen E, Cavalli-Sforza LL, y Wallace DC. 1981. Ethnic variation in Hpa I endonuclease cleavage patterns of human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(9):5768-5772.

- Deng W, Shi B, He X, Zhang Z, Xu J, Li B, Yang J, Ling L, Dai C, Qiang B *et al.* 2004. Evolution and migration history of the Chinese population inferred from Chinese Y-chromosome evidence. *J Hum Genet* 49(7):339-348.
- Desmarais D, Zhong Y, Chakraborty R, Perreault C, y Busque L. 1998. Development of a highly polymorphic STR marker for identity testing purposes at the human androgen receptor gene (HUMARA). *J Forensic Sci* 43(5):1046-1049.
- Dillehay TD. 1997. *The Archaeological Context and Interpretation*. Washington, DC: Smithsonian Institute Press.
- Dissing J, Binladen J, Hansen A, Sejrsen B, Willerslev E, y Lynnerup N. 2007. The last Viking King: a royal maternity case solved by ancient DNA analysis. *Forensic Sci Int* 166(1):21-27.
- Dixon LA, Murray CM, Archer EJ, Dobbins AE, Koumi P, y Gill P. 2005. Validation of a 21-locus autosomal SNP multiplex for forensic identification purposes. *Forensic Sci Int* 154(1):62-77.
- Dorak MT. Basic population genetics. 2005. <http://dorakmt.tripod.com/genetics/popgen.html>
- Dugoujon JM, Mourrieras B, Senegas MT, Guitard E, Sevin A, Bois E, y Hazout S. 1995. Human genetic diversity (immunoglobulin GM allotypes), linguistic data, and migrations of Amerindian tribes. *Hum Biol* 67(2):231-249.
- Dupanloup I, y Bertorelle G. 2001. Inferring admixture proportions from molecular data: extension to any number of parental populations. *Mol Biol Evol* 18(4):672-675.
- Dyall SD, Brown MT, y Johnson PJ. 2004. Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. *Science* 304(5668):253-257.
- Easton RD, Merriwether DA, Crews DE, y Ferrell RE. 1996. mtDNA variation in the Yanomami: evidence for additional New World founding lineages. *Am J Hum Genet* 59(1):213-225.
- Eberhard WG. 1980. Evolutionary consequences of intracellular organelle competition. *Q Rev Biol* 55(3):231-249.
- Edelman J, Hering S, Michael M, Lessig R, Deischel D, Meier-Sundhausen G, Roewer L, Plate I, y Szibor R. 2001. 16 X-chromosome STR loci frequency data from a German population. *Forensic Sci Int* 124(2-3):215-218.
- Edelmann J, Deichsel D, Hering S, Plate I, y Szibor R. 2002. Sequence variation and allele nomenclature for the X-linked STRs DXS9895, DXS8378, DXS7132, DXS6800, DXS7133, GATA172D05, DXS7423 and DXS8377. *Forensic Sci Int* 129(2):99-103.
- Edwards A, Civitello A, Hammond HA, y Caskey CT. 1991. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am J Hum Genet* 49(4):746-756.
- Edwards A, Hammond HA, Jin L, Caskey CT, y Chakraborty R. 1992. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics* 12(2):241-253.
- Eveitt IW, Bruce, S.W. 1998. *Interpreting DNA evidence: Statistical genetics for forensic scientists*. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Excoffier L, y Langaney A. 1989. Origin and differentiation of human mitochondrial DNA. *Am J Hum Genet* 44(1):73-85.
- Excoffier L, y Lischer HE. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour* 10(3):564-567.

- Excoffier L, Smouse PE, y Quattro JM. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131(2):479-491.
- Eyre-Walker A, Smith NH, y Smith JM. 1999. How clonal are human mitochondria? *Proc Biol Sci* 266(1418):477-483.
- Fagundes NJ, Kanitz R, y Bonatto SL. 2008. A reevaluation of the Native American mtDNA genome diversity and its bearing on the models of early colonization of Beringia. *PLoS ONE* 3(9):e3157.
- Felsenstein J. 2005. PHYLIP (Phylogeny Inference Package). In: Distributed by the author. Department of Genome Sciences UoW, editor. 3.69 ed. Seattle.
- Finnila S, Lehtonen MS, y Majamaa K. 2001. Phylogenetic network for European mtDNA. *Am J Hum Genet* 68(6):1475-1484.
- Flores C, Maca-Meyer N, Gonzalez AM, Oefner PJ, Shen P, Perez JA, Rojas A, Larruga JM, y Underhill PA. 2004. Reduced genetic structure of the Iberian peninsula revealed by Y-chromosome analysis: implications for population demography. *Eur J Hum Genet* 12(10):855-863.
- Foreman LA, y Evett IW. 2001. Statistical analyses to support forensic interpretation for a new ten-locus STR profiling system. *Int J Legal Med* 114(3):147-155.
- Foreman LA, y Lambert JA. 2000. Genetic differentiation within and between four UK ethnic groups. *Forensic Sci Int* 114(1):7-20.
- Foreman LA, Lambert JA, y Evett IW. 1998. Regional genetic variation in Caucasians. *Forensic Sci Int* 95(1):27-37.
- Forster P, Harding R, Torroni A, y Bandelt HJ. 1996. Origin and evolution of Native American mtDNA variation: a reappraisal. *Am J Hum Genet* 59(4):935-945.
- Frank WE, Ellinger ER, y Krishack PA. 2006. Y chromosome STR haplotypes and allele frequencies in Illinois Caucasian, African American, and Hispanic males. *J Forensic Sci* 51(5):1207-1215.
- Fu YX. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147(2):915-925.
- Fuselli S, Tarazona-Santos E, Dupanloup I, Soto A, Luiselli D, y Pettener D. 2003. Mitochondrial DNA diversity in South America and the genetic history of Andean highlanders. *Mol Biol Evol* 20(10):1682-1691.
- Garcia B, Crespillo M, Paredes M, y Valverde JL. 2011. Population data for 10 X-chromosome STRs from north-east of Spain. *Forensic Sci Int Genet*.
- Ge J, Budowle B, Planz JV, Eisenberg AJ, Ballantyne J, y Chakraborty R. 2010. US forensic Y-chromosome short tandem repeats database. *Leg Med (Tokyo)* 12(6):289-295.
- Geppert M, Baeta M, Nunez C, Martinez-Jarreta B, Zweynert S, Cruz OW, Gonzalez-Andrade F, Gonzalez-Solorzano J, Nagy M, y Roewer L. 2011. Hierarchical Y-SNP assay to study the hidden diversity and phylogenetic relationship of native populations in South America. *Forensic Sci Int Genet* 5(2):100-104.
- Giesendorf BA, Vet JA, Tyagi S, Mensink EJ, Trijbels FJ, y Blom HJ. 1998. Molecular beacons: a new approach for semiautomated mutation analysis. *Clin Chem* 44(3):482-486.
- Gilbert MT, Bandelt HJ, Hofreiter M, y Barnes I. 2005. Assessing ancient DNA studies. *Trends Ecol Evol* 20(10):541-544.
- Giles RE, Blanc H, Cann HM, y Wallace DC. 1980. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77(11):6715-6719.

- Gill P, Brenner C, Brinkmann B, Budowle B, Carracedo A, Jobling MA, de Knijff P, Kayser M, Krawczak M, Mayr WR *et al.* 2001. DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics: recommendations on forensic analysis using Y-chromosome STRs. *Forensic Sci Int* 124(1):5-10.
- Gill P, Brenner CH, Buckleton JS, Carracedo A, Krawczak M, Mayr WR, Morling N, Prinz M, Schneider PM, Weir BS *et al.* 2006. DNA commission of the International Society of Forensic Genetics: Recommendations on the interpretation of mixtures. *Forensic Sci Int* 160(2-3):90-101.
- Gill P, Foreman L, Buckleton JS, Triggs CM, y Allen H. 2003. A comparison of adjustment methods to test the robustness of an STR DNA database comprised of 24 European populations. *Forensic Sci Int* 131(2-3):184-196.
- Gill P, Ivanov PL, Kimpton C, Piercy R, Benson N, Tully G, Evett I, Hagelberg E, y Sullivan K. 1994. Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. *Nat Genet* 6(2):130-135.
- Gill P, Jeffreys AJ, y Werrett DJ. 1985. Forensic application of DNA 'fingerprints'. *Nature* 318(6046):577-579.
- Ginther C, Issel-Tarver L, y King MC. 1992. Identifying individuals by sequencing mitochondrial DNA from teeth. *Nat Genet* 2(2):135-138.
- Goebel T, Waters MR, y O'Rourke DH. 2008. The late Pleistocene dispersal of modern humans in the Americas. *Science* 319(5869):1497-1502.
- Gomes I, Alves C, Maxzud K, Pereira R, Prata MJ, Sanchez-Diz P, Carracedo A, Amorim A, y Gusmao L. 2007a. Analysis of 10 X-STRs in three African populations. *Forensic Sci Int Genet* 1(2):208-211.
- Gomes I, Pereira V, Gomes V, Prata MJ, Pinto N, Carracedo A, Amorim A, y Gusmao L. 2009a. The Karimojong from Uganda: genetic characterization using an X-STR decaplex system. *Forensic Sci Int Genet* 3(4):e127-128.
- Gomes I, Prinz M, Pereira R, Bieschke E, Mayr WR, Amorim A, Carracedo A, y Gusmao L. 2009b. X-chromosome STR sequence variation, repeat structure, and nomenclature in humans and chimpanzees. *Int J Legal Med* 123(2):143-149.
- Gomes I, Prinz M, Pereira R, Meyers C, Mikulasovich RS, Amorim A, Carracedo A, y Gusmao L. 2007b. Genetic analysis of three US population groups using an X-chromosomal STR decaplex. *Int J Legal Med* 121(3):198-203.
- Gomes V, Sanchez-Diz P, Amorim A, Carracedo A, y Gusmao L. 2010. Digging deeper into East African human Y chromosome lineages. *Hum Genet* 127(5):603-613.
- Gonser R, Donnelly P, Nicholson G, y Di Rienzo A. 2000. Microsatellite mutations and inferences about human demography. *Genetics* 154(4):1793-1807.
- Gonzalez-Andrade F, Roewer L, Willuweit S, Sanchez D, y Martinez-Jarreta B. 2009a. Y-STR variation among ethnic groups from Ecuador: Mestizos, Kichwas, Afro-Ecuadorians and Waoranis. *Forensic Sci Int Genet* 3(3):e83-91.
- Gonzalez-Andrade F, Sanchez D, Gonzalez-Solorzano J, Gascon S, y Martinez-Jarreta B. 2007. Sex-specific genetic admixture of Mestizos, Amerindian Kichwas, and Afro-Ecuadorans from Ecuador. *Hum Biol* 79(1):51-77.
- Gonzalez-Andrade F, Sanchez D, Penacino G, y Martinez Jarreta B. 2009b. Two fathers for the same child: a deficient paternity case of false inclusion with autosomic STRs. *Forensic Sci Int Genet* 3(2):138-140.

- Goodwin W, Linacre A, y Vanezis P. 1999. The use of mitochondrial DNA and short tandem repeat typing in the identification of air crash victims. *Electrophoresis* 20(8):1707-1711.
- Green LD, Derr JN, y Knight A. 2000. mtDNA affinities of the peoples of North-Central Mexico. *Am J Hum Genet* 66(3):989-998.
- Green RE, Malaspina AS, Krause J, Briggs AW, Johnson PL, Uhler C, Meyer M, Good JM, Maricic T, Stenzel U *et al.* 2008. A complete Neandertal mitochondrial genome sequence determined by high-throughput sequencing. *Cell* 134(3):416-426.
- Greenberg JH. 1987. *Language in the Americas*. Stanford: Stanford University Press.
- Greenberg JH, Turner II, C.G., Zegura, S.L. . 1986. The settlement of the Americas: a comparison of the linguistic, dental and genetic evidence. *Curr Anthropol* 27:477-497.
- Guardado-Estrada M, Juárez-Torres E, Medina-Martínez I, Wegier A, Macías A, Gómez G, Cruz-Talonia F, Roman-Bassaure E, Pinero D, Kofman-Alfaro S *et al.* 2009. A great diversity of Amerindian mitochondrial DNA ancestry is present in the Mexican mestizo population. *J Hum Genet* 54(12):695-705.
- Gunn PR, Trueman K, Stapleton P, y Klarkowski DB. 1997. DNA analysis in disputed parentage: the occurrence of two apparently false exclusions of paternity, both at short tandem repeat (STR) loci, in the one child. *Electrophoresis* 18(9):1650-1652.
- Gusmao L, Alves C, Sánchez-Diz P, y *al. e.* 2008. Results of the GEP-ISFG collaborative study on a X-STR decaplex. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser* 1:677-679.
- Gusmao L, Brion M, González-Neira A, Lareu M, y Carracedo A. 1999. Y chromosome specific polymorphisms in forensic analysis. *Leg Med (Tokyo)* 1(2):55-60.
- Gusmao L, Sánchez-Diz P, Alves C, Gomes I, Zarrabeitia MT, Abovich M, Atmetlla I, Bobillo C, Bravo L, Builes J *et al.* 2009. A GEP-ISFG collaborative study on the optimization of an X-STR decaplex: data on 15 Iberian and Latin American populations. *Int J Legal Med* 123(3):227-234.
- Gyllensten U, Wharton D, y Wilson AC. 1985. Maternal inheritance of mitochondrial DNA during backcrossing of two species of mice. *J Hered* 76(5):321-324.
- Hagelberg E, Goldman N, Lio P, Whelan S, Schiefenhovel W, Clegg JB, y Bowden DK. 1999. Evidence for mitochondrial DNA recombination in a human population of island Melanesia. *Proc Biol Sci* 266(1418):485-492.
- Hagelberg E, Gray IC, y Jeffreys AJ. 1991. Identification of the skeletal remains of a murder victim by DNA analysis. *Nature* 352(6334):427-429.
- Halder I, Shriver M, Thomas M, Fernández JR, y Frudakis T. 2008. A panel of ancestry informative markers for estimating individual biogeographical ancestry and admixture from four continents: utility and applications. *Hum Mutat* 29(5):648-658.
- Hammer MF. 1994. A recent insertion of an alu element on the Y chromosome is a useful marker for human population studies. *Mol Biol Evol* 11(5):749-761.
- Hammer MF. 1995. A recent common ancestry for human Y chromosomes. *Nature* 378(6555):376-378.
- Hammer MF, Karafet TM, Park H, Omoto K, Harihara S, Stoneking M, y Horai S. 2006. Dual origins of the Japanese: common ground for hunter-gatherer and farmer Y chromosomes. *J Hum Genet* 51(1):47-58.

- Hammer MF, Karafet TM, Redd AJ, Jarjanazi H, Santachiara-Benerecetti S, Soodyall H, y Zegura SL. 2001. Hierarchical patterns of global human Y-chromosome diversity. *Mol Biol Evol* 18(7):1189-1203.
- Hammer MF, Zegura, S.L. 1996. The role of the Y chromosome in human evolutionary studies. *Evol Anthropol* 5:116-134.
- Hardy GH. 1908. Mendelian Proportions in a Mixed Population. *Science* 28(706):49-50.
- Harpending HC. 1994. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Hum Biol* 66(4):591-600.
- Harris EE, y Hey J. 1999. X chromosome evidence for ancient human histories. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(6):3320-3324.
- Hauge XY, y Litt M. 1993. A study of the origin of 'shadow bands' seen when typing dinucleotide repeat polymorphisms by the PCR. *Hum Mol Genet* 2(4):411-415.
- Hauswirth WW, y Clayton DA. 1985. Length heterogeneity of a conserved displacement-loop sequence in human mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res* 13(22):8093-8104.
- Hayashi JI, Yonekawa H, Gotoh O, Watanabe J, y Tagashira Y. 1978. Strictly maternal inheritance of rat mitochondrial DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 83(3):1032-1038.
- Hearne CM, y Todd JA. 1991. Tetranucleotide repeat polymorphism at the HPRT locus. *Nucleic Acids Res* 19(19):5450.
- Hedman M, Pimenoff V, Lukka M, Sistonen P, y Sajantila A. 2004. Analysis of 16 Y STR loci in the Finnish population reveals a local reduction in the diversity of male lineages. *Forensic Sci Int* 142(1):37-43.
- Helms M. "Miskito". *Encyclopedia of World Cultures*. 1996. <http://www.encyclopedia.com>
- Helmuth R, Fildes N, Blake E, Luce MC, Chimera J, Madej R, Gorodezky C, Stoneking M, Schmill N, Klitz W *et al.* 1990. HLA-DQ alpha allele and genotype frequencies in various human populations, determined by using enzymatic amplification and oligonucleotide probes. *Am J Hum Genet* 47(3):515-523.
- Hering S, Augustin C, Edelmann J, Heidel M, Dressler J, Rodig H, Kuhlisch E, y Szibor R. 2006. DXS10079, DXS10074 and DXS10075 are STRs located within a 280-kb region of Xq12 and provide stable haplotypes useful for complex kinship cases. *Int J Legal Med* 120(6):337-345.
- Hey J. 1997. Mitochondrial and nuclear genes present conflicting portraits of human origins. *Mol Biol Evol* 14(2):166-172.
- Hoekstra RF. 2000. Evolutionary origin and consequences of uniparental mitochondrial inheritance. *Hum Reprod* 15 Suppl 2:102-111.
- Hoffecker JF, Powers WR, y Goebel T. 1993. The Colonization of Beringia and the Peopling of the New World. *Science* 259(5091):46-53.
- Holland MM, Cave CA, Holland CA, y Bille TW. 2003. Development of a quality, high throughput DNA analysis procedure for skeletal samples to assist with the identification of victims from the World Trade Center attacks. *Croat Med J* 44(3):264-272.
- Holland MM, Fisher DL, Mitchell LG, Rodriguez WC, Canik JJ, Merrill CR, y Weedn VW. 1993. Mitochondrial DNA sequence analysis of human skeletal remains: identification of remains from the Vietnam War. *J Forensic Sci* 38(3):542-553.

- Holland MM, Parsons, T.J. 1999. Mitochondrial DNA sequence analysis—validation and use for forensic casework. *Forensic Sci Rev* 11:21-50.
- Holt IJ, Dunbar DR, y Jacobs HT. 1997. Behaviour of a population of partially duplicated mitochondrial DNA molecules in cell culture: segregation, maintenance and recombination dependent upon nuclear background. *Hum Mol Genet* 6(8):1251-1260.
- Honda K, Roewer L, y de Knijff P. 1999. Male DNA typing from 25-year-old vaginal swabs using Y chromosomal STR polymorphisms in a retrieval request case. *J Forensic Sci* 44(4):868-872.
- Hopwood AJ, Mannucci A, y Sullivan KM. 1996. DNA typing from human faeces. *Int J Legal Med* 108(5):237-243.
- Horai S, Kondo R, Nakagawa-Hattori Y, Hayashi S, Sonoda S, y Tajima K. 1993. Peopling of the Americas, founded by four major lineages of mitochondrial DNA. *Mol Biol Evol* 10(1):23-47.
- Howell N, Kubacka I, y Mackey DA. 1996. How rapidly does the human mitochondrial genome evolve? *Am J Hum Genet* 59(3):501-509.
- Hurles ME, y Jobling MA. 2001. Haploid chromosomes in molecular ecology: lessons from the human Y. *Mol Ecol* 10(7):1599-1613.
- Hutchison CA, Newbold JE, Potter SS, y Edgell MH. 1974. Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. *Nature* 251(5475):536-538.
- Hwa HL, Chang YY, Lee JC, Yin HY, Chen YH, Tseng LH, Su YN, y Ko TM. 2009. Thirteen X-chromosomal short tandem repeat loci multiplex data from Taiwanese. *Int J Legal Med* 123(3):263-269.
- Hwa HL, Tseng LH, Ko TM, Chang YY, Yin HY, Su YN, y Lee JC. 2010. Seventeen Y-chromosomal short tandem repeat haplotypes in seven groups of population living in Taiwan. *Int J Legal Med* 124(4):295-300.
- INIDE. VIII Censo de Población y IV de Vivienda. 2005. <http://www.inide.gob.ni/>
- International Human Genome Sequencing C. 2004. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431(7011):931-945.
- Ivanov PL, Wadhams MJ, Roby RK, Holland MM, Weedn VW, y 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. *Nat Genet* 12(4):417-420.
- Jaruzelska J, Zietkiewicz E, Batzer M, Cole DE, Moisan JP, Scozzari R, Tavare S, y Labuda D. 1999. Spatial and temporal distribution of the neutral polymorphisms in the last ZFX intron: analysis of the haplotype structure and genealogy. *Genetics* 152(3):1091-1101.
- Jeffreys AJ, Allen MJ, Hagelberg E, y Sonnberg A. 1992. Identification of the skeletal remains of Josef Mengele by DNA analysis. *Forensic Sci Int* 56(1):65-76.
- Jeffreys AJ, Wilson V, y Thein SL. 1985a. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature* 314(6006):67-73.
- Jeffreys AJ, Wilson V, y Thein SL. 1985b. Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature* 316(6023):76-79.
- Jin L, Zhong Y, y Chakraborty R. 1994. The exact numbers of possible microsatellite motifs. *Am J Hum Genet* 55(3):582-583.
- Jobling MA. 1994. A survey of long-range DNA polymorphisms on the human Y chromosome. *Hum Mol Genet* 3(1):107-114.
- Jobling MA. 2001a. In the name of the father: surnames and genetics. *Trends Genet* 17(6):353-357.

- Jobling MA. 2001b. Y-chromosomal SNP haplotype diversity in forensic analysis. *Forensic Sci Int* 118(2-3):158-162.
- Jobling MA, y Gill P. 2004. Encoded evidence: DNA in forensic analysis. *Nat Rev Genet* 5(10):739-751.
- Jobling MA, Pandya A, y Tyler-Smith C. 1997. The Y chromosome in forensic analysis and paternity testing. *Int J Legal Med* 110(3):118-124.
- Jobling MA, y Tyler-Smith C. 1995. Fathers and sons: the Y chromosome and human evolution. *Trends Genet* 11(11):449-456.
- Jobling MA, y Tyler-Smith C. 2003. The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age. *Nat Rev Genet* 4(8):598-612.
- Johnson MJ, Wallace DC, Ferris SD, Rattazzi MC, y Cavalli-Sforza LL. 1983. Radiation of human mitochondria DNA types analyzed by restriction endonuclease cleavage patterns. *J Mol Evol* 19(3-4):255-271.
- Jorde LB, y Bamshad M. 2000. Questioning evidence for recombination in human mitochondrial DNA. *Science* 288(5473):1931.
- Jorde LB, Rogers AR, Bamshad M, Watkins WS, Krakowiak P, Sung S, Kere J, y Harpending HC. 1997. Microsatellite diversity and the demographic history of modern humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(7):3100-3103.
- Just RS, Irwin JA, O'Callaghan JE, Saunier JL, Coble MD, Vallone PM, Butler JM, Barritt SM, y Parsons TJ. 2004. Toward increased utility of mtDNA in forensic identifications. *Forensic Sci Int* 146 Suppl:S147-149.
- Kaessmann H, Heissig F, von Haeseler A, y Paabo S. 1999. DNA sequence variation in a non-coding region of low recombination on the human X chromosome. *Nat Genet* 22(1):78-81.
- Kaessmann H, Zollner S, Gustafsson AC, Wiebe V, Laan M, Lundeberg J, Uhlen M, y Paabo S. 2002. Extensive linkage disequilibrium in small human populations in Eurasia. *Am J Hum Genet* 70(3):673-685.
- Kaneda H, Hayashi J, Takahama S, Taya C, Lindahl KF, y Yonekawa H. 1995. Elimination of paternal mitochondrial DNA in intraspecific crosses during early mouse embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(10):4542-4546.
- Karafet T, Xu L, Du R, Wang W, Feng S, Wells RS, Redd AJ, Zegura SL, y Hammer MF. 2001. Paternal population history of East Asia: sources, patterns, and microevolutionary processes. *Am J Hum Genet* 69(3):615-628.
- Karafet T, Zegura SL, Vuturo-Brady J, Posukh O, Osipova L, Wiebe V, Romero F, Long JC, Harihara S, Jin F *et al.* 1997. Y chromosome markers and Trans-Bering Strait dispersals. *Am J Phys Anthropol* 102(3):301-314.
- Karafet TM, Mendez FL, Meilerman MB, Underhill PA, Zegura SL, y Hammer MF. 2008. New binary polymorphisms reshape and increase resolution of the human Y chromosomal haplogroup tree. *Genome Res* 18(5):830-838.
- Karafet TM, Osipova LP, Gubina MA, Posukh OL, Zegura SL, y Hammer MF. 2002. High levels of Y-chromosome differentiation among native Siberian populations and the genetic signature of a boreal hunter-gatherer way of life. *Hum Biol* 74(6):761-789.
- Karafet TM, Zegura SL, Posukh O, Osipova L, Bergen A, Long J, Goldman D, Klitz W, Harihara S, de Knijff P *et al.* 1999. Ancestral Asian source(s) of new world Y-chromosome founder haplotypes. *Am J Hum Genet* 64(3):817-831.
- Kayser M, Brauer S, Willuweit S, Schadlich H, Batzer MA, Zawacki J, Prinz M, Roewer L, y Stoneking M. 2002. Online Y-chromosomal short tandem repeat haplotype reference database (YHRD) for U.S. populations. *J Forensic Sci* 47(3):513-519.

- Kayser M, Caglia A, Corach D, Fretwell N, Gehrig C, Graziosi G, Heidorn F, Herrmann S, Herzog B, Hidding M *et al.* 1997. Evaluation of Y-chromosomal STRs: a multicenter study. *Int J Legal Med* 110(3):125-133, 141-129.
- Kayser M, y de Knijff P. 2011. Improving human forensics through advances in genetics, genomics and molecular biology. *Nat Rev Genet* 12(3):179-192.
- Kayser M, Kittler R, Eler A, Hedman M, Lee AC, Mohyuddin A, Mehdi SQ, Rosser Z, Stoneking M, Jobling MA *et al.* 2004. A comprehensive survey of human Y-chromosomal microsatellites. *Am J Hum Genet* 74(6):1183-1197.
- Kayser M, Krawczak M, Excoffier L, Dieltjes P, Corach D, Pascali V, Gehrig C, Bernini LF, Jespersen J, Bakker E *et al.* 2001. An extensive analysis of Y-chromosomal microsatellite haplotypes in globally dispersed human populations. *Am J Hum Genet* 68(4):990-1018.
- Kayser M, Lao O, Anslinger K, Augustin C, Bargel G, Edelmann J, Elias S, Heinrich M, Henke J, Henke L *et al.* 2005. Significant genetic differentiation between Poland and Germany follows present-day political borders, as revealed by Y-chromosome analysis. *Hum Genet* 117(5):428-443.
- Kayser M, Roewer L, Hedman M, Henke L, Henke J, Brauer S, Kruger C, Krawczak M, Nagy M, Dobosz T *et al.* 2000. Characteristics and frequency of germline mutations at microsatellite loci from the human Y chromosome, as revealed by direct observation in father/son pairs. *Am J Hum Genet* 66(5):1580-1588.
- Keyser-Tracqui C, Ricaut FX, Blandin P, y Ludes B. 2003. French allele frequencies and haplotypes of nine Y-specific STRs. *J Forensic Sci* 48(1):242-244.
- Kimpton C, Fisher D, Watson S, Adams M, Urquhart A, Lygo J, y Gill P. 1994. Evaluation of an automated DNA profiling system employing multiplex amplification of four tetrameric STR loci. *Int J Legal Med* 106(6):302-311.
- Kimpton CP, Oldroyd NJ, Watson SK, Frazier RR, Johnson PE, Millican ES, Urquhart A, Sparkes BL, y Gill P. 1996. Validation of highly discriminating multiplex short tandem repeat amplification systems for individual identification. *Electrophoresis* 17(8):1283-1293.
- Kivisild T, Reidla M, Metspalu E, Rosa A, Brehm A, Pennarun E, Parik J, Geberhiwot T, Usanga E, y Villems R. 2004. Ethiopian mitochondrial DNA heritage: tracking gene flow across and around the gate of tears. *Am J Hum Genet* 75(5):752-770.
- Kloss-Brandstatter A, Pacher D, Schonherr S, Weissensteiner H, Binna R, Specht G, y Kronenberg F. 2011. HaploGrep: a fast and reliable algorithm for automatic classification of mitochondrial DNA haplogroups. *Hum Mutat* 32(1):25-32.
- Kolman CJ, y Bermingham E. 1997. Mitochondrial and nuclear DNA diversity in the Choco and Chibcha Amerinds of Panama. *Genetics* 147(3):1289-1302.
- Kolman CJ, Bermingham E, Cooke R, Ward RH, Arias TD, y Guionneau-Sinclair F. 1995. Reduced mtDNA diversity in the Ngobe Amerinds of Panama. *Genetics* 140(1):275-283.
- Kong A, Gudbjartsson DF, Sainz J, Jonsdottir GM, Gudjonsson SA, Richardsson B, Sigurdardottir S, Barnard J, Hallbeck B, Masson G *et al.* 2002. A high-resolution recombination map of the human genome. *Nat Genet* 31(3):241-247.

- Krawczak M. 2001. Forensic evaluation of Y-STR haplotype matches: a comment. *Forensic Sci Int* 118(2-3):114-115.
- Krawczak M. 2007. Kinship testing with X-chromosomal markers: mathematical and statistical issues. *Forensic Sci Int Genet* 1(2):111-114.
- Krenke BE, Viculis L, Richard ML, Prinz M, Milne SC, Ladd C, Gross AM, Gornall T, Frappier JR, Eisenberg AJ *et al.* 2005. Validation of male-specific, 12-locus fluorescent short tandem repeat (STR) multiplex. *Forensic Sci Int* 151(1):111-124.
- Kumar S, Hedrick P, Dowling T, y Stoneking M. 2000. Questioning evidence for recombination in human mitochondrial DNA. *Science* 288(5473):1931.
- Kvist L, Martens J, Nazarenko AA, y Orell M. 2003. Paternal leakage of mitochondrial DNA in the great tit (*Parus major*). *Mol Biol Evol* 20(2):243-247.
- Kyriakouli DS, Boesch P, Taylor RW, y Lightowlers RN. 2008. Progress and prospects: gene therapy for mitochondrial DNA disease. *Gene Ther* 15(14):1017-1023.
- Laan M, Wiebe V, Khusnutdinova E, Remm M, y Paabo S. 2005. X-chromosome as a marker for population history: linkage disequilibrium and haplotype study in Eurasian populations. *Eur J Hum Genet* 13(4):452-462.
- Ladika S. 2005. South Asia tsunami. DNA helps identify missing in the tsunami zone. *Science* 307(5709):504.
- Ladoukakis ED, y Zouros E. 2001. Direct evidence for homologous recombination in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) mitochondrial DNA. *Mol Biol Evol* 18(7):1168-1175.
- Landsteiner K. 1900. Zur Kenntnis der antifermentativen, lytischen und agglutinierenden Wirkungen des Blutserums und der Lymphe. *Zentralbl Bakteriol* 27:357-362.
- Lao O, Vallone PM, Coble MD, Diegoli TM, van Oven M, van der Gaag KJ, Pijpe J, de Knijff P, y Kayser M. 2010. Evaluating self-declared ancestry of U.S. Americans with autosomal, Y-chromosomal and mitochondrial DNA. *Hum Mutat* 31(12):E1875-1893.
- Leclair B, Fregeau CJ, Bowen KL, y Fournery RM. 2004. Enhanced kinship analysis and STR-based DNA typing for human identification in mass fatality incidents: the Swissair flight 111 disaster. *J Forensic Sci* 49(5):939-953.
- Lee HY, Chung U, Yoo JE, Park MJ, y Shin KJ. 2004. Quantitative and qualitative profiling of mitochondrial DNA length heteroplasmy. *Electrophoresis* 25(1):28-34.
- Lee HY, Song I, Ha E, Cho SB, Yang WI, y Shin KJ. 2008. mtDNAManager: a Web-based tool for the management and quality analysis of mitochondrial DNA control-region sequences. *BMC Bioinformatics* 9:483.
- Lell JT, Brown MD, Schurr TG, Sukernik RI, Starikovskaya YB, Torroni A, Moore LG, Troup GM, y Wallace DC. 1997. Y chromosome polymorphisms in native American and Siberian populations: identification of native American Y chromosome haplotypes. *Hum Genet* 100(5-6):536-543.
- Lell JT, Sukernik RI, Starikovskaya YB, Su B, Jin L, Schurr TG, Underhill PA, y Wallace DC. 2002. The dual origin and Siberian affinities of Native American Y chromosomes. *Am J Hum Genet* 70(1):192-206.
- Lessig R, Willuweit S, Krawczak M, Wu FC, Pu CE, Kim W, Henke L, Henke J, Miranda J, Hidding M *et al.* 2003. Asian online Y-STR Haplotype Reference Database. *Leg Med (Tokyo)* 5 Suppl 1:S160-163.

- Lessig R, Zoledziewska M, Fahr K, Edelmann J, Kostrzewa M, Dobosz T, y Kleemann WJ. 2005. Y-SNP-genotyping - a new approach in forensic analysis. *Forensic Sci Int* 154(2-3):128-136.
- Levinson G, y Gutman GA. 1987. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol Biol Evol* 4(3):203-221.
- Lewis MP. 2009. *Ethnologue: Languages of the World*. Dallas, TX: SIL International.
- Li J, Butler JM, Tan Y, Lin H, Royer S, Ohler L, Shaler TA, Hunter JM, Pollart DJ, Monforte JA *et al*. 1999. Single nucleotide polymorphism determination using primer extension and time-of-flight mass spectrometry. *Electrophoresis* 20(6):1258-1265.
- Li L, Li C, Zhang S, Zhao S, Liu Y, y Lin Y. 2010. Analysis of 14 highly informative SNP markers on X chromosome by TaqMan SNP genotyping assay. *Forensic Sci Int Genet* 4(5):e145-148.
- Li WH, Yi S, y Makova K. 2002. Male-driven evolution. *Curr Opin Genet Dev* 12(6):650-656.
- Library IADC. <http://library.jid.org/en/countrystudies.htm>
- Livak KJ. 1999. Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. *Genet Anal* 14(5-6):143-149.
- Lovo-Gomez J, Blanco-Verea A, Lareu MV, Brion M, y Carracedo A. 2007. The genetic male legacy from El Salvador. *Forensic Sci Int* 171(2-3):198-203.
- Lunt DH, y Hyman BC. 1997. Animal mitochondrial DNA recombination. *Nature* 387(6630):247.
- Lutz S, Wittig H, Weisser HJ, Heizmann J, Junge A, Dimo-Simonin N, Parson W, Edelmann J, Anslinger K, Jung S *et al*. 2000. Is it possible to differentiate mtDNA by means of HVIII in samples that cannot be distinguished by sequencing the HVI and HVII regions? *Forensic Sci Int* 113(1-3):97-101.
- Lygo JE, Johnson PE, Holdaway DJ, Woodroffe S, Whitaker JP, Clayton TM, Kimpton CP, y Gill P. 1994. The validation of short tandem repeat (STR) loci for use in forensic casework. *Int J Legal Med* 107(2):77-89.
- Lyon MF. 1961. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature* 190:372-373.
- Macaulay V, Hill C, Achilli A, Rengo C, Clarke D, Meehan W, Blackburn J, Semino O, Scozzari R, Cruciani F *et al*. 2005. Single, rapid coastal settlement of Asia revealed by analysis of complete mitochondrial genomes. *Science* 308(5724):1034-1036.
- Macaulay V, Richards M, Hickey E, Vega E, Cruciani F, Guida V, Scozzari R, Bonne-Tamir B, Sykes B, y Torroni A. 1999a. The emerging tree of West Eurasian mtDNAs: a synthesis of control-region sequences and RFLPs. *Am J Hum Genet* 64(1):232-249.
- Macaulay V, Richards M, y Sykes B. 1999b. Mitochondrial DNA recombination-no need to panic. *Proc Biol Sci* 266(1433):2037-2039; discussion 2041-2032.
- Mahtani MM, y Willard HF. 1993. A polymorphic X-linked tetranucleotide repeat locus displaying a high rate of new mutation: implications for mechanisms of mutation at short tandem repeat loci. *Hum Mol Genet* 2(4):431-437.
- Malhi RS, y Smith DG. 2002. Brief communication: Haplogroup X confirmed in prehistoric North America. *Am J Phys Anthropol* 119(1):84-86.
- Malyarchuk BA, Rogozin IB, Berikov VB, y Derenko MV. 2002. Analysis of phylogenetically reconstructed mutational spectra in human mitochondrial DNA control region. *Hum Genet* 111(1):46-53.

- Marjanovic D, Durmic-Pasic A, Bakal N, Haveric S, Kalamujic B, Kovacevic L, Ramic J, Pojskic N, Skaro V, Projic P *et al.* 2007. DNA identification of skeletal remains from the World War II mass graves uncovered in Slovenia. *Croat Med J* 48(4):513-519.
- Martin P, Garcia-Hirschfeld J, Garcia O, Gusmao L, Garcia P, Albarran C, Sancho M, y Alonso A. 2004. A Spanish population study of 17 Y-chromosome STR loci. *Forensic Sci Int* 139(2-3):231-235.
- Martinez H, Rodriguez-Larralde A, Izaguirre MH, y De Guerra DC. 2007. Admixture estimates for Caracas, Venezuela, based on autosomal, Y-chromosome, and mtDNA markers. *Hum Biol* 79(2):201-213.
- Martinez-Cruz B, Vitalis R, Segurel L, Austerlitz F, Georges M, They S, Quintana-Murci L, Hegay T, Aldashev A, Nasyrova F *et al.* 2011. In the heartland of Eurasia: the multilocus genetic landscape of Central Asian populations. *Eur J Hum Genet* 19(2):216-223.
- Martinez-Gonzalez LJ, Saiz M, Alvarez-Cubero MJ, Gomez-Martin A, Alvarez JC, Martinez-Labarga C, y Lorente JA. 2011. Distribution of Y chromosomal STRs loci in Mayan and Mestizo populations from Guatemala. *Forensic Sci Int Genet.*
- Martinez-Jarreta B. 1999. *La prueba del ADN en Medicina Forense*. Barcelona: Masson. 341 p.
- Martinez-Jarreta B, Vasquez P, Abecia E, Budowle B, Luna A, y Peiro F. 2005. Characterization of 17 Y-STR loci in a population from El Salvador (San Salvador, Central America) and their potential for DNA profiling. *J Forensic Sci* 50(5):1243-1246.
- Mathias N, Bayes M, y Tyler-Smith C. 1994. Highly informative compound haplotypes for the human Y chromosome. *Hum Mol Genet* 3(1):115-123.
- McEvoy BP, Powell JE, Goddard ME, y Visscher PM. 2011. Human population dispersal "Out of Africa" estimated from linkage disequilibrium and allele frequencies of SNPs. *Genome Res.*
- McPherson JD, Marra M, Hillier L, Waterston RH, Chinwalla A, Wallis J, Sekhon M, Wylie K, Mardis ER, Wilson RK *et al.* 2001. A physical map of the human genome. *Nature* 409(6822):934-941.
- Melton PE, Briceno I, Gomez A, Devor EJ, Bernal JE, y Crawford MH. 2007. Biological relationship between Central and South American Chibchan speaking populations: evidence from mtDNA. *Am J Phys Anthropol* 133(1):753-770.
- Mendizabal I, Sandoval K, Berniell-Lee G, Calafell F, Salas A, Martinez-Fuentes A, y Comas D. 2008. Genetic origin, admixture, and asymmetry in maternal and paternal human lineages in Cuba. *BMC Evol Biol* 8:213.
- Merrill T, ed. *Nicaragua: A Country Study*. 1994. <http://lcweb2.loc.gov/frd/cs/nitoc.html>
- Merriwether DA. 1993. Mitochondrial DNA variation in South American Indians. PhD dissertation. Pittsburgh: University of Pittsburgh.
- Merriwether DA, Clark AG, Ballinger SW, Schurr TG, Soodyall H, Jenkins T, Sherry ST, y Wallace DC. 1991. The structure of human mitochondrial DNA variation. *J Mol Evol* 33(6):543-555.
- Merriwether DA, Huston S, Iyengar S, Hamman R, Norris JM, Shetterly SM, Kamboh MI, y Ferrell RE. 1997. Mitochondrial versus nuclear admixture estimates demonstrate a past history of directional mating. *Am J Phys Anthropol* 102(2):153-159.

- Merriwether DA, Rothhammer F, y Ferrell RE. 1995. Distribution of the four founding lineage haplotypes in Native Americans suggests a single wave of migration for the New World. *Am J Phys Anthropol* 98(4):411-430.
- Mesa NR, Mondragon MC, Soto ID, Parra MV, Duque C, Ortiz-Barrientos D, Garcia LF, Velez ID, Bravo ML, Munera JG *et al.* 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(5):1277-1286.
- Meusel MS, y Moritz RF. 1993. Transfer of paternal mitochondrial DNA during fertilization of honeybee (*Apis mellifera* L.) eggs. *Curr Genet* 24(6):539-543.
- Meyer S, Weiss G, y von Haeseler A. 1999. Pattern of nucleotide substitution and rate heterogeneity in the hypervariable regions I and II of human mtDNA. *Genetics* 152(3):1103-1110.
- Mishmar D, Ruiz-Pesini E, Golik P, Macaulay V, Clark AG, Hosseini S, Brandon M, Easley K, Chen E, Brown MD *et al.* 2003. Natural selection shaped regional mtDNA variation in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(1):171-176.
- Mohyuddin A, Ayub Q, Qamar R, Zerjal T, Helgason A, Mehdi SQ, y Tyler-Smith C. 2001. Y-chromosomal STR haplotypes in Pakistani populations. *Forensic Sci Int* 118(2-3):141-146.
- Mulero JJ, Chang CW, Calandro LM, Green RL, Li Y, Johnson CL, y Hennessy LK. 2006. Development and validation of the AmpFISTR Yfiler PCR amplification kit: a male specific, single amplification 17 Y-STR multiplex system. *J Forensic Sci* 51(1):64-75.
- Muller HJ. 1964. The Relation of Recombination to Mutational Advance. *Mutat Res* 106:2-9.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, y Erlich H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1:263-273.
- Murch RS, y Budowle B. 1986. Applications of isoelectric focusing in forensic serology. *J Forensic Sci* 31(3):869-880.
- Myres NM, Rootsi S, Lin AA, Jarve M, King RJ, Kutuev I, Cabrera VM, Khusnutdinova EK, Pshenichnov A, Yunusbayev B *et al.* 2011. A major Y-chromosome haplogroup R1b Holocene era founder effect in Central and Western Europe. *Eur J Hum Genet* 19(1):95-101.
- Nachman MW, Bauer VL, Crowell SL, y Aquadro CF. 1998. DNA variability and recombination rates at X-linked loci in humans. *Genetics* 150(3):1133-1141.
- Nachman MW, y Crowell SL. 2000. Estimate of the mutation rate per nucleotide in humans. *Genetics* 156(1):297-304.
- Nakahori Y, Yamada M, y Nakagome Y. 1989. Very low rate Y-chromosome mosaicism (1:5,400) detectable by a novel probe enzyme combination. *Jinrui Idengaku Zasshi* 34(3):203-208.
- Nassir R, Kosoy R, Tian C, White PA, Butler LM, Silva G, Kittles R, Alarcon-Riquelme ME, Gregersen PK, Belmont JW *et al.* 2009. An ancestry informative marker set for determining continental origin: validation and extension using human genome diversity panels. *BMC Genet* 10:39.
- Nei N. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. New York: Columbia University Press.
- NRC. 1996. *The evaluation of forensic evidence*. Washington, DC.

- Nunez C, Sosa C, Baeta M, Geppert M, Turnbough M, Phillips N, Casalod Y, Bolea M, Roby R, Budowle B *et al.* 2011. Genetic analysis of 7 medieval skeletons from the Aragonese Pyrenees. *Croat Med J* 52(3):336-343.
- O'Rourke DH, y Raff JA. 2010. The human genetic history of the Americas: the final frontier. *Curr Biol* 20(4):R202-207.
- Olaisen B, Stenersen M, y Mevag B. 1997. Identification by DNA analysis of the victims of the August 1996 Spitsbergen civil aircraft disaster. *Nat Genet* 15(4):402-405.
- Oota H, Settheetham-Ishida W, Tiwawech D, Ishida T, y Stoneking M. 2001. Human mtDNA and Y-chromosome variation is correlated with matrilineal versus patrilineal residence. *Nat Genet* 29(1):20-21.
- Ott J. 1999. *Analysis of Human Genetic Linkage*. Baltimore: The Johns Hopkins University Press.
- Pagano S, Sans M, Pimenoff V, Cantera AM, Alvarez JC, Lorente JA, Peco JM, Mones P, y Sajantila A. 2005. Assessment of HV1 and HV2 mtDNA variation for forensic purposes in an Uruguayan population sample. *J Forensic Sci* 50(5):1239-1242.
- Page RDM. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12:357-358.
- Palanichamy MG, Sun C, Agrawal S, Bandelt HJ, Kong QP, Khan F, Wang CY, Chaudhuri TK, Palla V, y Zhang YP. 2004. Phylogeny of mitochondrial DNA macrohaplogroup N in India, based on complete sequencing: implications for the peopling of South Asia. *Am J Hum Genet* 75(6):966-978.
- Palencia L, Valverde L, Alvarez A, Caine LM, Cardoso S, Alfonso-Sanchez MA, Pinheiro MF, y de Pancorbo MM. 2010. Mitochondrial DNA diversity in a population from Santa Catarina (Brazil): predominance of the European input. *Int J Legal Med* 124(4):331-336.
- Palha Tde J, Ribeiro-Rodrigues EM, Ribeiro-dos-Santos A, Guerreiro JF, de Moura LS, y Santos S. 2011. Male ancestry structure and interethnic admixture in African-descent communities from the Amazon as revealed by Y-chromosome Strs. *Am J Phys Anthropol* 144(3):471-478.
- Parson W, y Bandelt HJ. 2007. Extended guidelines for mtDNA typing of population data in forensic science. *Forensic Sci Int Genet* 1(1):13-19.
- Parson W, Brandstatter A, Alonso A, Brandt N, Brinkmann B, Carracedo A, Corach D, Froment O, Furac I, Grzybowski T *et al.* 2004. The EDNAP mitochondrial DNA population database (EMPOP) collaborative exercises: organisation, results and perspectives. *Forensic Sci Int* 139(2-3):215-226.
- Parson W, y Dur A. 2007. EMPOP--a forensic mtDNA database. *Forensic Sci Int Genet* 1(2):88-92.
- Parsons TJ, y Coble MD. 2001. Increasing the forensic discrimination of mitochondrial DNA testing through analysis of the entire mitochondrial DNA genome. *Croat Med J* 42(3):304-309.
- Parsons TJ, y Irwin JA. 2000. Questioning evidence for recombination in human mitochondrial DNA. *Science* 288(5473):1931.
- Parsons TJ, Muniec DS, Sullivan K, Woodyatt N, Alliston-Greiner R, Wilson MR, Berry DL, Holland KA, Weedn VW, Gill P *et al.* 1997. A high observed substitution rate in the human mitochondrial DNA control region. *Nat Genet* 15(4):363-368.

- Perego UA, Achilli A, Angerhofer N, Accetturo M, Pala M, Olivieri A, Kashani BH, Ritchie KH, Scozzari R, Kong QP *et al.* 2009. Distinctive Paleo-Indian migration routes from Beringia marked by two rare mtDNA haplogroups. *Curr Biol* 19(1):1-8.
- Pereira L, Richards M, Goios A, Alonso A, Albarran C, Garcia O, Behar DM, Golge M, Hatina J, Al-Gazali L *et al.* 2005. High-resolution mtDNA evidence for the late-glacial resettlement of Europe from an Iberian refugium. *Genome Res* 15(1):19-24.
- Pereira V, Tomas C, Amorim A, Morling N, Gusmao L, y Prata MJ. 2010. Study of 25 X-chromosome SNPs in the Portuguese. *Forensic Sci Int Genet.*
- Perez-Lezaun A, Calafell F, Mateu E, Comas D, Ruiz-Pacheco R, y Bertranpetit J. 1997. Microsatellite variation and the differentiation of modern humans. *Hum Genet* 99(1):1-7.
- Phillips C, Prieto L, Fondevila M, Salas A, Gomez-Tato A, Alvarez-Dios J, Alonso A, Blanco-Verea A, Brion M, Montesino M *et al.* 2009. Ancestry analysis in the 11-M Madrid bomb attack investigation. *PLoS ONE* 4(8):e6583.
- Poetsch M, Ludcke C, Repenning A, Fischer L, Malyusz V, Simeoni E, Lignitz E, Oehmichen M, y von Wurmb-Schwark N. 2006. The problem of single parent/child paternity analysis--practical results involving 336 children and 348 unrelated men. *Forensic Sci Int* 159(2-3):98-103.
- Poloni ES, Semino O, Passarino G, Santachiara-Benerecetti AS, Dupanloup I, Langaney A, y Excoffier L. 1997. Human genetic affinities for Y-chromosome P49a,f/TaqI haplotypes show strong correspondence with linguistics. *Am J Hum Genet* 61(5):1015-1035.
- Prinz M, Boll K, Baum H, y Shaler B. 1997. Multiplexing of Y chromosome specific STRs and performance for mixed samples. *Forensic Sci Int* 85(3):209-218.
- Prinz M, y Sansone M. 2001. Y chromosome-specific short tandem repeats in forensic casework. *Croat Med J* 42(3):288-291.
- Quintana-Murci L, Bigham A, Rouba H, Barakat A, McElreavey K, y Hammer M. 2004. Y-chromosomal STR haplotypes in Berber and Arabic-speaking populations from Morocco. *Forensic Sci Int* 140(1):113-115.
- Rand RM, y Robinson JE. *Criminal Victimization In The United States, 2008-Statistical Tables.* 2011.
- Rasmussen M, Li Y, Lindgreen S, Pedersen JS, Albrechtsen A, Moltke I, Metspalu M, Metspalu E, Kivisild T, Gupta R *et al.* 2010. Ancient human genome sequence of an extinct Palaeo-Eskimo. *Nature* 463(7282):757-762.
- Raymond M, y Rousset F. 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution* 49(6):1280-1283.
- Redd AJ, Agellon AB, Kearney VA, Contreras VA, Karafet T, Park H, de Knijff P, Butler JM, y Hammer MF. 2002. Forensic value of 14 novel STRs on the human Y chromosome. *Forensic Sci Int* 130(2-3):97-111.
- Reich DE, y Goldstein DB. 1998. Genetic evidence for a Paleolithic human population expansion in Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(14):8119-8123.
- Richards M, Corte-Real H, Forster P, Macaulay V, Wilkinson-Herbots H, Demaine A, Papiha S, Hedges R, Bandelt HJ, y Sykes B. 1996. Paleolithic and neolithic lineages in the European mitochondrial gene pool. *Am J Hum Genet* 59(1):185-203.
- Richards M, y Macaulay V. 2001. The mitochondrial gene tree comes of age. *Am J Hum Genet* 68(6):1315-1320.

- Richards M, Macaulay V, Hickey E, Vega E, Sykes B, Guida V, Rengo C, Sellitto D, Cruciani F, Kivisild T *et al.* 2000. Tracing European founder lineages in the Near Eastern mtDNA pool. *Am J Hum Genet* 67(5):1251-1276.
- Richards M, Macaulay V, Torroni A, y Bandelt HJ. 2002. In search of geographical patterns in European mitochondrial DNA. *Am J Hum Genet* 71(5):1168-1174.
- Rickards O, Martinez-Labarga C, Lum JK, De Stefano GF, y 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(2):519-530.
- Rodig H, Grum M, y Grimmecke HD. 2007. Population study and evaluation of 20 Y-chromosome STR loci in Germans. *Int J Legal Med* 121(1):24-27.
- Rodriguez-Delfin LA, Rubin-de-Celis VE, y 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(1-2):97-106.
- Roewer L, Arnemann J, Spurr NK, Grzeschik KH, y Epplen JT. 1992. Simple repeat sequences on the human Y chromosome are equally polymorphic as their autosomal counterparts. *Hum Genet* 89(4):389-394.
- Roewer L, Croucher PJ, Willuweit S, Lu TT, Kayser M, Lessig R, de Knijff P, Jobling MA, Tyler-Smith C, y Krawczak M. 2005. Signature of recent historical events in the European Y-chromosomal STR haplotype distribution. *Hum Genet* 116(4):279-291.
- Roewer L, y Epplen JT. 1992. Rapid and sensitive typing of forensic stains by PCR amplification of polymorphic simple repeat sequences in case work. *Forensic Sci Int* 53(2):163-171.
- Roewer L, Kayser M, Dieltjes P, Nagy M, Bakker E, Krawczak M, y de Knijff P. 1996. Analysis of molecular variance (AMOVA) of Y-chromosome-specific microsatellites in two closely related human populations. *Hum Mol Genet* 5(7):1029-1033.
- Rogers AR, y Harpending H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol Biol Evol* 9(3):552-569.
- Rolf B, Keil W, Brinkmann B, Roewer L, y Fimmers R. 2001. Paternity testing using Y-STR haplotypes: assigning a probability for paternity in cases of mutations. *Int J Legal Med* 115(1):12-15.
- Romero RE, Briceno I, Lizarazo Rdel P, Willuweit S, Roewer L, y Gomez A. 2008. A Colombian Caribbean population study of 16 Y-chromosome STR loci. *Forensic Sci Int Genet* 2(2):e5-8.
- Rootsi S, Magri C, Kivisild T, Benuzzi G, Help H, Bermisheva M, Kutuev I, Barac L, Pericic M, Balanovsky O *et al.* 2004. Phylogeography of Y-chromosome haplogroup I reveals distinct domains of prehistoric gene flow in Europe. *Am J Hum Genet* 75(1):128-137.
- Rosa A, Ornelas C, Brehm A, y Villems R. 2006. Population data on 11 Y-chromosome STRs from Guine-Bissau. *Forensic Sci Int* 157(2-3):210-217.
- Ross MT, Grafham DV, Coffey AJ, Scherer S, McLay K, Muzny D, Platzer M, Howell GR, Burrows C, Bird CP *et al.* 2005. The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature* 434(7031):325-337.
- Rosser ZH, Zerjal T, Hurles ME, Adojaan M, Alavantic D, Amorim A, Amos W, Armenteros M, Arroyo E, Barbujani G *et al.* 2000. Y-chromosomal diversity in Europe is clinal and influenced primarily by geography, rather than by language. *Am J Hum Genet* 67(6):1526-1543.

- Rout L. 1976. The African experience in Spanish America: 1502 to the present days. Cambridge, England: Cambridge University Press.
- Rubi-Castellanos R, Martinez-Cortes G, Munoz-Valle JF, Gonzalez-Martin A, Cerda-Flores RM, Anaya-Palafox M, y Rangel-Villalobos H. 2009. Pre-Hispanic Mesoamerican demography approximates the present-day ancestry of Mestizos throughout the territory of Mexico. *Am J Phys Anthropol* 139(3):284-294.
- Rubicz R, Schurr TG, Babb PL, y Crawford MH. 2003. Mitochondrial DNA variation and the origins of the Aleuts. *Hum Biol* 75(6):809-835.
- Sabeti PC, Reich DE, Higgins JM, Levine HZ, Richter DJ, Schaffner SF, Gabriel SB, Platko JV, Patterson NJ, McDonald GJ *et al.* 2002. Detecting recent positive selection in the human genome from haplotype structure. *Nature* 419(6909):832-837.
- Sagan L. 1967. On the origin of mitosing cells. *J Theor Biol* 14(3):255-274.
- Saitou N, y Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4(4):406-425.
- Salas A, Acosta A, Alvarez-Iglesias V, Cerezo M, Phillips C, Lareu MV, y Carracedo A. 2008. The mtDNA ancestry of admixed Colombian populations. *Am J Hum Biol* 20(5):584-591.
- Salas A, Bandelt HJ, Macaulay V, y Richards MB. 2007. Phylogeographic investigations: the role of trees in forensic genetics. *Forensic Sci Int* 168(1):1-13.
- Salas A, Lovo-Gomez J, Alvarez-Iglesias V, Cerezo M, Lareu MV, Macaulay V, Richards MB, y Carracedo A. 2009. Mitochondrial echoes of first settlement and genetic continuity in El Salvador. *PLoS ONE* 4(9):e6882.
- Salas A, Richards M, Lareu MV, Scozzari R, Coppa A, Torroni A, Macaulay V, y Carracedo A. 2004. The African diaspora: mitochondrial DNA and the Atlantic slave trade. *Am J Hum Genet* 74(3):454-465.
- Salzano FM, y Bortolini MC. 2002. The Evolution and Genetics of Latin American Populations. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Sanchez-Albornoz N. 1974. The Population of Latin America: A History. Berkeley: Univeristy California Press.
- Sánchez-Albornoz N. 1977. La población de América Latina: desde los tiempos precolombinos al año 2000. Madrid: Alianza Editorial. 321 p.
- Sandoval K, Buentello-Malo L, Penaloza-Espinosa R, Avelino H, Salas A, Calafell F, y Comas D. 2009. Linguistic and maternal genetic diversity are not correlated in Native Mexicans. *Hum Genet* 126(4):521-531.
- Santos C, Montiel R, Sierra B, Bettencourt C, Fernandez E, Alvarez L, Lima M, Abade A, y Aluja MP. 2005. Understanding differences between phylogenetic and pedigree-derived mtDNA mutation rate: a model using families from the Azores Islands (Portugal). *Mol Biol Evol* 22(6):1490-1505.
- Santos FR, Pandya A, Tyler-Smith C, Pena SD, Schanfield M, Leonard WR, Osipova L, Crawford MH, y Mitchell RJ. 1999. The central Siberian origin for native American Y chromosomes. *Am J Hum Genet* 64(2):619-628.
- Santos M, Ward RH, y Barrantes R. 1994. mtDNA variation in the Chibcha Amerindian Huetar from Costa Rica. *Hum Biol* 66(6):963-977.
- Santos NP, Ribeiro-Rodrigues EM, Ribeiro-Dos-Santos AK, Pereira R, Gusmao L, Amorim A, Guerreiro JF, Zago MA, Matte C, Hutz MH *et al.* 2010. Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-

- insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. *Hum Mutat* 31(2):184-190.
- Schaffner SF. 2004. The X chromosome in population genetics. *Nat Rev Genet* 5(1):43-51.
- Schmitt R, Bonatto SL, Freitas LB, Muschner VC, Hill K, Hurtado AM, y Salzano FM. 2004. Extremely limited mitochondrial DNA variability among the Ache Natives of Paraguay. *Ann Hum Biol* 31(1):87-94.
- Scholz M, Giddings I, y Pusch CM. 1998. A polymerase chain reaction inhibitor of ancient hard and soft tissue DNA extracts is determined as human collagen type I. *Anal Biochem* 259(2):283-286.
- Schurr TG. 2000. Mitochondrial DNA and the Peopling of the New World. *American Scientist* 88(3).
- Schurr TG, y Sherry ST. 2004. Mitochondrial DNA and Y chromosome diversity and the peopling of the Americas: evolutionary and demographic evidence. *Am J Hum Biol* 16(4):420-439.
- Schurr TG, Sukernik RI, Starikovskaya YB, y 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):1-39.
- Schwartz M, y Vissing J. 2002. Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *N Engl J Med* 347(8):576-580.
- Seielstad M. 2000. Asymmetries in the maternal and paternal genetic histories of Colombian populations. *Am J Hum Genet* 67(5):1062-1066.
- Seielstad M, Yuldasheva N, Singh N, Underhill P, Oefner P, Shen P, y Wells RS. 2003. A novel Y-chromosome variant puts an upper limit on the timing of first entry into the Americas. *Am J Hum Genet* 73(3):700-705.
- Seielstad MT, Hebert JM, Lin AA, Underhill PA, Ibrahim M, Vollrath D, y Cavalli-Sforza LL. 1994. Construction of human Y-chromosomal haplotypes using a new polymorphic A to G transition. *Hum Mol Genet* 3(12):2159-2161.
- Seielstad MT, Minch E, y Cavalli-Sforza LL. 1998. Genetic evidence for a higher female migration rate in humans. *Nat Genet* 20(3):278-280.
- Séjourné L. 1972. América Latina. Antiguas culturas precolombinas. Madrid: Historia Universal Siglo XXI.
- Semino O, Magri C, Benuzzi G, Lin AA, Al-Zahery N, Battaglia V, Maccioni L, Triantaphyllidis C, Shen P, Oefner PJ *et al.* 2004. Origin, diffusion, and differentiation of Y-chromosome haplogroups E and J: inferences on the neolithization of Europe and later migratory events in the Mediterranean area. *Am J Hum Genet* 74(5):1023-1034.
- Semino O, Passarino G, Oefner PJ, Lin AA, Arbuzova S, Beckman LE, De Benedictis G, Francalacci P, Kouvatsi A, Limborska S *et al.* 2000. The genetic legacy of Paleolithic Homo sapiens sapiens in extant Europeans: a Y chromosome perspective. *Science* 290(5494):1155-1159.
- Semino O, Santachiara-Benerecetti AS, Falaschi F, Cavalli-Sforza LL, y Underhill PA. 2002. Ethiopians and Khoisan share the deepest clades of the human Y-chromosome phylogeny. *Am J Hum Genet* 70(1):265-268.
- Shi H, Zhong H, Peng Y, Dong YL, Qi XB, Zhang F, Liu LF, Tan SJ, Ma RZ, Xiao CJ *et al.* 2008. Y chromosome evidence of earliest modern human settlement in East Asia and multiple origins of Tibetan and Japanese populations. *BMC Biol* 6:45.
- Shields GF, Schmiechen AM, Frazier BL, Redd A, Voevoda MI, Reed JK, y Ward RH. 1993. mtDNA sequences suggest a recent evolutionary divergence

- for Beringian and northern North American populations. *Am J Hum Genet* 53(3):549-562.
- Simms TM, Garcia C, Mirabal S, McCartney Q, y Herrera RJ. 2008. The genetic legacy of the Transatlantic Slave Trade in the island of New Providence. *Forensic Sci Int Genet* 2(4):310-317.
- Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R, y Goodfellow PN. 1990. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346(6281):240-244.
- Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum HS, Hillier L, Brown LG, Repping S, Pyntikova T, Ali J, Bieri T *et al.* 2003. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature* 423(6942):825-837.
- Sosa C, y Martínez-Jarreta B. 2010. The study of ancient DNA in Forensic Genetics. In: Gonzalez-Andrade F, editor. *Forensic Genetics Research Progress*. New York: Nova Science Publishers. p 151-171.
- Stefflova K, Dulik MC, Barnholtz-Sloan JS, Pai AA, Walker AH, y Rebbeck TR. 2011. Dissecting the within-Africa ancestry of populations of African descent in the Americas. *PLoS ONE* 6(1):e14495.
- Stern C. 1943. The Hardy-Weinberg Law. *Science* 97(2510):137-138.
- Stone AC, Starrs JE, y Stoneking M. 2001. Mitochondrial DNA analysis of the presumptive remains of Jesse James. *J Forensic Sci* 46(1):173-176.
- Stone AC, y Stoneking M. 1999. Analysis of ancient DNA from a prehistoric Amerindian cemetery. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354(1379):153-159.
- Stumpf MP, y Goldstein DB. 2001. Genealogical and evolutionary inference with the human Y chromosome. *Science* 291(5509):1738-1742.
- Su B, Jin L, Underhill P, Martinson J, Saha N, McGarvey ST, Shriver MD, Chu J, Oefner P, Chakraborty R *et al.* 2000. Polynesian origins: insights from the Y chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(15):8225-8228.
- Sutlovic D, Definis Gojanovic M, Andelinovic S, Gugic D, y Primorac D. 2005. Taq polymerase reverses inhibition of quantitative real time polymerase chain reaction by humic acid. *Croat Med J* 46(4):556-562.
- Sutovsky P, Moreno RD, Ramalho-Santos J, Dominko T, Simerly C, y Schatten G. 2000. Ubiquitinated sperm mitochondria, selective proteolysis, and the regulation of mitochondrial inheritance in mammalian embryos. *Biol Reprod* 63(2):582-590.
- Szathmary EJ. 1993. mtDNA and the peopling of the Americas. *Am J Hum Genet* 53(4):793-799.
- Szibor R. 2007. X-chromosomal markers: past, present and future. *Forensic Sci Int Genet* 1(2):93-99.
- Szibor R, Hering S, y Edelmann J. 2006. A new Web site compiling forensic chromosome X research is now online. *Int J Legal Med* 120(4):252-254.
- Szibor R, Hering S, Kuhlisch E, Plate I, Demberger S, Krawczak M, y Edelmann J. 2005. Haplotyping of STR cluster DXS6801-DXS6809-DXS6789 on Xq21 provides a powerful tool for kinship testing. *Int J Legal Med* 119(6):363-369.
- Szibor R, Krawczak M, Hering S, Edelmann J, Kuhlisch E, y Krause D. 2003. Use of X-linked markers for forensic purposes. *Int J Legal Med* 117(2):67-74.
- Taanman JW. 1999. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta* 1410(2):103-123.

- Tajima F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123(3):585-595.
- Tamm E, Kivisild T, Reidla M, Metspalu M, Smith DG, Mulligan CJ, Bravi CM, Rickards O, Martinez-Labarga C, Khusnutdinova EK *et al.* 2007. Beringian standstill and spread of Native American founders. *PLoS ONE* 2(9):e829.
- Tang Y, Manfredi G, Hirano M, y Schon EA. 2000. Maintenance of human rearranged mitochondrial DNAs in long-term cultured transmitochondrial cell lines. *Mol Biol Cell* 11(7):2349-2358.
- Tarazona-Santos E, y Santos FR. 2002. The peopling of the Americas: a second major migration? *Am J Hum Genet* 70(5):1377-1380; author reply 1380-1371.
- Templeton AR. 1993. The "Eve" Hypothesis: A Genetic Critique and Reanalysis. *American Anthropologist* 95:51-72.
- Tereba A. 1999. Tools for analysis of population statistics. *Profiles in DNA* Promega 2(3):14-16.
- Theologidis I, Saavedra C, y Zouros E. 2007. No evidence for absence of paternal mtDNA in male progeny from pair matings of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Genetics* 176(2):1367-1369.
- Thompson WE, Ramalho-Santos J, y Sutovsky P. 2003. Ubiquitination of prohibitin in mammalian sperm mitochondria: possible roles in the regulation of mitochondrial inheritance and sperm quality control. *Biol Reprod* 69(1):254-260.
- Thomson R, Pritchard JK, Shen P, Oefner PJ, y Feldman MW. 2000. Recent common ancestry of human Y chromosomes: evidence from DNA sequence data. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(13):7360-7365.
- Thyagarajan B, Padua RA, y Campbell C. 1996. Mammalian mitochondria possess homologous DNA recombination activity. *J Biol Chem* 271(44):27536-27543.
- Tillmar AO, Mostad P, Egeland T, Lindblom B, Holmlund G, y Montelius K. 2008. Analysis of linkage and linkage disequilibrium for eight X-STR markers. *Forensic Sci Int Genet* 3(1):37-41.
- Tomas C, Sanchez JJ, Barbaro A, Brandt-Casadevall C, Hernandez A, Ben Dhiab M, Ramon M, y Morling N. 2008. X-chromosome SNP analyses in 11 human Mediterranean populations show a high overall genetic homogeneity except in North-west Africans (Moroccans). *BMC Evol Biol* 8:75.
- Tomas C, Sanchez JJ, Castro JA, Borsting C, y Morling N. 2010. Forensic usefulness of a 25 X-chromosome single-nucleotide polymorphism marker set. *Transfusion* 50(10):2258-2265.
- Torrioni A, Huoponen K, Francalacci P, Petrozzi M, Morelli L, Scozzari R, Obinu D, Savontaus ML, y Wallace DC. 1996. Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations. *Genetics* 144(4):1835-1850.
- Torrioni A, Neel JV, Barrantes R, Schurr TG, y Wallace DC. 1994. Mitochondrial DNA "clock" for the Amerinds and its implications for timing their entry into North America. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(3):1158-1162.
- Torrioni A, Schurr TG, Cabell MF, Brown MD, Neel JV, Larsen M, Smith DG, Vullo CM, y Wallace DC. 1993. Asian affinities and continental radiation of the four founding Native American mtDNAs. *Am J Hum Genet* 53(3):563-590.
- Torrioni A, Schurr TG, Yang CC, Szathmary EJ, Williams RC, Schanfield MS, Troup GA, Knowler WC, Lawrence DN, Weiss KM *et al.* 1992. Native American

- mitochondrial DNA analysis indicates that the Amerind and the Nadene populations were founded by two independent migrations. *Genetics* 130(1):153-162.
- Tous M. 2003. De la Gran Nicoya precolombina a la Provincia de Nicaragua, siglos XV y XVI. Barcelona: Universitat de Barcelona.
- Triggs CM, y Buckleton JS. 2002. Logical implications of applying the principles of population genetics to the interpretation of DNA profiling evidence. *Forensic Sci Int* 128(3):108-114.
- Tully G, Sullivan KM, Nixon P, Stones RE, y Gill P. 1996. Rapid detection of mitochondrial sequence polymorphisms using multiplex solid-phase fluorescent minisequencing. *Genomics* 34(1):107-113.
- Underhill PA. 2003. Inferring human history: clues from Y-chromosome haplotypes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 68:487-493.
- Underhill PA, Jin L, Lin AA, Mehdi SQ, Jenkins T, Vollrath D, Davis RW, Cavalli-Sforza LL, y Oefner PJ. 1997. Detection of numerous Y chromosome biallelic polymorphisms by denaturing high-performance liquid chromatography. *Genome Res* 7(10):996-1005.
- Underhill PA, Jin L, Zemens R, Oefner PJ, y Cavalli-Sforza LL. 1996. A pre-Columbian Y chromosome-specific transition and its implications for human evolutionary history. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(1):196-200.
- Underhill PA, y Kivisild T. 2007. Use of y chromosome and mitochondrial DNA population structure in tracing human migrations. *Annu Rev Genet* 41:539-564.
- Underhill PA, Myres NM, Rootsi S, Metspalu M, Zhivotovsky LA, King RJ, Lin AA, Chow CE, Semino O, Battaglia V *et al.* 2010. Separating the post-Glacial coancestry of European and Asian Y chromosomes within haplogroup R1a. *Eur J Hum Genet* 18(4):479-484.
- Underhill PA, Passarino G, Lin AA, Shen P, Mirazon Lahr M, Foley RA, Oefner PJ, y Cavalli-Sforza LL. 2001. The phylogeography of Y chromosome binary haplotypes and the origins of modern human populations. *Ann Hum Genet* 65(Pt 1):43-62.
- Underhill PA, Shen P, Lin AA, Jin L, Passarino G, Yang WH, Kauffman E, Bonne-Tamir B, Bertranpetit J, Francalacci P *et al.* 2000. Y chromosome sequence variation and the history of human populations. *Nat Genet* 26(3):358-361.
- van Oven M, y Kayser M. 2009. Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Hum Mutat* 30(2):E386-394.
- Vasquez P. 2002. Epidemiología molecular de marcadores genéticos de tipo microsatélite autosómicos y de cromosoma Y en la población de El Salvador. Aplicaciones médico-forenses. Zaragoza: Universidad de Zaragoza.
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA *et al.* 2001. The sequence of the human genome. *Science* 291(5507):1304-1351.
- Vigilant L, Stoneking M, Harpending H, Hawkes K, y Wilson AC. 1991. African populations and the evolution of human mitochondrial DNA. *Science* 253(5027):1503-1507.
- von Heijne G. 1986. Why mitochondria need a genome. *FEBS Lett* 198(1):1-4.
- Vona G, Falchi A, Moral P, Calo CM, y Varesi L. 2005. Mitochondrial sequence variation in the Guahibo Amerindian population from Venezuela. *Am J Phys Anthropol* 127(3):361-369.

- Wallace DC. 1982. Structure and evolution of organelle genomes. *Microbiol Rev* 46(2):208-240.
- Wallace DC. 1995. 1994 William Allan Award Address. Mitochondrial DNA variation in human evolution, degenerative disease, and aging. *Am J Hum Genet* 57(2):201-223.
- Wallace DC. 2005. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet* 39:359-407.
- Wallace DC, Brown MD, y Lott MT. 1999. Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. *Gene* 238(1):211-230.
- Walsh PS, Fildes NJ, y Reynolds R. 1996. Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA. *Nucleic Acids Res* 24(14):2807-2812.
- Walsh PS, Metzger DA, y Higuchi R. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10(4):506-513.
- Walter RC, Buffler RT, Bruggemann JH, Guillaume MM, Berhe SM, Negassi B, Libsekal Y, Cheng H, Edwards RL, von Cosel R *et al.* 2000. Early human occupation of the Red Sea coast of Eritrea during the last interglacial. *Nature* 405(6782):65-69.
- Wang S, Ray N, Rojas W, Parra MV, Bedoya G, Gallo C, Poletti G, Mazzotti G, Hill K, Hurtado AM *et al.* 2008. Geographic patterns of genome admixture in Latin American Mestizos. *PLoS Genet* 4(3):e1000037.
- Ward RH, Frazier BL, Dew-Jager K, y Paabo S. 1991. Extensive mitochondrial diversity within a single Amerindian tribe. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(19):8720-8724.
- Ward RH, Redd A, Valencia D, Frazier B, y Paabo S. 1993. Genetic and linguistic differentiation in the Americas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(22):10663-10667.
- Waters MR, y Stafford TW, Jr. 2007. Redefining the age of Clovis: implications for the peopling of the Americas. *Science* 315(5815):1122-1126.
- Weber JL, y Wong C. 1993. Mutation of human short tandem repeats. *Hum Mol Genet* 2(8):1123-1128.
- White DJ, Wolff JN, Pierson M, y Gemmell NJ. 2008. Revealing the hidden complexities of mtDNA inheritance. *Mol Ecol* 17(23):4925-4942.
- White PS, Tatum OL, Deaven LL, y Longmire JL. 1999. New, male-specific microsatellite markers from the human Y chromosome. *Genomics* 57(3):433-437.
- Whitfield LS, Sulston JE, y Goodfellow PN. 1995. Sequence variation of the human Y chromosome. *Nature* 378(6555):379-380.
- Wilson IG. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol* 63(10):3741-3751.
- Wright S. 1922. Coefficients of inbreeding and relationship. *The American Naturalist* 56:330-338.
- Wright S. 1965. The interpretation of population structure by Fstatistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 19(3):395-420.
- Wu W, Pan L, Hao H, Zheng X, Lin J, y Lu D. 2011. Population genetics of 17 Y-STR loci in a large Chinese Han population from Zhejiang Province, Eastern China. *Forensic Sci Int Genet* 5(1):e11-13.
- YCC. 2002. A nomenclature system for the tree of human Y-chromosomal binary haplogroups. *Genome Res* 12(2):339-348.

- YHRD. Y Chromosome haplotype reference database. <http://www.yhrd.org>
- Zabala Fernandez WM, Borjas-Fajardo L, Fernandez Salgado E, Castillo C, Socca L, Portillo MG, Sanchez MA, Delgado W, Morales-Machin A, Layrisse Z *et al.* 2005. Use of short tandem repeats loci to study the genetic structure of several populations from Zulia State, Venezuela. *Am J Hum Biol* 17(4):451-459.
- Zarrabeitia MT, Mijares V, y Riancho JA. 2007. Forensic efficiency of microsatellites and single nucleotide polymorphisms on the X chromosome. *Int J Legal Med* 121(6):433-437.
- Zarrabeitia MT, Pinheiro F, de Pancorbo MM, Caine L, Cardoso S, Gusmao L, y Riancho JA. 2009. Analysis of 10 X-linked tetranucleotide markers in mixed and isolated populations. *Forensic Sci Int Genet* 3(2):63-66.
- Zegura SL, Karafet TM, Zhivotovsky LA, y Hammer MF. 2004. High-resolution SNPs and microsatellite haplotypes point to a single, recent entry of Native American Y chromosomes into the Americas. *Mol Biol Evol* 21(1):164-175.
- Zerjal T, Dashnyam B, Pandya A, Kayser M, Roewer L, Santos FR, Schiefenhover W, Fretwell N, Jobling MA, Harihara S *et al.* 1997. Genetic relationships of Asians and Northern Europeans, revealed by Y-chromosomal DNA analysis. *Am J Hum Genet* 60(5):1174-1183.
- Zhivotovsky LA, Rosenberg NA, y Feldman MW. 2003. Features of evolution and expansion of modern humans, inferred from genomewide microsatellite markers. *Am J Hum Genet* 72(5):1171-1186.
- Zietkiewicz E, Yotova V, Jarnik M, Korab-Laskowska M, Kidd KK, Modiano D, Scozzari R, Stoneking M, Tishkoff S, Batzer M *et al.* 1998. Genetic structure of the ancestral population of modern humans. *J Mol Evol* 47(2):146-155.
- Zuniga J, Ilzarbe M, Acunha-Alonzo V, Rosetti F, Herbert Z, Romero V, Almeciga I, Clavijo O, Stern JN, Granados J *et al.* 2006. Allele frequencies for 15 autosomal STR loci and admixture estimates in Puerto Rican Americans. *Forensic Sci Int* 164(2-3):266-270.





Anexo 1. Continuación.

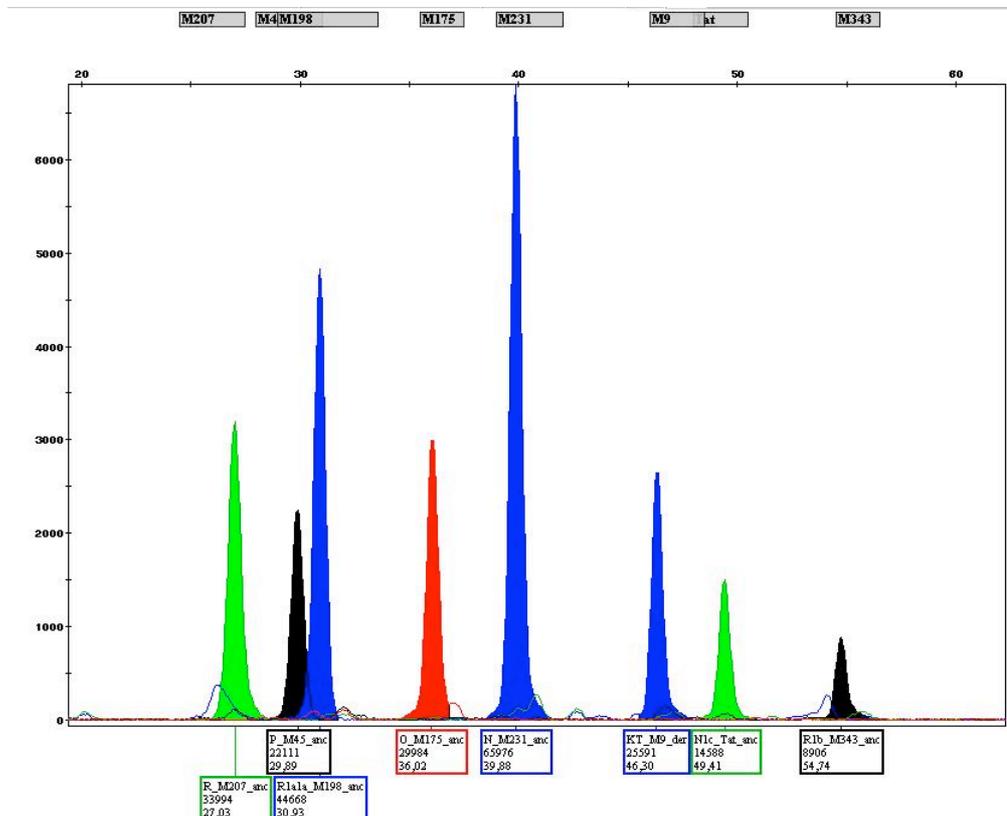
ID	Haplogrupo	HVSI (16024-16365)	HVSIII (60-340)
106	B4	16182C 16183C 16189C 16217C	73G 152C 263G 306dCCC 315.1C
107	A2	16111T 16187T 16223T 16290T 16319A 16362C	64T 73G 146C 153G 235G 263G 315.1C
108	A2	16111T 16187T 16223T 16290T 16319A 16362C	64T 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
109	A2	16111T 16223T 16290T 16299G 16319A 16362C	64T 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 309.2C 315.1C
110	A2	16111T 16126C 16223T 16290T 16319A 16362C	64T 73G 143A 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
111	A2	16111T 16126C 16187T 16189C 16209C 16223T 16290T 16319A 16362C	64T 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
112	A2	16111T 16193T 16223T 16290T 16319A 16362C	64T 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
113	A2	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C	73G 146C 152C 235G 263G 309.1C 309.2C 315.1C
114	A2	16111T 16182C 16183C 16189C 16223T 16290T 16319A 16362C	64T 73G 146C 153G 235G 263G 315.1C
115	A2	16111T 16187T 16223T 16290T 16319A 16362C	64T 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
116	B4	16183C 16189C 16193.1C 16207G 16217C	73G 152C 263G 309.1C 309.2C 315.1C
117	B4	16183C 16189C 16207G 16217C	73G 152C 263G 315.1C
118	B4	16183C 16189C 16193.1C 16207G 16217C	73G 152C 263G 309.1C 309.2C 315.1C
119	A2	16108Y 16111T 16126C 16209C 16223T 16290T 16319A 16362C	64T 73G 146C 153G 198T 235G 263G 309.1C 315.1C
120	A2	16223T 16240G 16274A 16290T 16294T 16319A 16362C	64T 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
121	B4	16183C 16189C 16193.1C 16217C	73G 204C 263G 309.1C 309.2C 315.1C
122	A2	16111T 16187T 16189C 16223T 16290T 16319A 16362C	64T 73G 146C 235G 263G 309.1C 315.1C
123	A2	16111T 16223T 16290T 16299G 16319A 16362C	64T 73G 146C 153G 188G 235G 263G 309.1C 315.1C
124	A2	16111T 16187T 16223T 16290T 16319A 16362C	64T 73G 146C 153G 235G 263G 315.1C
125	A2	16111T 16223T 16290T 16319A 16360T 16362C	97A 106dGGAGCA 146C 151T 153G 235G 263G 309.1C 309.2C 315.1C
126	A2	16051G 16111T 16223T 16290T 16319A 16362C	64T 73G 146C 235G 263G 309.1C 315.1C
127	L3h	16129A 16172C 16174T 16192T 16218T 16223T 16256A 16311C 16362C	73G 151T 152C 189C 195C 263G 294C 315.1C
128	B4	16183C 16189C 16193.1C 16217C	73G 150T 263G 309.2C 315.1C
129	A2	16111T 16187T 16223T 16290T 16319A 16362C	64T 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 309.2C 315.1C
130	A2	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C	64T 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
132	L0a	16129A 16148T 16168T 16172C 16187T 16188G 16189C 16223T 16230G 16311C 16320T	64T 93G 185A 189G 200G 247A 263G 315.1C
133	A2	16111T 16187T 16223T 16290T 16319A 16362C	64T 73G 146C 153G 235G 263G 310C
134	A2	16111T 16223T 16290T 16299G 16319A 16362C	64T 73G 146C 153G 235G 263G 309.2C 315.1C
135	A2	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C	64T 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
136	L1c	16086C 16129A 16187T 16189C 16223T 16241G 16278T 16291T 16294T 16311C	73G 151T 152C 182T 186A 189C 195C 198T 247A 263G 297G 315.1C 316A
137	A2	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C	73G 146C 152C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
138	A2	16111T 16223T 16290T 16300G 16319A 16362C	64T 73G 146C 153G 194T 235G 263G 309.1C 315.1C
139	A2	16111T 16223T 16290T 16298d 16319A 16362C	64T 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
140	D1	16223T 16262T 16325C 16362C	73G 152C 196C 204C 263G 315.1C 319dT
141	B4	16183C 16189C 16207G 16217C	73G 152C 263G 309.1C 315.1C
142	H		153G 263G 315.1C
143	A2	16111T 16176T 16189C 16223T 16290T 16319A 16360T 16362C	64T 97C 106d 146C 153G 204C 235G 263G 309.1C 309.2C 315.1C
144	A2	16111T 16187T 16223T 16290T 16319A 16362C	64T 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 309.2C 315.1C
145	L1c	16129A 16187T 16189C 16223T 16265C 16278T 16286A 16292T 16294T 16311C 16360T	73G 152C 182T 186A 189C 195C 198T 247A 263G 297G 315.1C 316A
146	A2	16111T 16223T 16290T 16311T 16319A 16362C	64T 73G 146C 153G 235G 263G 264T 309.1C 315.1C
147	A2	16111T 16187T 16223T 16290T 16319A 16362C	64T 73G 146C 153G 235G 263G 310C
149	A2	16111T 16187T 16223T 16290T 16319A 16362C	64T 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
150	B4	16182C 16183C 16189C 16217C	73G 263G 309.1C 315.1C
151	A2	16111T 16176T 16189C 16193.1C 16223T 16290T 16319A 16360T 16362C	64T 97C 106d 114T 146C 153G 204C 235G 263G 309.2C 315.1C
152	A2	16111T 16223T 16290T 16319A 16362C	64T 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
153	A2	16111T 16188T 16223T 16249C 16290T 16299G 16319A 16362C	64T 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
154	A2	16111T 16187T 16189C 16223T 16290T 16319A 16362C	64T 73G 146C 235G 260A 263G 309.1C 315.1C
155	A2	16111T 16187T 16189C 16223T 16290T 16319A 16352C 16362C	64T 73G 146C 235G 263G 309.1C 315.1C
156	A2	16111T 16187T 16223T 16290T 16319A 16362C	64T 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
157	A2	16111T 16223T 16250T 16290T 16319A 16362C	64T 73G 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
158	A2	16111T 16145A 16155G 16223T 16249C 16290T 16299G 16319A 16362C	73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
159	L3h	16129A 16172C 16174T 16192T 16218T 16223T 16256A 16311C 16362C	73G 151T 152C 189C 195C 263G 294C 315.1C
160	A2	16111T 16145A 16155G 16223T 16249C 16290T 16299G 16319A 16362C	64T 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
161	A2	16111T 16223T 16290T 16299G 16319A 16362C	64T 73G 146C 153G 235G 263G 315.1C
162	L3h	16129A 16172C 16174T 16192T 16218T 16223T 16256A 16311C 16362C	73G 151T 152C 189C 195C 263G 294C 315.1C
163	A2	16111T 16187T 16223T 16290T 16319A 16362C	64T 73G 146C 153G 235G 263G 309.2C 315.1C
164	A2	16111T 16145A 16155G 16223T 16249C 16290T 16299G 16319A 16362C	64T 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C
165	A2	16111T 16223T 16290T 16299G 16319A 16362C	64T 73G 146C 153G 235G 263G 309.1C 315.1C

**Anexo 2.** Información sobre los cebadores utilizados para la amplificación y reacción de extensión de único nucleótido (SBE) en los diversos multiplex de Y-SNPs. Ejemplo de electroferogramas resultantes tras el análisis con los respectivos multiplex.

### MULTIPLEX I

SNP	RefSNP ID	Rama	Forward (5' - 3')	bp	Reverse (5' - 3')	bp	Templado (bp)	Concentración (µM)	SNP
M175	rs2032678	O	TAAACTCTCTGAATCAGGCACATG	24	CTACTGATACCTTTGTTTCTG	21	71	0,38	-5bp
Tat	rs34442126	N	GACTCTGAGTGAGACTTGTGA	22	GAAGGTGCCGTAAGAGTGAA	22	112	0,38	T/C
M207	rs2032658	R	CTATGGGGCAAATGTAAGTC	20	TGAAGGAAAAGTGGAGTCTG	20	129	0,38	A/G
M198	rs2020857	R	ATTCCAGTCATGATGAGGTGG	21	ATGCCGTTTGCCTAGGTTAG	20	138	0,38	C/T
M343	rs9786184	R	TCTGATTTCGCACAAGGCTC	19	CACCTTTGCCTCTTGCTC	19	194	0,38	C/A
M231	rs9341278	N	CCTATTATCCTGGAAAATGTGG	22	GAATGGTGGCCAGAGTCTTT	20	219	0,38	G/A
M45	rs2032631	P	GAGAGAGGATATCAAAAATTGG	22	TAGCTTACAACACAAGGATTG	21	229	0,38	G/A
M9	rs3900	K-T	GCAGCATATAAACTTTCAGG	21	AAAACCTAACTTGTCTCAAGC	21	340	0,38	C/G

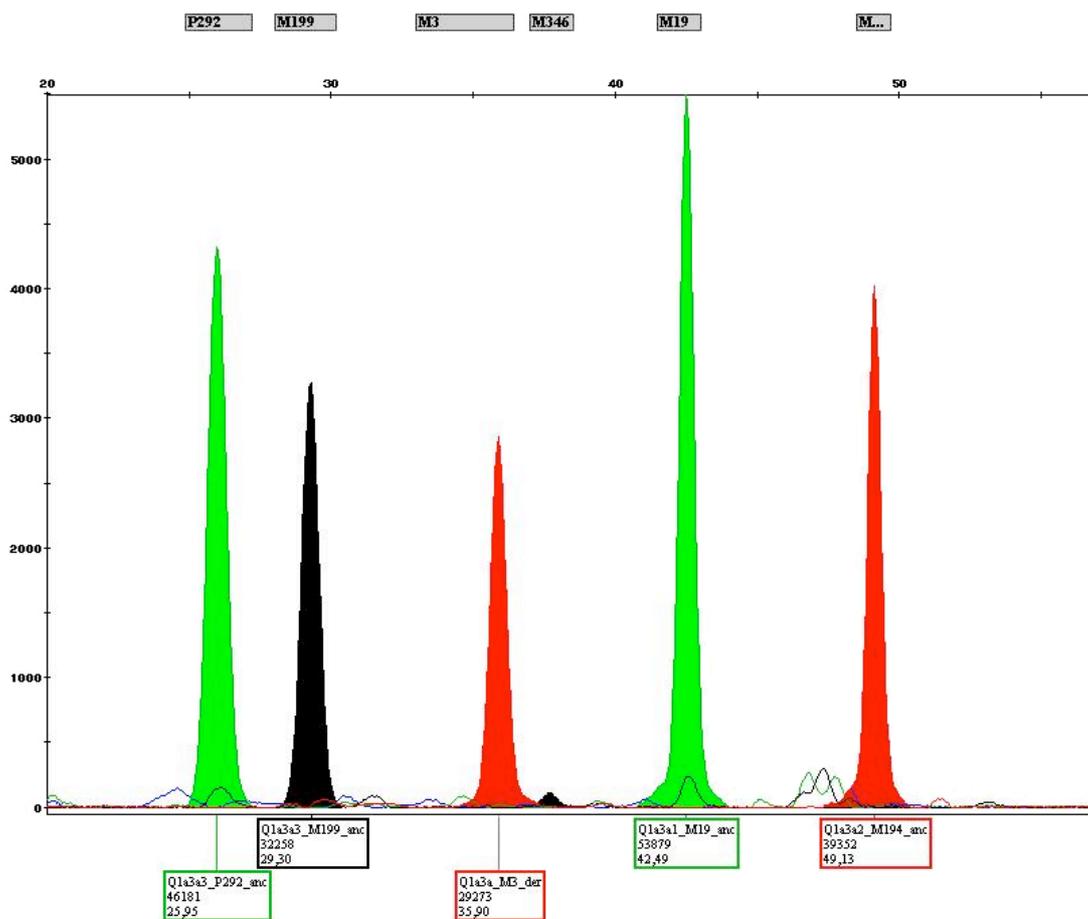
Locus	Secuencia del primer (5' - 3')	Tamaño (bp)	Concentración (µM)	Orientación
M343	AGTGCCCTCGTGTCCA	17	0,18	Forward
M207	ATGTAAGTCAAGCAAGAAATTA	23	0,18	Forward
M45	TCTGACAACAGAAGGAGCTTTTTGC	25	0,18	Reverse
M198	GACAATGTACTTAAATTAACCTAAAAGA	28	0,18	Reverse
M175	AAAGTCTGACAACACATGCCTTCTCACTTCTC	32	0,18	Forward
M231	TCGTGAAAGTCTGACAATTACTGTTTCTACTGCTTTC	37	0,18	Forward
M9	GGTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAAGCCTAAGATGGTTGAAT	43	0,18	Forward
Tat	GCCACGTCGTGAAAGTCTGACAACTCTGAAATATAAATTAACAAC	48	0,18	Reverse



## MULTIPLEX II

SNP	RefSNP ID	Rama	Forward (5' - 3')	bp	Reverse (5' - 3')	bp	Templado (bp)	Concentración (μM)	SNF
M3	rs3894	Q	AGGGCATCTTTCATTTTAGG	20	GTGGATTGCTTTGTAGTAGG	21	156	0,33	G/A
M19	rs3910	Q1a3a1	GTTGCTGGTGTACGGGGT	20	CCACAAACTGATGTAGAGAC	20	115	0,33	T/A
P292	rs13447374	Q1a3a3	ATCCAGTCATGATGAGGTGG	21	ATGCCGTTGCCTAGGTTAG	20	134	0,25	-/G
M194	rs2032677	Q1a3a2	GCCTGGATGAGGAAGTGAG	19	ATACAGTCGTTGCCTTCTCG	20	128	0,41	T/C
M199	rs2032589	Q1a3a3	CCTGGTGGATTCTGGTCTT	20	TGATTCAAGGATTGTAGTCTT	24	196	0,25	-/G
M346		Q1a	CAGCCAAGAGGACAGTAAG	19	TATGTAGGAGGATATTCTCCA	22	89	0,33	G/C

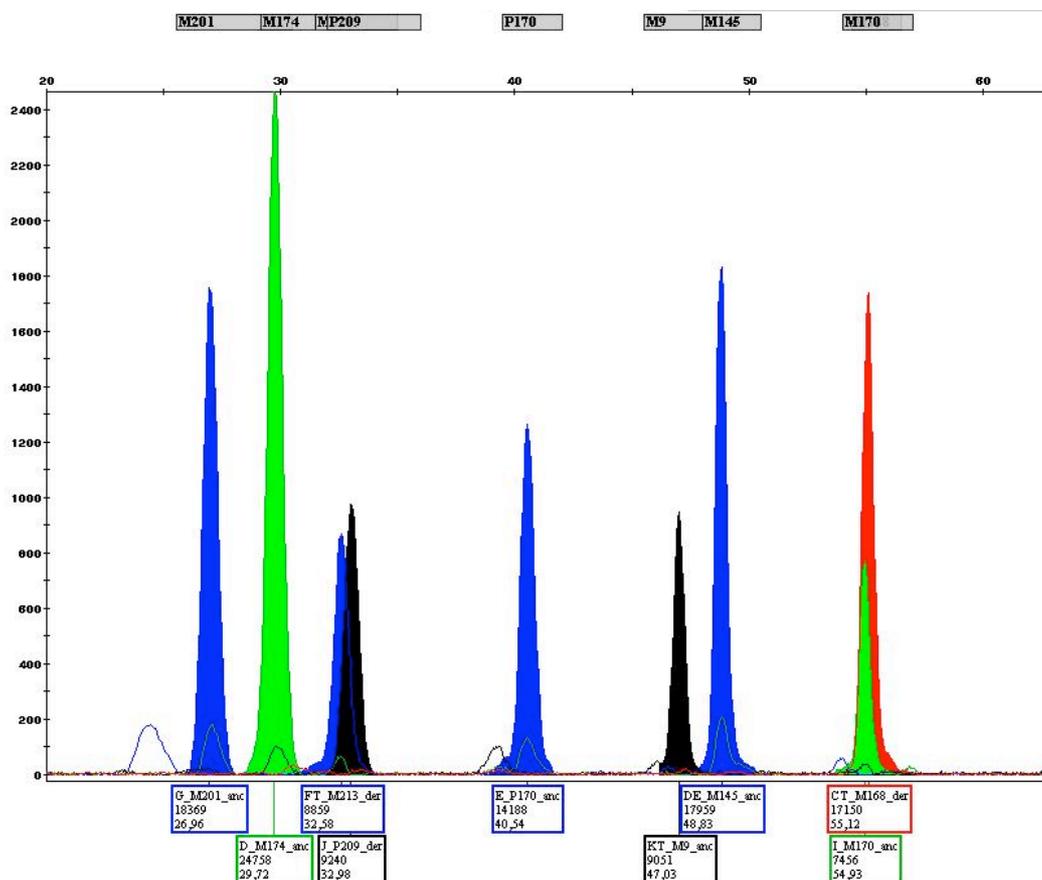
Locus	Secuencia del primer (5' - 3')	Tamaño (bp)	Concentración (μM)	Orientación
P292	ATGAGAAATGCTGTACTTA	20	0,125	Reverse
M199	GAAATGTAATAATGGCTTACACTTG	25	0,16	Forward
M3	GTGAAAGTCTGACAA CACCTCTGGGACTGA	30	0,3	Reverse
M346	CGTCAAAGTCTGACAA AGCCAAGAGGACAGTAAGA	35	0,08	Forward
M19	GCCACGTCGTGAAAGTCTGACAA AGACATCTGAAACCCAC	40	0,08	Reverse
M194	GCCACGTCGTGAAAGTCTGACAA AACATACAGGGAGTGTITTTT	45	0,125	Forward



### MULTIPLEX III

SNP	RefSNP ID	Rama	Forward (5'-3')	bp	Reverse (5'-3')	bp	Templado (bp)	Concentración (µM)	SNP
M168	rs2032595	C-T	TGTTTTGCAGAGAGCTTGGG	20	TGACTGTTGAGTTTTATCCACAAA	25	150	0,23	C/T
M170	rs2032597	I	TTGCAGCTCTTATTAAGTATG	21	TAAACTTGCCAATTACTTTCAAC	23	167	0,55	A/C
M145	rs3848982	DE	GCATACTGCCTCCACGACT	20	CCAGGAGCTCACAGTCACAA	20	173	0,23	G/A
M174	rs2032602	D	TTCTCCGTCACAGCAAAAATG	21	ATGCAAAAGGAGAAGGACAAGA	22	186	0,18	T/C
M213	rs2032665	F-T	GGCCATATAAAAACGCAGCA	20	TGAATGGCAAATTGATTCCA	20	208	0,37	T/C
P170	rs9786025	E	CCTCCTGTGCCTCTTTCAGA	20	ACAGCAGCAAGCAGGTCTTT	20	243	0,55	G/A
P209	rs17315835	J	TAGTCAAGAAGGCAGAATAGC	21	GTAAGGTATTAATCTGAATCCAC	23	299	0,55	T/C
M201	rs2032636	G	TATGCAITTTGTTGAGTATATGTC	23	GTTCTGAATGAAAGTTCAAACG	22	326	0,23	G/T
M9	rs3900	K-T	GCAGCATATAAAAACITTCAGG	21	AAAACCTAACTTTGCTCAAGC	21	340	0,55	C/G

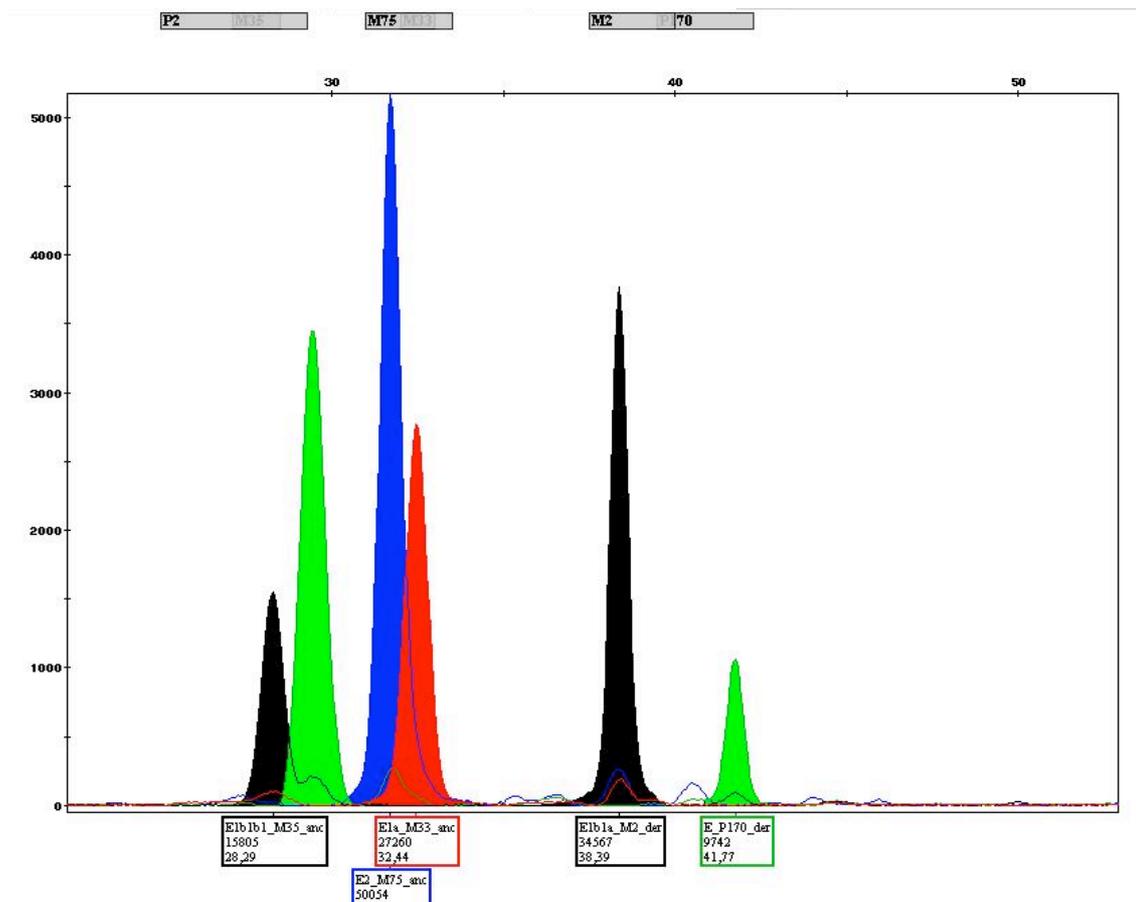
Locus	Secuencia del cebador (5' - 3')	Tamaño	Concentración (µM)	Orientación
M201	AATAATCCAGTATCAACTGAGG	22	0,09	Forward
M174	CTGACAAGCACCCCTCACTTCTGCACT	27	0,09	Reverse
P209	AAGTCTGACAACTTCACTCTGAGTCATT	30	0,23	Forward
M213	AAGTCTGACAACTTCACTCTGAGTCATT	32	0,09	Reverse
P170	CGTCGTGAAAGTCTGACAATTTCCITTTGGCAAACCTGA	37	0,14	Forward
M9	GGTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAAGCCTAAGATGGTTGAAT	43	0,27	Forward
M145	CTAGGTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAAGACACCAGAAAGAAAGGC	47	0,09	Forward
M168	AACTAGGTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAAGTATGTGTTGGAGGTGAGT	50	0,09	Forward
M170	AACTAGGTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAAGTATGTTGTTGAGGTGAGT	53	0,27	Forward



## MULTIPLEX IV

SNP	RefSNP ID	Rama	Forward (5'-3')	bp	Reverse (5'-3')	bp	Templado (bp)	Concentración (μM)	SNP
M2	rs3893	E1b1α	AAGTCCAGACCCAGGAAGGT	20	ACAGCTCCCCCTTATCCTC	20	162	0,33	A/G
P2	rs9785756	E1b1	GCTCCAGCCATCTTTTCCTA	21	CTTCTCTCATGAGGGTTTGGGA	22	180	0,33	G/A
M33		E1α	CACAACITTCATTGGCTACGG	20	GTGAAAGCCCCCAAGAGAGAC	21	190	0,33	A/C
M35		E1b1b1	GCATGGTCCCTTCTATGGAT	21	GAGAATGAATAGGCATGGGTTT	22	198	0,33	G/C
M75	rs2032639	E2	TCCACACATCAAGAAAACCTTGC	22	TTGAACAGAGGCATTTGTGA	21	224	0,33	G/A
P170	rs9786025	E	CCTCCTGTGCCTCTTTCAGA	20	ACAGCAGCAAGCAGGTCTTT	20	243	0,33	G/A

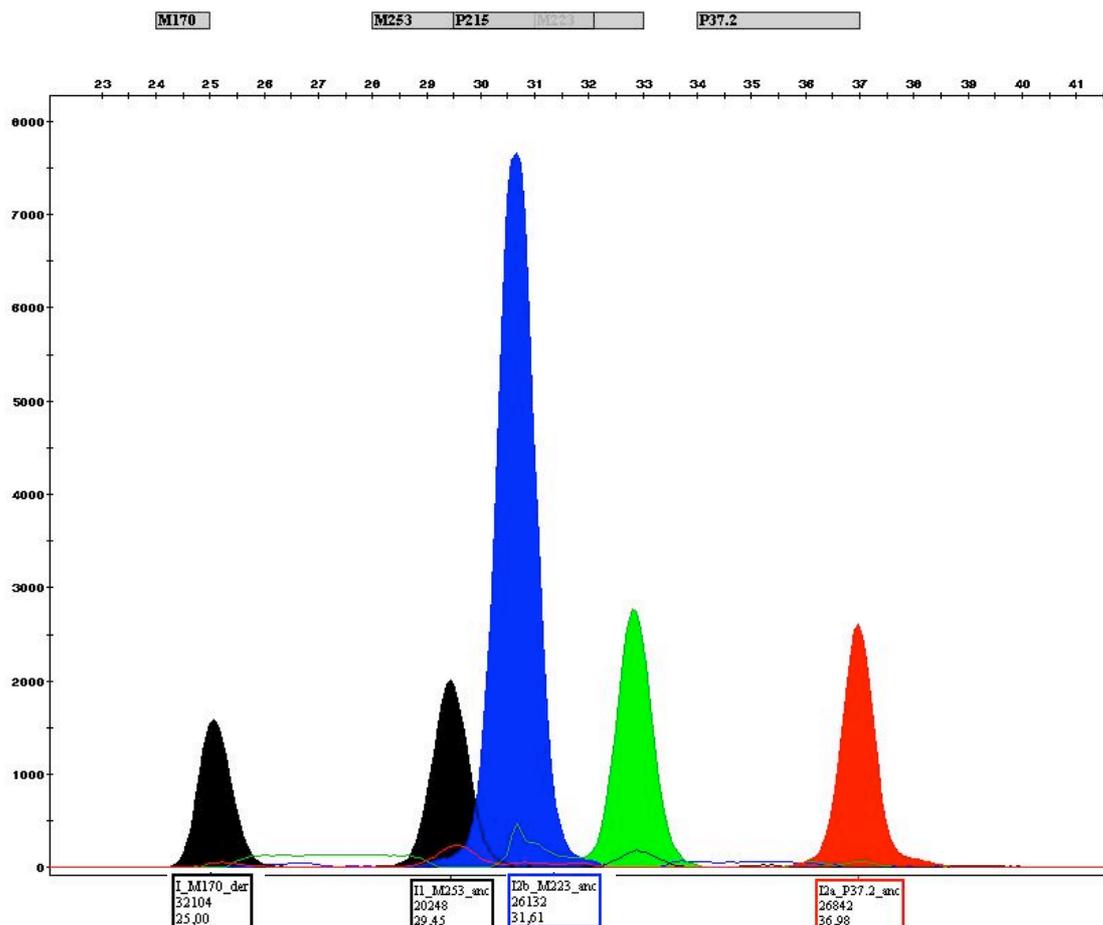
Locus	Secuencia del cebador (5' - 3')	Tamaño (bp)	Concentración (μM)	Orientación
P2	GCCCCTAGGAGGAGAA	16	0,08	Forward
M35	ACAAGGAGTCTCTGCCTGTGTC	22	0,25	Reverse
M33	GTTACAAAAGTATAATATGTCTGAGAT	27	0,16	Reverse
M75	AGTCTGACAAAGACAATTATCAAACCACATCC	32	0,08	Forward
P170	CGTCGTGAAAGTCTGACAAATTTCCITTTGGCAAACCTGA	37	0,16	Forward
M2	AAGTCTGACAAACCCCTTATCCTCCACAGATCTCA	37	0,16	Reverse



## MULTIPLEX V

SNP	RefSNP ID	Rama	Forward (5'-3')	bp	Reverse (5'-3')	bp	Templado (bp)	Concentración (µM)	SNP
M223		I2b	GTTACTAGCTGAAGATGATGC	21	CACTGAGCCGCTGGAGTC	19	80	0,33	G/A
M253	rs9341296	I1	ACTAGTCCTGTTTATAGTATTGTTG	25	TAGCAACTGTATGTAGCAAGC	21	102	0,33	C/T
P215	rs17307294	I2	TTGGGCCTGGAATGTAGAC	20	GAGTCAGTCAAAAGCTCCTG	20	140	0,33	A/G
M170	rs2032597	I	ATTGCAGCTCTTATTAAGTTATG	23	TAAACTTGCCAATACITTC AAC	23	168	0,33	A/C
P37.2		I2a	AGACAAGCATAGTGATAGGGT	21	GTGTGGATGTTCTGCTGCTGGA	20	199	0,33	T/C

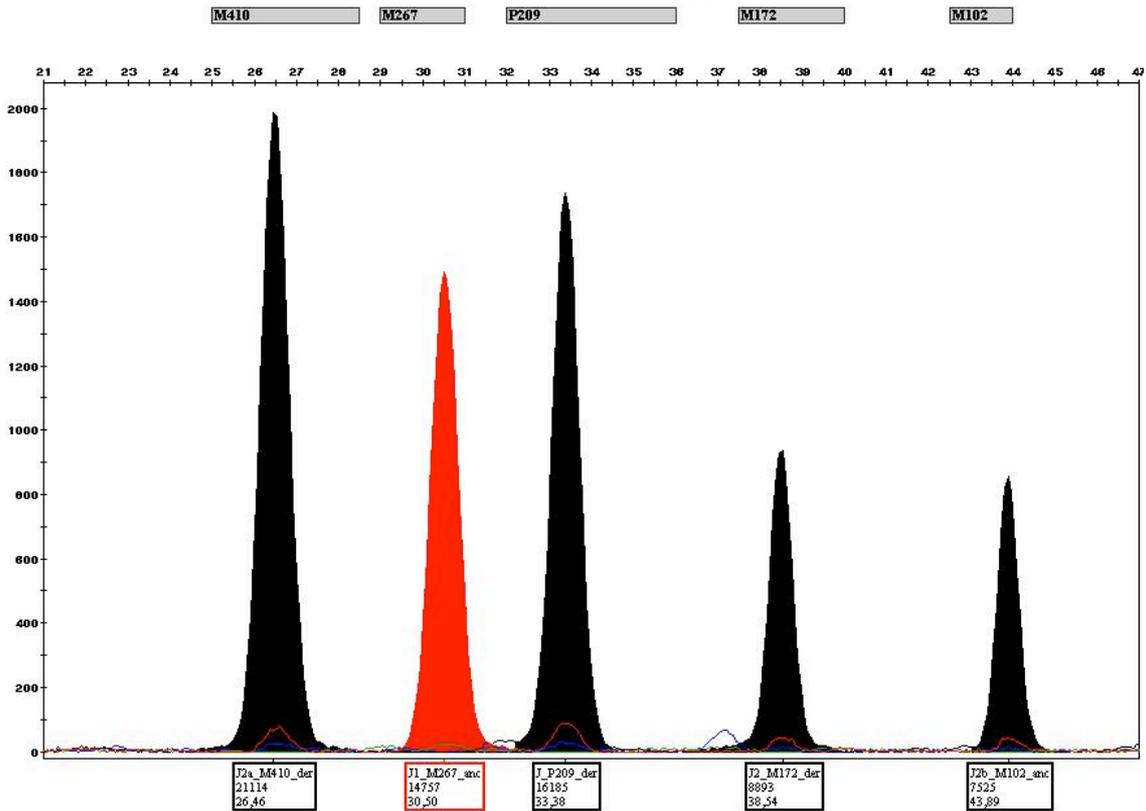
Locus	Secuencia del cebador (5' - 3')	Tamaño (bp)	Concentración (µM)	Orientación
M170	TTACTTAAAAATCATTGTC	20	0,24	Forward
P37.2	CAAA CATAGTGATAGGGTGGGATTGGTTCA	30	0,16	Forward
M223	CTGACAAAGAAGATGATGCAATTTATTAC	30	0,08	Forward
P215	GACAAATGGAATGTAGACTAATGGT	25	0,16	Forward
M253	ACAAAGTTGATAGATAGCAAGTTGA	25	0,16	Forward



## MULTIPLEX VI

SNP	RefSNP ID	Rama	Forward (5'-3')	bp	Reverse (5'-3')	bp	Templado (bp)	Concentración (μM)	SNP
M102	rs2032608	J2b	GATAAAATCACATAGTGAATGG	24	TGTTTGTTTCCTTAATCTCTAGG	24	113	0,33	C/G
M267	rs9341313	J1	TCTGGATAGCGGATTCGATG	20	AACCTCGTAGCTTCAAGCAATC	21	137	0,33	T/G
M410		J2a	AGTCCCCAGGGAACGTGTG	19	ACCATGCAGGCTGGAAGAG	19	152	0,33	A/G
P209Y	rs17315835	J	AAGAATGAAGAATTAGTCAAGAAG	24	CCAATTAGTCATCAITTCGCTG	22	161	0,33	T/C
M172	rs2032604	J2	AGCCAGATGACCAGGATGC	19	ATCAGCCAGGTACAGAGAAAAG	21	214	0,33	G/T

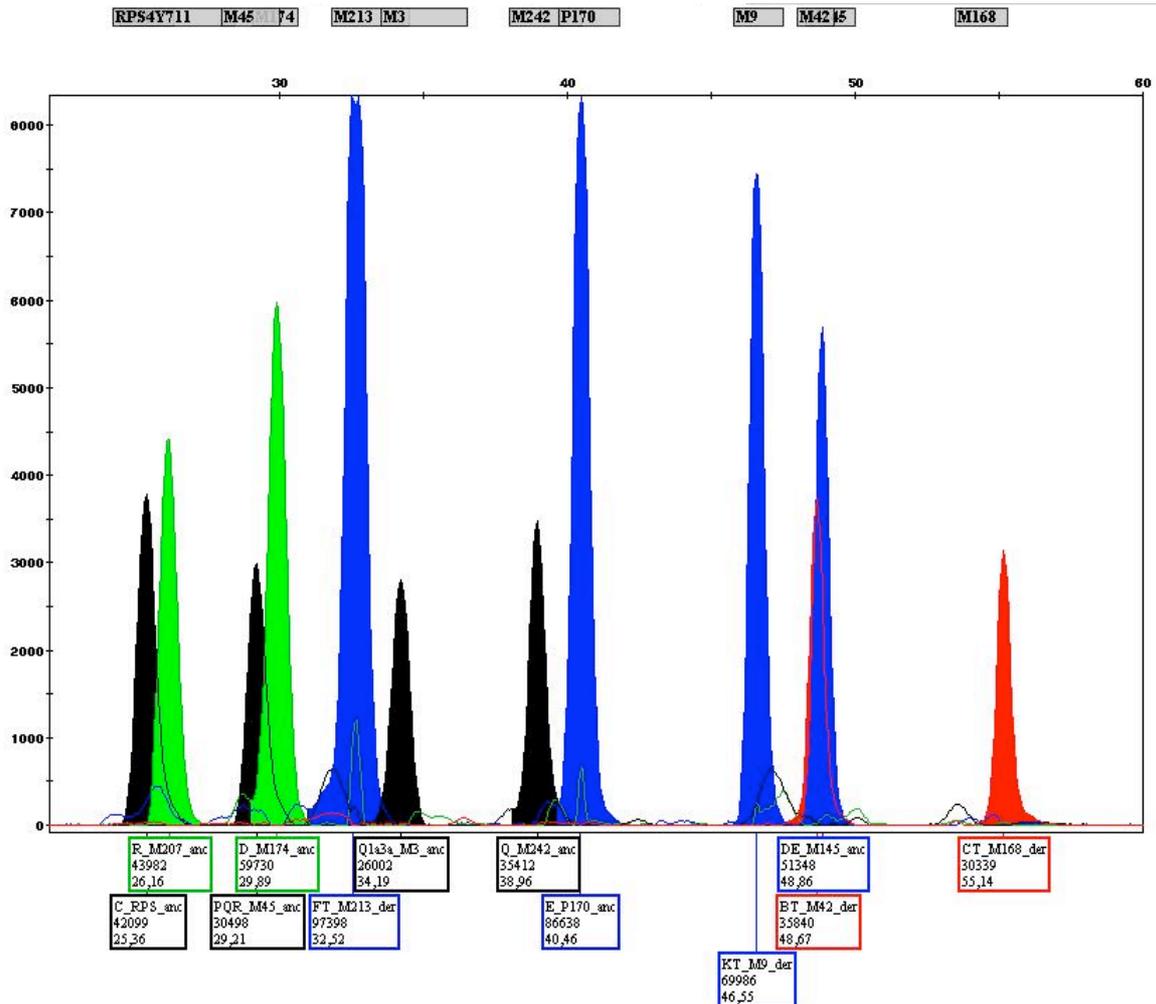
Locus	Secuencia del cebador (5' - 3')	Tamaño (bp)	Concentración (μM)	Orientación
M410	TGAGATGGCACATGTTTCT	19	0,04	Reverse
M267	CAAGATGGAAGCAITTTTGAAATA	25	0,08	Forward
P209	AAGTCTGACAAACTTCATCTCTGAGTCATT	30	0,08	Forward
M172	GAAAGTCTGACAAAATAATTGAAGACCTTTTAAGT	35	0,16	Reverse
M102	GTCGTGAAAGTCTGACAACTTATTGCTTTTCACATCTTA	40	0,16	Reverse



## MULTIPLEX VII

SNP	RefSNP ID	Rama	Forward (5'-3')	bp	Reverse (5'-3')	bp	Templado (bp)	Concentración (µM)	SNP
M42	rs2032630	B-T	GAGGGAGATAACTTGTGTGACAG	21	GCAAGTAAAGTACCAGCTC	20	92	0,35	A/T
M168	rs2032595	C-T	TGTTTTGCAGAGAGCTTGGGA	20	TGACTGTTCAGTTTTATCCACAAA	25	150	0,28	C/T
RPS4Y711	rs35284970	C	GATTTTGTGGTGGTGGTGC	20	TGGCCAGCCTCTTATCTCTC	20	217	0,28	C/T
M145	rs3848982	D-E	GCATACCTGCCTCCACGACT	20	CCAGGAGCTCACACTCACAA	20	173	0,28	G/A
M174	rs2032602	D	TTCTCCGTCACAGCAAAAATG	21	ATGCAAAAAGGAGAAGGACAAGA	22	186	0,28	T/C
P170	rs9786025	E	CCTCCTGTGCCTCTTTCAGA	20	ACAGCAGCAAGCAGGTCTTT	20	243	0,28	G/A
M213	rs2032665	F-T	GGCCATATAAAAACGCAGCA	20	TGAATGGCAAATGATTC	20	208	0,28	T/C
M9	rs3900	K-T	GCAGCATATAAAAACCTTCAGG	21	AAAACCTAACCTTGTCTCAAGC	21	340	0,34	C/G
M45	rs2032631	P	GAGAGAGGATATCAAAAATTGG	22	TAGCTTACAACACAAGGATTC	21	229	0,28	G/A
M242	rs8179021	Q	TACGGCATAGAAAGTTTGTG	20	GAACAACCTCTGAAGCGGTGG	20	133	0,28	C/T
M3	rs3894	Q	AGGGCATCTTTCATTTTAGG	20	GTGGATTGCTTTGTAGTAGG	21	156	0,28	G/A
M207	rs2032658	R	CTATGGGGCAAATGTAAGTC	20	TGAAGGAAAAGTGGAGTCTG	20	129	0,42	A/G

Locus	Secuencia del primer (5' - 3')	Tamaño (bp)	Concentración (µM)	Orientación
RPS4Y711	GGCAATAAACCTTGGATTC	20	0,28	Forward
M207	ATGTAAGTCAAGCAAGAAATTTA	23	0,09	Forward
M45	TCTGACAA CAGAAGGAGCTTTTTGC	25	0,28	Reverse
M174	CTGACAA GCACCCCTCACTTCTGCACT	27	0,09	Reverse
M3	GTGAAAGTCTGACAA CACCTCTGGGACTGA	30	0,33	Reverse
M213	AAGTCTGACAA GAACCTAAACATCTCGTAC	32	0,14	Reverse
M242	ACGTCGTGAAAGTCTGACAA GGTGACCAAGGTGCT	35	0,09	Forward
P170	CGTCGTGAAAGTCTGACAA TTTCCITTTGCCAAACTGA	37	0,28	Forward
M9	GGTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAA GCCTAAGATGGTTGAAT	43	0,28	Forward
M42	TGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAA TCAGATTTAGGACACAAAAGC	45	0,09	Forward
M145	CTAGGTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAA GACACCAGAAAGAAAGGC	47	0,09	Forward
M168	AACTAGGTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAA GATGTGTTGGAGGTGAGT	50	0,09	Forward



**Anexo 3.** Haplotipos de Y-STRs y Y-SNPs de la población mestiza de Nicaragua. La predicción del haplogrupo y el haplogrupo determinado mediante Y-SNPs se muestran para cada haplotipo.

ID	DYS456	DYS389I	DYS390	DYS389II	DYS458	DYS19	DYS385a	DYS385b	DYS393	DYS391	DYS439	DYS635	DYS392	GATAH4	DYS437	DYS438	DYS448	Predicción	KT-M9	P-M45	N-M231	NI-C-1a1	R-M207	R1b-M343	R1a-M198	O-M175	HG
NIC002	16	13	24	29	17	14	11	14	13	11	12	23	13	12	15	12	19	R1b	+	+	-	-	+	+	-	-	R1b
NIC004	15	13	24	29	16	14	11	14	12	10	11	23	13	13	15	12	19	R1b	+	+	-	-	+	+	-	-	R1b
NIC007	15	13	23	29	16	14	11	15	13	11	12	23	13	12	14	11	19	R1b	+	+	-	-	+	+	-	-	R1b
NIC008	17	13	24	29	17	15	11	15	13	10	11	24	13	12	15	12	19	R1b	+	+	-	-	+	+	-	-	R1b
NIC009	16	13	23	29	18	14	11	14	13	11	12	23	13	12	14	12	18	R1b	+	+	-	-	+	+	-	-	R1b
NIC012	15	13	24	29	15	15	11	13	13	11	12	23	13	12	15	12	20	R1b	+	+	-	-	+	+	-	-	R1b
NIC013	16	12	24	28	19	14	11	14	13	11	11	23	13	13	15	12	19	R1b	+	+	-	-	+	+	-	-	R1b
NIC015	15	13	24	29	16	14	11	15	13	11	12	23	13	12	14	11	19	R1b	+	+	-	-	+	+	-	-	R1b
NIC016	17	13	24	31	17	14	12	15	15	11	12	24	13	11	14	12	19	R1b	+	+	-	-	+	+	-	-	R1b
NIC017	15	13	24	29	17	13	12	14	13	11	12	23	13	11	14	12	19	R1b	+	+	-	-	+	+	-	-	R1b
NIC018	16	13	25	29	16	14	11	14	12	11	11	23	13	11	15	12	20	R1b	+	+	-	-	+	+	-	-	R1b
NIC019	16	13	24	29	17	14	11	13	13	10	13	23	13	12	15	12	19	R1b	+	+	-	-	+	+	-	-	R1b
NIC020	15	13	25	29	15	14	12	14	14	10	11	23	13	12	14	12	19	R1b	+	+	-	-	+	+	-	-	R1b
NIC022	16	13	24	29	18	14	11	14	14	10	12	23	13	12	15	12	19	R1b	+	+	-	-	+	+	-	-	R1b
NIC024	15	13	24	29	17	14	11	14	13	10	12	23	13	13	15	12	19	R1b	+	+	-	-	+	+	-	-	R1b
NIC026	15	13	24	29	18	14	11	14	13	11	12	23	13	13	15	12	19	R1b	+	+	-	-	+	+	-	-	R1b
NIC028	15	13	23	29	18	14	11	14	14	11	12	23	13	11	15	11	19	R1b	+	+	-	-	+	+	-	-	R1b
NIC032	16	14	24	31	17	14	11	14	13	10	12	23	10	11	14	12	18	R1b	+	+	-	-	+	+	-	-	R1b
NIC034	16	12	25	28	16	14	11	14	13	11	12	23	13	12	15	12	19	R1b	+	+	-	-	+	+	-	-	R1b
NIC035	16	14	24	31	17	14	11	14	13	12	12	23	13	11	14	13	18	R1b	+	+	-	-	+	+	-	-	R1b
NIC037	15	13	24	29	17	14	10	14	13	11	13	22	13	12	15	12	19	R1b	+	+	-	-	+	+	-	-	R1b
NIC038	17	13	23	30	17	14	11	14	13	11	12	20	13	11	14	12	19	R1b	+	+	-	-	+	+	-	-	R1b
NIC044	18	13	24	29	18	14	11	14	13	11	12	23	13	12	15	12	20	R1b	+	+	-	-	+	+	-	-	R1b
NIC045	13	13	24	29	18	14	11	15	13	11	12	23	13	12	15	12	19	R1b	+	+	-	-	+	+	-	-	R1b
NIC047	16	14	24	31	17	14	11	14	13	12	13	23	13	11	14	13	18	R1b	+	+	-	-	+	+	-	-	R1b
NIC048	16	13	23	29	17	14	11	14	13	11	12	23	13	11	15	12	18	R1b	+	+	-	-	+	+	-	-	R1b
NIC049	16	13	24	29	17	14	11	14	13	11	12	23	13	13	15	12	19	R1b	+	+	-	-	+	+	-	-	R1b
NIC053	16	13	24	29	18	16	11	14	13	10	12	23	13	12	15	12	19	R1b	+	+	-	-	+	+	-	-	R1b
NIC054	16	14	23	30	16	14	11	14	13	10	13	23	13	12	15	12	19	R1b	+	+	-	-	+	+	-	-	R1b
NIC055	16	13	24	29	17	14	12	14	13	11	13	23	13	12	15	12	20	R1b	+	+	-	-	+	+	-	-	R1b
NIC056	15	14	25	32	17	14	11	14	13	11	12	23	13	11	14	12	18	R1b	+	+	-	-	+	+	-	-	R1b
NIC057	16	12	24	28	17	14	11	14	13	10	12	23	13	12	15	12	19	R1b	+	+	-	-	+	+	-	-	R1b
NIC060	16	14	24	31	17	14	11	14	13	12	13	23	13	11	14	13	18	R1b	+	+	-	-	+	+	-	-	R1b
NIC061	15	13	24	29	16	14	11	14	13	11	11	23	13	12	15	11	19	R1b	+	+	-	-	+	+	-	-	R1b
NIC062	15	13	24	29	17	14	11	14	13	11	12	23	13	11	14	12	18	R1b	+	+	-	-	+	+	-	-	R1b
NIC068	15	13	24	29	19	14	11	14	13	10	11	23	13	12	14	12	19	R1b	+	+	-	-	+	+	-	-	R1b
NIC069	17	14	23	30	18	14	11	11	13	10	12	24	13	12	15	12	19	R1b	+	+	-	-	+	+	-	-	R1b

Anexo 3. Continuación.

ID	DYS456	DYS389I	DYS390	DYS389II	DYS458	DYS19	DYS385 a	DYS385 b	DYS393	DYS391	DYS439	DYS435	DYS392	GATA H4	DYS437	DYS438	DYS448	Predicción	KT-M9	P-M45	N-M231	NI-C-Tdt	R-M207	RIb-M343	RIb-M198	O-M175	HG
NICO70	16	13	24	30	17	14	11	14	13	11	11	23	13	12	12	20	18	Rib	+	+	-	-	+	+	-	-	Rib
NICO71	15	13	24	29	17	14	11	14	13	11	12	23	13	11	12	18	18	Rib	+	+	-	-	+	+	-	-	Rib
NICO75	16	14	24	30	17	14	12	13	13	11	13	25	13	13	15	19	19	Rib	+	+	-	-	+	+	-	-	Rib
NICO77	15	13	24	29	17	15	11	14	13	10	11	23	14	12	15	19	19	Rib	+	+	-	-	+	+	-	-	Rib
NICO80	16	13	24	29	16	14	11	14	13	11	13	23	13	12	15	19	19	Rib	+	+	-	-	+	+	-	-	Rib
NICO82	16	13	24	29	19	14	11	14	13	10	11	23	13	12	15	19	19	Rib	+	+	-	-	+	+	-	-	Rib
NICO84	15	14	24	30	15	15	11	13	13	11	12	23	13	12	15	20	20	Rib	+	+	-	-	+	+	-	-	Rib
NICO86	16	13	24	29	16	14	11	14	13	10	12	24	13	11	12	19	19	Rib	+	+	-	-	+	+	-	-	Rib
NICO90	15	13	24	29	17	14	11	14	13	10	12	23	14	12	15	19	19	Rib	+	+	-	-	+	+	-	-	Rib
NICO95	16	13	24	29	16	14	11	13	13	10	12	25	13	12	14	19	19	Rib	+	+	-	-	+	+	-	-	Rib
NICO96	16	13	24	29	17	14	11	14	13	11	11	23	13	11	15	19	19	Rib	+	+	-	-	+	+	-	-	Rib
NICO98	15	13	24	29	17	14	12	14	13	11	11	23	13	12	15	19	19	Rib	+	+	-	-	+	+	-	-	Rib
NICO101	15	12	24	29	17	14	13	13	13	10	13	24	13	12	15	19	19	Rib	+	+	-	-	+	+	-	-	Rib
NICO102	15	13	23	29	17	14	11	14	13	11	13	21	13	12	15	19	19	Rib	+	+	-	-	+	+	-	-	Rib
NICO103	15	13	24	29	17	14	11	14	13	11	12	23	13	12	15	19	19	Rib	+	+	-	-	+	+	-	-	Rib
NICO104	16	13	24	31	18	15	11	14	13	10	12	23	13	11	15	19	19	Rib	+	+	-	-	+	+	-	-	Rib
NICO105	17	14	24	29	16	15	11	14	13	11	12	23	13	11	15	19	19	Rib	+	+	-	-	+	+	-	-	Rib
NICO108	15	13	24	29	16	14	11	14	13	10	12	23	13	12	15	20	20	Rib	+	+	-	-	+	+	-	-	Rib
NICO123	16	13	24	29	17	14	11	14	12	11	11	23	13	11	16	19	19	Rib	+	+	-	-	+	+	-	-	Rib
NICO124	17	13	24	30	18	14	11	14	13	11	12	23	13	12	15	19	19	Rib	+	+	-	-	+	+	-	-	Rib
NICO128	17	13	23	30	17	14	11	14	13	11	12	24	13	11	14	19	19	Rib	+	+	-	-	+	+	-	-	Rib
NICO131	15	13	24	29	17	14	11	14	14	11	12	23	13	12	15	19	19	Rib	+	+	-	-	+	+	-	-	Rib
NICO132	15	13	24	29	17	14	11	14	12	11	12	23	13	12	15	19	19	Rib	+	+	-	-	+	+	-	-	Rib
NICO133	17	13	23	29	16	14	11	14	13	11	12	23	13	12	15	19	19	Rib	+	+	-	-	+	+	-	-	Rib
NICO136	14	13	22	29	15	14	11	14	12	11	12	23	13	12	15	19	19	Rib	+	+	-	-	+	+	-	-	Rib
NICO137	15	13	24	29	17	14	11	14	13	11	12	23	13	13	15	19	19	Rib	+	+	-	-	+	+	-	-	Rib
NICO138	15	13	24	28	17	14	11	14	13	11	12	23	13	12	15	19	19	Rib	+	+	-	-	+	+	-	-	Rib
NICO139	15	13	25	30	20	14	11	15	14	11	12	23	13	10	15	19	19	Rib	+	+	-	-	+	+	-	-	Rib
NICO141	16	13	24	28	16	15	11	14	13	11	12	23	13	11	16	19	19	Rib	+	+	-	-	+	+	-	-	Rib
NICO146	17	13	24	29	17	14	11	14	13	11	12	23	13	13	15	19	19	Rib	+	+	-	-	+	+	-	-	Rib
NICO151	17	11	24	29	17	14	10	15	13	10	11	23	13	12	15	19	19	Rib	+	+	-	-	+	+	-	-	Rib
NICO155	16	13	24	29	19	14	11	14	13	11	12	23	13	12	14	18	18	Rib	+	+	-	-	+	+	-	-	Rib
NICO157	15	12,13	24	28,29	15	14	12	14	13	10	12	23	13	11	15	20	20	Rib	+	+	-	-	+	+	-	-	Rib
NICO161	15	12	23	28	17	14	11	14	13	11	11	23	13	11	14	18	18	Rib	+	+	-	-	+	+	-	-	Rib
NICO165	17	13	24	29	17	14	11	14	13	11	12	23	13	13	15	19	19	Rib	+	+	-	-	+	+	-	-	Rib
NICO041	16	13	24	30	15	17	12	16	13	10	10	23	13	12	15	20	20	Rib	+	+	-	-	+	+	-	-	Rib
NICO079	17	13	24	30	16	15	11	14	13	11	10	24	11	13	11	20	20	Rib	+	+	-	-	+	+	-	-	Rib
NICI110	16	13	25	30	15	15	11	14	13	11	11	23	11	13	14	20	20	Rib	+	+	-	-	+	+	-	-	Rib
NICI115	15	14	25	31	15	16	11	14	13	11	10	24	11	12	14	20	20	Rib	+	+	-	-	+	+	-	-	Rib
NICI156	15	13	24	29	15	15	11	14	13	10	11	23	11	13	11	20	20	Rib	+	+	-	-	+	+	-	-	Rib

Anexo 3. Continuación.

ID	DYS456	DYS389I	DYS390	DYS389II	DYS458	DYS19	DYS385 α	DYS385 β	DYS393	DYS391	DYS439	DYS635	DYS392	GATA H4	DYS437	DYS438	DYS448	Predicción	Q1a3-M346	Q1a3a-M3	Q1a3a1-M19	Q1a3a2-M194	Q1a3a3-P292	Q1a3a3-M199	HG
NI023	16	12	23	29	18	13	13	14	14	9	11,12	22	13	12	14	20	19	Q	+	-	-	-	-	-	Q1a3a
NI033	17	14	24	31	16	13	14	16	13	10	11	22	9	14	11	22	19	Q	+	+	-	-	-	-	Q1a3a
NI046	16	14	20	31	18	13	14	17	12	10	11	23	14	11	11	22	22	Q	+	+	+	-	-	-	Q1a3a
NI050	15	13	22	31	17	13	14	16	13	10	12	22	14	12	14	19	19	Q	+	+	+	-	-	-	Q1a3a
NI052	15	13	23	30	17	13	16	17	13	10	12	22	14	12	21	21	21	Q	+	+	+	-	-	-	Q1a3a
NI064	15	13	24	30	15	13	14	16	12	10	11	23	14	12	14	19	19	Q	+	+	+	-	-	-	Q1a3a
NI073	16	13	24	30	15	13	15	16	13	6	11	22	15	12	14	11	19	Q	+	+	+	-	-	-	Q1a3a
NI076	15	13	23	30	16	14	14	18	13	10	13	22	14	12	11	20	20	Q	+	+	+	-	-	-	Q1a3a
NI087	18	13	24	30	15	13	14	16	13	10	11	22	15	10	11	19	19	Q	+	+	+	-	-	-	Q1a3
NI088	16	14	24	31	15	13	15	16	13	6	11	22	15	12	14	11	19	Q	+	-	-	-	-	-	Q1a3
NI094	14	13	24	29	18	14	14	18	13	10	13	23	15	12	11	20	20	Q	+	+	+	-	-	-	Q1a3a
NI099	14	13	23	30	17	13	14	17	14	10	11	23	15	13	14	20	20	Q	+	+	+	-	-	-	Q1a3a
NI107	15	13	24	31	17	13	14	17	13	10	11	23	16	11	14	20	20	Q	+	+	+	-	-	-	Q1a3a
NI116	16	13	24	29	19	13	14	19	13	10	11	22	15	11	14	19	19	Q	+	+	+	-	-	-	Q1a3a
NI125	14	13	24	31	15	13	13	18	13	10	11	23	16	12	14	20	20	Q	+	+	+	-	-	-	Q1a3a
NI134	15	13	22	29	17	13	14	18	13	10	13	22	14	13	11	18	18	Q	+	+	+	-	-	-	Q1a3a
NI143	16	13	24	29	18	14	14	18	13	10	13	23	15	12	14	20	20	Q	+	+	+	-	-	-	Q1a3a
NI144	16	13	24	29	15	13	14	19	13	11	13	22	16	13	14	20	20	Q	+	+	+	-	-	-	Q1a3a
NI150	15	13	24	29	15	13	16	21	12	10	11	22	16	11	11	21	21	Q	+	+	+	-	-	-	Q1a3a
NI152	15	13	23	31	17	13	13	18	13	10	12	22	14	13	14	18	18	Q	+	+	+	-	-	-	Q1a3a
NI153	14	13	23	30	18	13	14	18	14	10	12	23	15	13	11	20	20	Q	+	+	+	-	-	-	Q1a3a
NI158	15	12	23	26	15	16	14	16	12	10	11	22	14	12	14	19	19	L	+	-	-	-	-	-	Q1a3
NI159	15	13	24	29	18	13	14	18	14	10	12	22	14	13	14	19	19	Q	+	+	+	-	-	-	Q1a3a
NI160	15	13	23	30	17	13	14	18	13	10	13	22	14	12	14	18	18	Q	+	+	+	-	-	-	Q1a3a

ID	DYS456	DYS389I	DYS390	DYS389II	DYS458	DYS19	DYS385 α	DYS385 β	DYS393	DYS391	DYS439	DYS635	DYS392	GATA H4	DYS437	DYS438	DYS448	Predicción	Q1a3-M346	Q1a3a-M3	Q1a3a1-M19	Q1a3a2-M194	Q1a3a3-P292	Q1a3a3-M199	HG	
NI003	18	14	24	30	20	13	13	14	14	13	9	10	21	11	12	14	10	20	E1b1b	+	-	-	-	-	-	E1b1b
NI021	16	14	24	30	17	13	13	14	13	13	9	10	21	11	12	14	10	20	E1b1b	+	-	-	-	-	-	E1b1b
NI030	15	14	24	30	16	13	13	14	13	13	9	10	21	11	12	14	10	20	E1b1b	+	+	-	-	-	-	E1b1b
NI031	16	14	25	30	18	13	14	14	13	9	10	10	21	11	12	14	10	20	E1b1b	+	+	-	-	-	-	E1b1b
NI036	15	13	23	30	15	14	17	18	13	11	11	11	24	11	14	10	10	20	E1b1b	+	+	-	-	-	-	E1b1b
NI039	15	12	23	30	17	13	17	18	13	13	10	13	21	11	14	10	10	20	E1b1b	+	+	-	-	-	-	E1b1b
NI042	15	14	24	31	20	13	13	19	12	10	12	12	23	11	14	11	11	20	E1b1b	+	+	-	-	-	-	E1b1b
NI065	15	13	24	31	15	16	16	18	13	12	10	11	21	11	14	10	10	20	E1b1b	+	+	-	-	-	-	E1b1b
NI067	15	14	24	30	16	13	13	14	14	13	9	10	21	11	12	14	10	20	E1b1b	+	+	-	-	-	-	E1b1b
NI072	15	11	23	29	17	15	17	18	14	13	10	13	21	11	14	10	10	20	E1b1b	+	+	-	-	-	-	E1b1b
NI085	13	13	22	30	16	13	13	14	14	13	9	11	22	11	14	10	10	21	G2a	+	+	-	-	-	-	E1b1b
NI111	16	12	24	29	14	13	16	17	17	13	10	13	22	11	14	14	10	20	E1b1b	+	+	-	-	-	-	E1b1b
NI127	15	13	24	30	15	13	16	18	13	13	10	12	22	11	14	14	10	20	E1b1b	+	+	-	-	-	-	E1b1b
NI129	15	14	22	30	15	15	14	16	16	13	9	10	20	11	17	9	19,20	G2a	+	+	+	-	-	-	E1a	
NI135	17	14	23	31	18	14	13	14	14	12	10	10	21	11	12	14	10	19	E1b1b	+	+	-	-	-	-	E1b1b
NI140	15	13	24	31	14	13	15	18	13	13	10	12	22	11	14	14	10	20	E1b1b	+	+	-	-	-	-	E1b1b
NI005	17	13	21	30	16	16	17	18	14	14	10	12	21	11	14	11	11	21	E1b1a	+	+	-	-	-	-	E1b1a
NI066	15	13	21	30	17.2	15	15	17	17	13	10	12	21	11	15	11	11	21	E1b1a	+	+	-	-	-	-	E1b1a
NI074	15	14	22	31	16	16	17	18	14	14	10	12	21	11	14	12	12	21	E1b1a	+	+	-	-	-	-	E1b1a
NI097	15	13	21	31	16	15	16	17	17	14	11	13	21	11	14	14	11	21	E1b1a	+	+	-	-	-	-	E1b1a
NI108	17	13	21	29	17	15	16	19	15	15	10	12	21	11	14	14	11	21	E1b1a	+	+	-	-	-	-	E1b1a
NI109	15	13	21	30	17	16	16	17	17	13	11	11	21	11	14	14	11	21	E1b1a	+	+	-	-	-	-	E1b1a
NI147	15	13	21	30	17	16	16	17	17	13	11	11	21	11	12	14	11	21	E1b1a	+	+	-	-	-	-	E1b1a
NI148	18	13	21	30	17	17	17	17	17	14	10	13	22	11	14	14	11	21	E1b1a	+	+	-	-	-	-	E1b1a
NI162	15	13	21	31	16	15	16	16	16	13	10	12	21	11	12	14	11	21	E1b1a	+	+	-	-	-	-	E1b1a

Nicaragua.  
**Anexo 3.** Continuación.

ID	DYS456	DYS389I	DYS390	DYS389II	DYS458	DYS19	DYS385 a	DYS385 b	DYS393	DYS391	DYS439	DYS635	DYS392	GATA H4	DYS437	DYS438	DYS448	Predicción	I-M170	I1-M253	I2-P215	I2a-P37.2	I2b-M223	HG
NIC011	14	13	23	28	17	17	12	12	13	10	11	21	11	12	15	15	10	10	12	12	15	21	12	J2a
NIC029	14	12	0.006	0.031	0.028	0.018	0.037	0.018	0.037	0.028	0.008	0.031	0.039	0.010	0.014	0.037	0.039	0.024	0.039	0.020	0.039	0.030	0.006	J2a
NIC058	14	13	0.006	0.026	0.008	0.018	0.037	0.018	0.037	0.028	0.008	0.031	0.039	0.010	0.014	0.037	0.039	0.024	0.039	0.020	0.039	0.030	0.006	J2a
NIC091	14	12	22	29	16	14	14	14	14	13	10	11	11	12	15	10	10	10	11	11	20	20	11	J1
NIC112	14	13	23	29	16	16	15	15	16	14	10	10	11	11	12	11	10	10	12	12	20	20	12	J1
NIC142	17	14	23	30	16	16	15	16	16	14	10	10	11	11	20	20	12	12	12	20	20	12	12	J1

ID	DYS456	DYS389I	DYS390	DYS389II	DYS458	DYS19	DYS385 a	DYS385 b	DYS393	DYS391	DYS439	DYS635	DYS392	GATA H4	DYS437	DYS438	DYS448	Predicción	J-F209	J1-M267	J2-M172	J2a-M410	J2b-M102	HG
NIC006	14	12	24	28	16	15	17	18	18	12	11	13	21	11	12	15	10	10	19	19	20	20	19	J2a
NIC010	15	14	22	30	16	14	12	13	14	12	10	10	12	11	14	14	10	10	20	20	20	20	20	J2a
NIC025	15	12	23	30	17	14	14	18	18	12	10	10	12	11	14	14	10	10	20	20	20	20	20	J1
NIC040	15	12	22	30	17	14	14	18	18	12	10	10	12	11	14	14	10	10	20	20	20	20	20	J2a
NIC043	15	11	23	31	17	14	14	18	18	12	10	10	12	11	14	14	10	10	20	20	20	20	20	J2a
NIC051	14	14	23	31	16	15	13	13	13	12	10	10	12	11	14	14	10	10	20	20	20	20	20	J2a
NIC059	15	12	0.020	0.035	0.037	0.037	0.006	0.035	0.035	0.017	0.010	0.019	0.036	0.008	0.026	0.037	0.037	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	J2a
NIC078	15	13	0.020	0.035	0.037	0.037	0.006	0.035	0.035	0.017	0.010	0.019	0.036	0.008	0.026	0.037	0.037	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	J2a
NIC083	15	13	0.020	0.035	0.037	0.037	0.006	0.035	0.035	0.017	0.010	0.019	0.036	0.008	0.026	0.037	0.037	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	J2a
NIC088	15	13	0.020	0.035	0.037	0.037	0.006	0.035	0.035	0.017	0.010	0.019	0.036	0.008	0.026	0.037	0.037	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	J2a
NIC089	15	14	22	31	16	15	12	13	13	12	11	11	12	11	14	14	10	10	20	20	20	20	20	J1
NIC092	14	14	22	31	16	15	12	13	13	12	11	11	12	11	14	14	10	10	20	20	20	20	20	J2a
NIC106	15	14	0.073	0.291	0.024	0.666	0.006	0.048	0.048	0.018	0.066	0.303	0.012	0.012	0.133	0.363	0.127	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018	J2a
NIC113	15	13	0.073	0.291	0.024	0.666	0.006	0.048	0.048	0.018	0.066	0.303	0.012	0.012	0.133	0.363	0.127	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018	J2a
NIC114	15	13	0.073	0.291	0.024	0.666	0.006	0.048	0.048	0.018	0.066	0.303	0.012	0.012	0.133	0.363	0.127	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018	J2a
NIC117	15	14	22	32	17	14	14	18	18	12	10	10	12	11	14	14	10	10	20	20	20	20	20	J2a
NIC119	15	14	23	30	16	14	13	13	13	12	10	10	12	11	14	14	10	10	20	20	20	20	20	J2a
NIC120	15	14	23	30	16	14	13	13	13	12	10	10	12	11	14	14	10	10	20	20	20	20	20	J2a
NIC122	16	13	24	29	14	14	14	16	16	12	9	9	12	11	14	14	10	10	20	20	20	20	20	J2a
NIC130	15	13	23	30	16	14	13	13	13	12	10	10	12	11	14	14	10	10	20	20	20	20	20	J2a
NIC145	15	14	23	30	16	14	13	13	13	12	10	10	12	11	14	14	10	10	20	20	20	20	20	J2a
NIC154	15	13	22	29	17	14	14	16	16	12	10	10	12	11	14	14	10	10	20	20	20	20	20	J2a
NIC163	15	13	24	29	14	14	13	13	13	12	10	10	12	11	14	14	10	10	20	20	20	20	20	J2a

ID	DYS456	DYS389I	DYS390	DYS389II	DYS458	DYS19	DYS385 a	DYS385 b	DYS393	DYS391	DYS439	DYS635	DYS392	GATA H4	DYS437	DYS438	DYS448	Predicción	CT-M168	DE-M145	D-M174	E-P170	FT-M213	K1-M9	HG
NIC014	5	12	22	28	16	15	14	14	14	10	11	20	11	13	16	16	11	11	21	G2a	-	-	-	-	G
NIC027	6	13	22	30	18	15,16	13	14	14	10	11	23	11	11	16	16	11	10	20	G2a	+	-	-	-	G
NIC121	6	13	23	29	17	14	12	13	13	11	13	21	11	11	16	16	10	10	20	G2a	+	-	-	-	H?
NIC126	16	13	22	30	17	15,16	13	14	14	10	11	23	11	11	16	16	11	11	20	G2a	+	-	-	-	G

ID	DYS456	DYS389I	DYS390	DYS389II	DYS458	DYS19	DYS385 a	DYS385 b	DYS393	DYS391	DYS439	DYS635	DYS392	GATA H4	DYS437	DYS438	DYS448	Predicción	BT-M42	CT-M168	CR-F54711	DE-M145	D-M174	E-P170	FT-M213	K1-M9	P-M445	Q-M242	Q103a-M3	R-M207	HG	
NIC001	14	23	30	17	14	14	17	17	13	10	11	13	13	11	14	14	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	KT
NIC003	16	23	27	17	13	13	13	13	13	10	12	13	13	11	14	14	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	KT
NIC008	16	23	28	17	13	13	13	13	13	10	12	13	13	11	14	14	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	KT
NIC081	15	23	29	18	13	14	13	10	12	12	21	13	11	14	9	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	Q103a
NIC100	15	24	29	18	13	14	13	10	12	12	22	13	11	14	11	14	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	KT
NIC149	15	23	30	14	16	16	14	11	11	11	15	15	11	14	9	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	KT
NIC093	15	22	29	14	16	16	14	11	11	11	20	11	11	14	8	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	A
NIC164	13	24	31	18	15	11	11	13	13	10	13	12	11	12	15	10	10	10	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	B



**Anexo 5.** Haplotipos de 10 X-STRs de la población mestiza de Nicaragua.

ID	DXS6789	DXS6809	DXS7132	DXS7133	DXS7423	DXS8378	DXS9898	DXS9902	GATA172D05	GATA31E08
NIC1	20	33	16,3	9	17	10	14	13	10	11
NIC2	16	34	14	9	17	11	13	11	11	12
NIC3	21	31	13	9	15	13	12	11	6	13
NIC4	19	31	14	9	16	11	13	13	10	12
NIC5	16	34	13	9	17	10	13	11	8	11
NIC6	20	33	12	9	15	12	14	11	10	13
NIC7	22	31	15	9	14	12	13	13	8	12
NIC8	16	33	14	11	17	10	12	11	8	12
NIC9	20	32	14	9	15	10	12	11	10	11
NIC10	20	34	14	9	15	10	14	12	12	11
NIC11	20	35	13	10	14	11	11	12	8	12
NIC12	21	35	13	9	17	11	13	12	6	11
NIC13	16	34	15	9	15	10	12	12	12	9
NIC14	16	34	14,3	9	16	12	12	11	14	11
NIC15	20	32	13	11	14	11	13	13	9	12
NIC16	19	33	14	9	13	12	10	12	11	12
NIC17	21	34	14	9	14	10	13	13	11	12
NIC18	20	33	15,3	11	14	11	13	11	8	11
NIC19	16	33	14	10	14	10	8,3	11	10	9
NIC20	19	34	16	13	15	10	14	11	8	12
NIC21	16	34	13	9	15	10	13	11	12	13
NIC22	20	36	13	10	15	10	13	12	8	12
NIC23	20	31	14	9	17	11	12	11	11	10
NIC24	20	34	15	11	17	11	14	11	12	12
NIC25	20	32	15	9	15	11	12	13	11	11
NIC26	22	35	13	11	14	12	14	12	11	12
NIC27	21	33	12	9	15	12	13	11	6	13
NIC28	21	35	13	9	14	10	12	13	6	12
NIC29	20	37	14	9	14	10	11	13	6	12
NIC30	22	34	15	9	14	10	14	12	9	13
NIC31	16	33	14	9	14	12	13	12	8	12
NIC32	21	32	14	9	14	10	13	12	8	12
NIC33	15	33	13	11	14	12	12	12	10	12
NIC34	22	33	15	10	17	12	14	12	6	14
NIC35	20	32	14	11	15	11	13	12	6	9
NIC36	23	33	14	12	15	10	13	13	10	13
NIC37	21	32	15	11	16	12	14	13	11	12
NIC38	22	33	16,3	9	14	12	13	11	11	9
NIC39	15	30	15	9	15	12	14	12	10	12
NIC40	20	34	14	9	15	10	12	12	11	12
NIC41	20	34	16	9	17	10	14	12	8	9
NIC42	16	33	16,3	9	15	8	13	12,1	11	10
NIC43	16	37	15	11	17	11	13	11	11	12
NIC44	21	34	13	9	15	11	13	11	11	9
NIC45	21	34	13	9	17	10	12	11	8	10
NIC46	21	31	14	9	15	10	11	12	6	13
NIC47	20	31	13	9	14	10	13	11	12	11
NIC48	14	31	13	11	15	13	10	11	10	12
NIC49	21	33	14	10	14	10	13	11	8	13
NIC50	20	34	14	11	15	12	13	13	12	10
NIC51	20	34	14	9	15	12	13	11	10	9
NIC52	21	31	14	9	13	12	12	10	10	12
NIC53	15	34	14	9	17	10	12	12	11	10
NIC54	22	32	14	9	14	10	12	13	8	13
NIC55	16	34	14	9	14	12	13	11	10	12

Anexo 5. Continuación.

ID	DXS6789	DXS6809	DXS7132	DXS7133	DXS7423	DXS8378	DXS9898	DXS9902	GATA172D05	GATA31E08
NIC56	22	34	14	9	15	11	12	13	8	12
NIC57	19	29	13	11	15	11	12	11	6	10
NIC58	20	32	15	9	15	12	11	11	11	11
NIC59	16	34	12	11	14	10	14	9	12	12
NIC60	22	33	14	11	15	11	12	13	6	12
NIC61	20	33	13	9	17	10	13	11	12	12
NIC62	20	32	14,2	9	15	10	12	12	11	9
NIC63	20	32	13	12	15	10	14	12	8	12
NIC64	21	33	14	9	16	10	13	11	7	12
NIC65	22	34	16,3	9	15	12	12	11	10	13
NIC66	21	33	13	9	15	10	12	11	9	9
NIC67	21	30	14	10	14	11	14	11	10	12
NIC68	20	33	16	10	14	10	13	12	6	12
NIC69	19	28	14	11	15	10	11	12	9	12
NIC70	16	34	16	9	14	12	12	12	10	10
NIC71	20	35	14	9	17	12	13	13	11	11
NIC72	21	34	14	9	17	10	14	11	8	12
NIC73	21	34	15	10	15	13	12	13	8	11
NIC74	16	34	13	11	17	11	13	11	6	13
NIC75	21	34	15	9	15	11	13	11	12	9
NIC76	22	33	14	13	15	13	13	12	8	13
NIC77	20	33	15	9	17	10	13	12	8	13
NIC78	15	33	12	9	15	10	13	12	6	13
NIC79	20	34	16,3	9	17	10	13	12	12	14
NIC80	21	33	13	11	15	12	12	11	10	13
NIC81	20	33	16	14	17	11	12	12	10	12
NIC82	15	37	13	9	15	10	13	13	11	13
NIC83	21	33	15	11	15	11	12	13	12	12
NIC84	20	34	13	9	17	11	13	13,1	10	11
NIC85	20	33	14	9	14	13	11	9	11	12
NIC86	21	32	14	9	15	10	12	12	12	12
NIC87	16	36	15	9	15	10	12	11	11	12
NIC88	20	31	15	11	15	9	13	12	11	13
NIC89	16	33	12	11	15	12	13	12	8	13
NIC90	21	31	13	9	14	11	13	11	8	13
NIC91	16	34	12	9	14	11	13	13	8	11
NIC92	22	32	15	9	16	12	13	13	11	13
NIC93	20	33	11	9	14	11	13	11	10	9
NIC94	21	32	16,3	9	14	10	14	12	8	11
NIC95	15	32	13	9	17	10	14	12	11	12
NIC96	21	34	17	9	14	10	12	11	10	12
NIC97	20	34	13	10	13	11	12	11	8	12
NIC98	20	35	15	9	15	10	13	11	11	9
NIC99	20	34	13	9	17	11	13	11	12	12
NIC100	22	33	14	9	15	11	14	12	8	10
NIC101	20	33	14	9	15	11	13	11	10	11
NIC102	20	32	14	9	14	12	8,3	11	8	12
NIC103	20	34	13	9	14	10	12	12	7	7
NIC104	16	35	12	9	14	11	13	11	11	12
NIC105	21	34	15	11	16	11	12	11	6	11
NIC106	20	36	14	9	15	12	13	13	10	12
NIC107	21	33	15	9	14	11	13	12	12	9
NIC108	22	33	14	11	15	10	14	10	10	12
NIC109	16	32	14	13	15	12	13,3	13	8	12
NIC110	21	34	12	9	17	11	13	13	6	9
NIC111	22	34	13	11	15	12	10	11	11	11
NIC112	20	33	13	9	14	10	14	12	10	12

Anexo 5. Continuación.

ID	DXS6789	DXS6809	DXS7132	DXS7133	DXS7423	DXS8378	DXS9898	DXS9902	GATA172D05	GATA31E08
NIC113	19	34	13	10	17	10	13	12	11	9
NIC114	16	34	14	10	15	12	14	12	11	12
NIC115	21	34	16	9	15	11	12	12	8	12
NIC116	21	34	13	9	15	10	12	11	8	10
NIC117	20	33	14	9	16	11	13	11	10	11
NIC118	21	34	17,3	9	15	11	14	11	11	11
NIC119	20	33	13	9	15	11	11	12	10	12
NIC120	21	31	15	10	14	11	8,3	12	11	11
NIC121	16	33	14	11	16	10	13	12	11	10
NIC122	20	31	14	9	15	12	11	12	8	10
NIC123	20	33	15	11	17	10	14	11	8	12
NIC124	21	33	14	11	17	10	12	12	11	13
NIC125	22	33	15	9	15	10	12	12	11	12
NIC126	16	33	13	9	15	10	12	12	11	7
NIC127	20	31	14	9	15	10	11	11	8	11
NIC128	20	36	12	9	15	10	15	12,1	12	14
NIC129	17	32	13	10	14	10	13	13	11	11
NIC130	20	34	11	9	14	12	12	12	10	12
NIC131	21	31	12	11	13	11	13	12	8	11
NIC132	24	34	13	11	14	10	8,3	12	9	12
NIC133	20	33	14	9	17	11	13	13	10	12
NIC134	21	33	15	9	15	11	12	13	6	12
NIC135	20	32	13	9	17	10	14	13	10	12
NIC136	21	34	16	9	14	11	13	11	10	12
NIC137	20	34	13	9	15	10	13	11	8	11
NIC138	20	35	14	11	15	10	13	12	10	12
NIC139	21	34	15	9	14	10	14	12	12	12
NIC140	20	30	14	11	15	11	13,3	11	7	9
NIC141	15	33	13	11	16	10	13	12	6	11
NIC142	21	34	15	10	14	12	13	11	11	13
NIC143	16	33	14	11	17	11	13	13	10	11
NIC144	15	33	14	9	15	10	13	11	9	9
NIC145	21	31	13	11	16	10	13	12	11	9
NIC146	20	31	15	10	15	12	12	13	11	11
NIC147	20	33	15	9	17	10	11	11	10	12
NIC148	16	36	13	11	15	11	14	11	6	9
NIC149	21	33	16,3	9	15	10	13	12	11	14
NIC150	16	34	14	9	15	10	13	12	8	12
NIC151	21	34	13	9	15	12	13	11	8	12
NIC152	21	35	13	10	14	12	13	12	8	14
NIC153	22	33	12	9	14	10	12	10	11	11
NIC154	22	33	13	11	15	12	12	11	11	12
NIC155	21	32	13	11	14	10	13,3	12	10	13
NIC156	21	34	15	11	14	11	14	12	8	12
NIC157	16	34	12	9	15	10	13	12	11	11
NIC158	16	31	14	9	17	10	13	11	10	10
NIC159	16	34	14	10	17	10	13	12	8	12
NIC160	21	32	13	9	17	11	14	11	10	14
NIC161	20	33	14	11	14	10	13	11	7	12
NIC162	21	36	13	9	15	10	13	11	12	12
NIC163	20	31	15	7	14	12	12	12	11	12
NIC164	15	33	14	12	15	11	13,3	11	10	9
NIC165	21	30	13	9	16	12	8,3	11	6	10

**Anexo 6.** Frecuencias alélicas de los 10 loci X-STR en la población mestiza de Nicaragua.

Alelo	Frecuencias alélicas	s.d	Alelo	Frecuencias alélicas	s.d
DXS6789			DXS8378		
14	0,006	0,006	8	0,006	0,006
15	0,054	0,017	9	0,006	0,006
16	0,169	0,029	10	0,448	0,038
17	0,006	0,006	11	0,284	0,035
19	0,036	0,014	12	0,224	0,032
20	0,333	0,036	13	0,03	0,013
21	0,278	0,035	DXS9898		
22	0,103	0,023	8.3	0,03	0,013
23	0,006	0,006	10	0,018	0,01
24	0,006	0,006	11	0,06	0,018
DXS6809			12	0,254	0,034
28	0,006	0,006	13	0,436	0,038
29	0,006	0,006	13.3	0,024	0,012
30	0,024	0,012	14	0,169	0,029
31	0,109	0,024	15	0,006	0,006
32	0,121	0,025	DXS9902		
33	0,309	0,036	9	0,012	0,008
34	0,315	0,036	10	0,018	0,01
35	0,054	0,017	11	0,4	0,038
36	0,036	0,014	12	0,375	0,037
37	0,018	0,01	12.1	0,012	0,008
DXS7132			13	0,175	0,029
11	0,012	0,008	13.1	0,006	0,006
12	0,072	0,02	GATA172D05		
13	0,284	0,035	6	0,115	0,024
14	0,333	0,036	7	0,024	0,012
14.2	0,006	0,006	8	0,236	0,033
14.3	0,006	0,006	9	0,036	0,014
15	0,181	0,03	10	0,224	0,032
15.3	0,006	0,006	11	0,254	0,034
16	0,042	0,015	12	0,103	0,023
16.3	0,042	0,015	14	0,006	0,006
17	0,006	0,006	GATA31E08		
17.3	0,006	0,006	7	0,012	0,008
DXS7133			9	0,121	0,025
7	0,006	0,006	10	0,078	0,021
9	0,618	0,037	11	0,181	0,03
10	0,103	0,023	12	0,43	0,038
11	0,23	0,032	13	0,139	0,027
12	0,018	0,01	14	0,036	0,014
13	0,018	0,01			
14	0,006	0,006			
DXS7423					
13	0,024	0,012			
14	0,278	0,035			
15	0,43	0,038			
16	0,066	0,019			
17	0,2	0,031			



Anexo 7. Genotipos de 15 STRs autosómicos de la población mestiza de Nicaragua.

ID	D6S1179		D21S11		D7S820		CSF1PO		D3S1358		TH01		D13S317		D16S539		D2S1338		D19S433		VWA		TPOX		D18S51		AMEL		D5S818		FGA		
	A.1	A.2	A.1	A.2	A.1	A.2	A.1	A.2	A.1	A.2	A.1	A.2	A.1	A.2	A.1	A.2	A.1	A.2	A.1	A.2	A.1	A.2	A.1	A.2	A.1	A.2	A.1	A.2	A.1	A.2	A.1	A.2	
NIC001	12	12	31.2	32	12	12	10	10	12	14	17	6	7	8	14	12	12	17	17	13	14	15	17	8	11	16	17	X	Y	12	12	20	20
NIC002	11	13	28	29	8	10	11	12	17	18	6	6	8	11	12	21	24	13	14	15	15	17	8	8	17	18	X	Y	11	12	19	25	
NIC003	14	15	29	31	10	11	10	11	16	16	8	9	9	11	10	11	17	20	13	15	17	18	8	8	15	18	X	Y	11	13	22	23	
NIC004	14	15	29	31	11	13	12	13	15	16	7	7	11	14	10	18	18	14.2	15.2	15	16	16	8	8	14	18	X	Y	11	12	19	21	
NIC005	13	14	29	30	10	11	10	12	15	18	9.3	10	11	13	9	11	19	23	13.2	14	16	17	8	11	11	17	X	Y	9	12	12	25	
NIC006	13	13	27	30	12	12	11	12	15	16	6	7	12	12	9	11	17	18	13	15	18	19	8	8	14	14	X	Y	8	13	22	23	
NIC007	13	14	29	31.2	10	11	12	12	15	15	6	9.3	9	12	9	10	17	19	13.2	14.2	17	18	8	11	15	17	X	Y	7	11	19	23	
NIC008	10	14	29	30	11	13	11	12	15	18	6	9.3	12	13	10	23	23	12	13	16	17	11	12	14	16	X	Y	9	10	19	19		
NIC009	12	14	29	32	9	10	10	11	15	16	6	9	9	12	10	13	22	23	14.2	15	16	17	11	12	12	13	X	Y	12	12	23	24	
NIC010	11	13	31.2	32.2	8	12	11	12	14	16	7	8	8	10	11	11	19	21	13	13.2	15	15	8	8	14	16	X	Y	10	11	19	26	
NIC011	10	13	30	34.2	11	12	12	12	15	16	6	9	10	11	9	14	20	25	14	15	14	15	8	8	14	14	X	Y	8	13	19	25	
NIC012	12	14	29	30	11	12	12	12	13	16	6	9	9	14	10	13	24	24	12	14	16	17	10	12	15	17	X	Y	8	13	21	24	
NIC013	13	15	32.2	33.2	12	12	11	12	15	15	6	7	8	13	10	11	19	23	13	14	17	18	9	12	20	20	X	Y	9	11	18	23	
NIC014	13	13	28	30	8	10	12	13	15	17	9	9.3	9	11	9	12	17	23	14.2	15.2	16	16	8	11	12	22	X	Y	8	13	21	22	
NIC015	15	17	31.2	32.2	11	12	11	13	15	16	9.3	9.3	9	12	11	17	23	12	15	15	16	11	12	14	17	X	Y	9	12	22	23		
NIC016	11	13	30	32.2	10	10	9	10	14	17	6	8	12	14	11	13	19	22	13	14	13	19	8	10	15	16	X	Y	12	13	25	26	
NIC017	13	13	30	31	10	11	10	11	14	15	6	9	12	13	9	20	24	15	15	17	18	8	11	17	17	X	Y	11	11	22	26		
NIC018	10	12	30.2	32.2	8	11	11	12	14	19	7	9.3	8	12	10	12	20	20	14	14	15	16	8	12	13	15	X	Y	10	13	25	26	
NIC019	13	13	31.2	32.2	10	11	11	11	14	16	7	8	11	12	12	12	17	24	13	14	15	17	8	9	18	22	X	Y	11	12	22	23	
NIC020	12	13	29	30	11	11	7	10	15	16	6	7	8	9	9	13	21	23	13	15	15	19	8	11	18	18	X	Y	11	12	23	25	
NIC021	12	14	31.2	33.2	12	12	12	11	16	16	6	9.3	12	14	10	11	17	19	14	14	14	16	8	11	15	17	X	Y	10	11	19	25	
NIC022	14	15	28	30	9	12	10	10	15	15	7	7	8	9	10	20	22	12	13	13	17	18	8	10	14	23	X	Y	7	11	24	27	
NIC023	13	13	29	30	9	11	12	12	15	16	9.3	9.3	9	12	8	12	19	22	14	15.2	17	18	11	12	15	18	X	Y	9	11	21	25	
NIC024	10	14	29	36.2	9	12	12	12	15	17	6	9	9	11	11	13	22	23	14	15	16	17	8	11	15	17	X	Y	9	11	22	23	
NIC025	12	13	28	29	10	13	10	12	15	18	7	7	11	13	9	13	19	23	14	14	16	18	11	11	16	17	X	Y	12	12	19	23	
NIC026	12	13	32.2	33.2	11	12	11	12	15	16	6	7	9	11	9	12	17	27	13	15	15	17	8	12	17	18	X	Y	9	10	22.2	26	
NIC027	13	13	31	31.2	11	11	12	12	15	16	6	9.3	8	9	10	20	20	14	14	14	16	17	8	8	14	16	X	Y	12	12	24	26	
NIC028	14	14	29	29	10	12	12	12	17	18	6	6	9	11	10	10	19	24	12.2	13	16	17	8	11	16	17	X	Y	9	12	20	24	
NIC029	13	13	28	29	9	11	11	12	15	15	6	7	11	13	10	12	17	19	13	13	17	18	8	8	16	17	X	Y	11	12	20	23	
NIC030	10	15	29	29	10	10	11	12	16	18	6	6	10	12	9	12	23	25	12	15	16	18	8	9	16	18	X	Y	11	13	19	23	
NIC031	10	14	29	30	11	11	11	12	16	16	6	9	9	14	10	18	25	12	14	16	16	8	11	14	14	X	Y	9	12	26	26		
NIC032	13	14	29	32.2	8	10	11	11	15	15	7	9.3	10	11	11	20	20	12	13	16	17	8	11	15	18	X	Y	11	15	18	21	25	
NIC033	10	13	29	31.2	8	10	7	12	15	16	7	9	9	12	13	20	23	13	14	17	18	8	12	16	17	X	Y	11	12	25	26		
NIC034	9	12	30	32.2	10	12	9	10	15	17	7	9.3	13	13	10	14	22	24	14	15	17	18	8	9	16	17	X	Y	12	13	19	24	
NIC035	11	13	28	31.2	10	11	10	10	15	17	7	8	9	11	12	12	17	22	13	15	17	17	11	12	12	17	X	Y	11	13	19	23	
NIC036	13	13	29	30	11	11	10	12	16	16	6	7	9	13	11	18	20	13	14	16	18	8	11	12	17	X	Y	7	11	19	25		
NIC037	8	14	31	32.2	11	12	11	13	14	15	9.3	9.3	11	14	12	13	21	23	13	13.2	16	19	11	12	14	15	X	Y	11	11	19	20	
NIC038	12	15	30	33.2	10	11	10	12	15	16	9	9.3	12	14	10	11	19	19	13	15.2	16	18	8	12	16	17	X	Y	9	12	19	22	
NIC039	13	14	32	32.2	9	11	11	12	15	17	6	6	10	12	9	12	17	23	13	14	16	18	8	10	15	19	X	Y	11	12	23	24	
NIC040	10	13	29	29	11	12	11	13	15	15	6	6	11	14	9	10	18	23	14	16.2	17	17	8	10	16	17	X	Y	11	11	25	26	
NIC041	10	13	31	32.2	8	10	11	11	16	16	6	6	12	13	9	12	19	22	13.2	15.2	16	17	8	9	17	18	X	Y	11	13	19	23	
NIC042	12	14	29	32	11	11	10	12	14	15	6	9.3	10	12	10	11	23	24	12	13	15	15	8	10	14	19	X	Y	12	12	20	21	
NIC043	13	14	28	30	12	12	11	11	15	16	7	9.3	11	13	11	11	17	23	13.2	14.2	17	19	8	11	12	19	X	Y	11	12	21	24	
NIC044	14	15	29	32.2	11	13	12	13	15	15	9.3	9.3	11	14	10	13	23	24	13	13	13	18	8	10	12	16	X	Y	11	13	22	24	
NIC045	13	13	29	30	11	11	11	12	14	15	6	6	12	14	11	12	23	23	13	15	15	16	8	11	15	16	X	Y	11	12	21	28	
NIC046	13	14	28	32	12	12	10	11	14	17	9.3	10	9	12	8	12	19	24	14	15.2	16	17	8	11	17	17	X	Y	7	11	23	25	
NIC047	13	13	28	33.2	10	11	10	14	16	17	6	9.3	8	12	13	19	25	11	14.2	17	17	8	10	13	15	17	X	Y	11	13	22	23	
NIC048	13	14	29	30	12	12	11	12	14	15	6	9.3	11	13	11	22	25	13.2	14	16	17	11	11	14	18	X	Y	12	13	24	26		
NIC049	10	14	30	32.2	10	11	8	12	15	17	6	9	9	10	10	23	23	13	15	16	16	8	11	12	12	18	X	Y	9	12	22	25	
NIC050	11	15	29	29	10	11	11	11	15	16	6	7	11	13	10	11	19	23	15	15.2	16	17	8	12	17	22	X	Y	9	11	21	22	
NIC051	13	15	29	31	12	12	12	12	16	16	7	9.3	9	12	11	13	19	23	13	13	16	16	8	8</									

Anexo 7. Continuación.

ID	D8S1179	A.1	A.2	D21S11	A.1	A.2	D7S820	A.1	A.2	CSF1PO	A.1	A.2	D3S1358	A.1	A.2	TH01	A.1	A.2	D13S317	A.1	A.2	D16S539	A.1	A.2	D2S1338	A.1	A.2	D19S433	A.1	A.2	VWA	A.1	A.2	TPOX	A.1	A.2	D18S51	A.1	A.2	AMEI	A.1	A.2	D5S818	A.1	A.2	FGA	A.1	A.2
NIC054	13	13	28	31.2	10	12	12	12	13	15	18	6	7	8	9	8	9	11	12	10	11	12	13	22	22	13	13	15	15	15	8	8	12	12	12	X	Y	11	11	21	21	26						
NIC055	11	13	28	31.2	8	11	12	12	16	17	6	8	9	12	10	11	16	16	13	13	19	19	8	8	13	13	19	19	8	8	13	19	8	8	13	19	X	Y	7	11	23	26						
NIC056	13	13	29	29	8	13	10	10	15	16	8	9.3	12	13	11	13	23	24	13	13	15	19	11	12	17	X	Y	9	9	11	12	17	X	Y	9	11	24	25	25									
NIC057	13	13	30	30	10	11	10	10	14	18	6	9.3	9	11	10	13	17	23	14	14	16	16	8	10	13	13	14	16	16	8	10	13	13	X	Y	8	12	19	19	19								
NIC058	13	14	31	32.2	9	10	10	10	11	14	18	7	7	8	11	10	22	25	13	15	15	18	8	11	13	19	14	16	18	8	11	13	19	X	Y	11	12	20	24	24								
NIC059	13	13	30	33.2	7	9	9	10	12	16	17	6	8	8	8	12	13	19	19	12.2	14	16	20	8	8	11	12	15	16	8	8	12	19	X	Y	7	11	19	25	24								
NIC060	12	14	29	33.2	10	10	10	10	10	15	15	6	9	11	11	18	20	15.2	15.2	15	16	20	8	8	11	14	16	16	8	8	11	14	X	Y	10	11	22	24	24									
NIC061	13	14	31.2	32.2	10	13	11	13	14	16	16	6	9	8	12	11	23	24	13	14	16	17	8	11	17	21	X	Y	11	17	21	X	Y	11	11	19	24	24										
NIC062	10	13	30	33	11	11	12	12	15	17	6	7	9	11	10	12	20	26	12.2	14	15	16	8	8	13	15	X	Y	11	13	15	X	Y	11	11	20	25	25										
NIC063	11	12	29	32.2	10	12	10	12	15	16	7	9.3	11	12	11	12	23	23	13	15	17	18	6	9	12	15	X	Y	7	12	15	X	Y	7	12	15	20	24										
NIC064	14	14	30	31.2	12	12	12	10	10	15	15	7	9	9	11	19	23	23	13	16	16	16	8	8	16	17	X	Y	11	16	17	X	Y	11	11	22	24	24										
NIC065	12	14	30	30	8	11	11	11	16	18	7	9.3	10	12	10	13	20	23	13	14	16	20	8	12	15	18	X	Y	15	18	X	Y	9	11	23	26	26											
NIC066	13	14	29	29	10	12	9	11	15	18	7	7	7	11	11	23	25	13.2	15	17	18	8	10	14	14	X	Y	10	14	14	X	Y	11	11	24	26	26											
NIC067	13	14	31	32.2	8	11	11	11	15	15	9.3	9.3	9	11	9	20	23	13	15.2	16	17	10	11	12	22	X	Y	11	12	22	X	Y	11	12	19	26	26											
NIC068	12	14	31	33.2	9	11	10	10	14	17	6	7	7	11	12	23	25	13	15	17	17	8	9	17	17	X	Y	9	17	17	X	Y	9	11	18	18	18											
NIC069	10	14	29	34.2	10	10	10	10	15	15	6	7	7	9	11	17	23	23	13	13	14	18	8	10	15	18	X	Y	11	15	18	X	Y	11	11	23	26	26										
NIC070	12	12	27	29	10	11	10	10	12	16	18	6	9.3	11	12	23	25	13	13.2	16	19	8	8	17	18	X	Y	8	8	17	18	X	Y	11	13	21	23	23										
NIC071	13	14	28	29	10	10	10	10	15	15	6	6	6	11	13	20	23	13.2	13.2	16	17	9	11	13	22	X	Y	11	13	22	X	Y	11	13	24	25	25											
NIC072	12	14	29	31.2	9	11	9	9	12	15	17	6	7	11	14	17	25	25	13	15	17	18	8	12	12	16	X	Y	12	16	X	Y	12	13	24	24	24											
NIC073	12	14	30	31	10	13	12	12	15	15	15	7	9	12	13	23	23	13.2	15	16	17	8	8	13	16	X	Y	13	16	X	Y	12	12	22	24	24												
NIC074	11	12	30	30.2	10	12	10	12	16	17	6	7	7	9	11	10	21	21	14	14	17	17	8	11	13	17	X	Y	10	13	17	X	Y	10	11	23	23	23										
NIC075	12	16	27	30	10	12	10	12	15	15	6	6	6	11	12	20	24	13.2	14	16	16	8	8	21	21	X	Y	7	12	21	X	Y	7	12	21	23	23											
NIC076	12	14	29	29	11	11	12	10	15	15	6	6	6	12	12	18	22	14	14	15	16	10	11	13	17	X	Y	9	12	17	X	Y	9	12	19	25	25											
NIC077	13	15	30	30	10	12	11	12	15	16	6	6	6	12	12	19	22	11	13	16	16	8	11	17	22	X	Y	11	17	22	X	Y	12	12	23	25	25											
NIC078	12	14	30	31.2	8	11	12	12	15	15	9	9.3	12	12	11	20	20	13	14	19	19	8	11	19	22	X	Y	11	19	22	X	Y	11	12	25	25	25											
NIC079	10	14	30	31	10	11	12	12	15	17	6	9.3	9	13	9	10	18	20	13.2	14	15	17	9	12	15	21	X	Y	11	15	21	X	Y	11	11	25	25	25										
NIC080	13	14	29	33.2	12	12	12	12	16	18	8	9	9	11	13	19	23	13	15	17	18	8	11	15	19	X	Y	9	11	15	19	X	Y	9	11	21	24	24										
NIC081	11	12	29	31	8	13	12	12	16	17	6	8	8	13	9	16	17	13.2	15	17	17	8	11	13	17	X	Y	9	12	17	X	Y	9	12	21	23	23											
NIC082	14	15	29	36.2	9	11	10	10	14	14	15	8	9	9	11	12	22	22	13.2	14	16	17	8	11	14	17	X	Y	7	9	14	17	X	Y	7	9	20	21	21									
NIC083	13	13	30	31.2	11	12	10	10	14	15	6	7	7	8	9	12	20	20	15	16.2	17	17	8	11	14	18	X	Y	11	14	18	X	Y	11	13	21	21	26										
NIC084	8	14	30	32.2	10	12	8	10	16	17	6	6	6	11	13	20	20	12	13	16	17	8	8	12	14	X	Y	12	14	X	Y	12	14	X	Y	12	13	24	24	24								
NIC085	14	15	28	29	12	12	12	12	15	18	9.3	9.3	10	13	12	13	19	20	15	15	16	19	8	8	14	17	X	Y	12	17	X	Y	12	12	22	26	26											
NIC086	13	13	29	30	10	11	12	12	14	18	7	7	7	9	10	20	24	14	14	15	16	8	11	17	18	X	Y	12	16	X	Y	12	16	X	Y	12	22	26	26									
NIC087	13	14	29	30	8	10	10	12	16	18	6	9.3	9	9	10	24	24	14	14	16	16	8	11	17	18	X	Y	11	17	18	X	Y	11	11	20	26	26											
NIC088	13	13	29	34	10	12	10	12	16	18	6	6	6	9	10	23	24	13.2	15.2	16	17	9	11	15	17	X	Y	12	17	X	Y	12	12	21	26	26												
NIC089	10	13	31.2	32.2	8	10	11	12	15	17	6	7	7	11	13	17	25	25	13.2	15	17	17	8	8	14	16	X	Y	9	14	16	X	Y	9	11	22	24	24										
NIC090	11	14	28	29	11	12	11	12	14	15	6	8	8	11	12	21	24	12	13	14	16	11	12	14	17	X	Y	11	14	17	X	Y	11	13	19	26	26											
NIC091	12	14	30.2	32.2	9	11	12	12	16	16	7	8	8	11	11	17	22	22	13	15	16	18	6	11	14	18	X	Y	9	14	18	X	Y	9	10	19	19	19										
NIC092	13	13	30	32.2	8	12	11	12	15	18	9	9	9	12	12	22	25	12	15.2	17	19	11	11	15	17	X	Y	12	19	X	Y	12	12	24	24	24												
NIC093	10	13	29	30	9	10	10	11	13	15	17	6	6	9	11	23	24	12	13	16	17	8	9	15	17	X	Y	11	15	17	X	Y	11	11	22	23	23											
NIC094	14	15	29	32.2	10	12	10	12	15	15	6	6	6	9	12	22	23	13	14	15	17	8	11	16	20	X	Y	9	16	20	X	Y	9	11	19	24	24											
NIC095	13	14	33.2	33.2	9	11	10	10	15	15	6	6	6	9	12	23	26	12	14	16	18	8	11	13	17	X	Y	9	13	17	X	Y	9	11	21	23	23											
NIC096	13	14	29	32.2	10	11	11	11	15	18	6	7	7	10	11	17	20	13.2	15.2	16	18	8	9	15	17	X	Y	10	15	17	X	Y	10	11	19	21	21											
NIC097	13	14	30.2	34.2	10	11	10	10	15	15	6	6	6	11	11	17	23	13.2	14.2	15	17	8	11	13	14	X	Y	9	13	14	X	Y																





## Genetic Data of 15 STR-PCR Polymorphisms in a Mestizo Population from Nicaragua (Central America)

Núñez C, Sosa C, Baeta M, Casalod Y, Abecia E and Martínez-Jarreta B  
FORENSIC MEDICINE DEPARTMENT, UNIVERSITY OF ZARAGOZA (SPAIN)

### INTRODUCTION

Population databases are dramatically important in Forensic Genetics. In Forensic casework the most used DNA markers are autosomic STRs, however there are still some important Population Groups not enough characterized for these genetic systems. This is the case of certain Central American populations as those from Nicaragua. Nicaraguan population has been described as heterogeneous, because it is composed by Mestizos (69%), Caucasians (17%), Afroamerican (9%), and Native Amerindian (5%) (1). There is a lack of information on Nicaraguan Population from a genetic point of view (2) and this can be an issue when solving Criminal, Paternity and Identification problems. Here we show preliminary results of a survey aimed to put an end to this situation by generating Central American genetic population data for the most used forensic genetic markers (3,4). Allele frequency distribution of 15 Autosomic STR markers in a Nicaraguan Mestizo population is presented.

### MATERIAL AND METHODS

**Population Sample:** blood drops from healthy unrelated individuals born and living in Nicaragua stored on FTA® cards (N= 159).

All they were Nicaraguan "Mestizos".

**DNA extraction:** Chelex® 100 method.

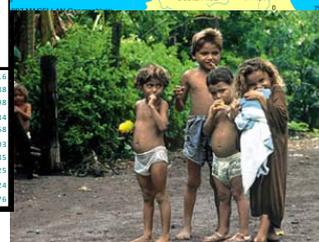
**DNA quantification:** Quantifiler Human DNA Quantification kit (Applied Biosystems, INC.).

**Typing:** Amelogenine and 15STR markers by AMPFISTR® Identifiler kit in ABI Prism 310 (Applied Biosystems).

**Analyses of data:** Statistical parameters were studied using the computer programme HWE-analysis version 3.3 (3, 4).

Allele	D8S1179	D21S11	D7S820	CSF1PO	D3S1358	TH01	D13S317	D16S539	D2S1338	D19S433	VWA	TPOX	D18S51	D5S818	FGA
6		0,0031				0,3994							0,0094		
7		0,0063	0,0126			0,217							0,0031	0,0409	
8	0,0031	0,0723	0,0094			0,0755	0,0755	0,0157					0,4811	0,0189	
9	0,0063	0,0629	0,0346			0,1132	0,217	0,1289					0,0692	0,1195	
9,3						0,1824									
10	0,0912	0,2893	0,2233			0,0126	0,0881	0,2075				0,0094	0,044	0,0566	
11	0,0629	0,2956	0,2516			0,2327	0,2421				0,0094	0,2579	0,0094	0,3805	
12	0,1258	0,2327	0,3931			0,1918	0,2516				0,0849	0,1321	0,0943	0,2767	
13	0,3365	0,0346	0,066	0,0031		0,1258	0,1321				0,2516	0,0031	0,0849	0,1038	
13,2						0,1132									
14	0,2453	0,0031	0,0094	0,1101		0,066	0,022				0,239	0,0283	0,0031	0,1352	0,0031
14,2						0,0346									
15	0,1164			0,4151		0,0031					0,1667	0,1101		0,1541	
15,2						0,0692									
16	0,0031			0,2673				0,0189			0,0054	0,3585		0,1258	
16,2						0,0063									
17	0,0063			0,1069				0,2987			0,2987		0,195		
18	0,0031			0,0912				0,0566			0,1352		0,0881	0,0189	
19				0,0031				0,1447			0,0597		0,0472	0,1132	
20				0,0031				0,1258			0,0063		0,0189	0,0692	
21								0,0283			0,0157		0,0106	0,1006	
22								0,0849					0,0252	0,1101	
23								0,2421					0,0031	0,1505	
24								0,0943					0,0031	0,1478	
25								0,0597					0,0031	0,1352	
25,2								0,0126						0,1224	
26								0,022						0,022	
27		0,0126												0,0063	
28		0,0723													
29		0,2547													
30		0,2107													
30,2		0,0283													
31		0,066													
31,2		0,1226													
32		0,022													
32,2		0,1226													
33		0,0063													
33,2		0,0535													
34		0,0063													
34,2		0,0157													
35,2		0,0063													
X <sup>a</sup>	0,2	0,7194	0,3178	0,4214	0,884	0,9846	0,8736	0,9974	0,233	0,5784	0,5766	0,9106	0,1894	0,6868	0,8
G-T est	0,484	0,9582	0,3356	0,3088	0,9932	0,9932	0,981	0,9944	0,9358	0,576	0,878	0,6806	0,9016	0,7712	0,6188
E-T est	0,8	0,5668	0,106	0,56	0,782	0,2484	0,2194	0,2416	0,2256	0,29	0,62	0,64	0,1926	0,506	0,0458
DBs H	0,7764	0,8758	0,764	0,7081	0,677	0,7329	0,8509	0,8261	0,8199	0,8137	0,7391	0,7019	0,8696	0,7205	0,8634
Exp H	0,7927	0,8528	0,7725	0,7355	0,7334	0,7502	0,8352	0,8076	0,8699	0,8322	0,756	0,6878	0,8805	0,7569	0,8868
ME C	0,586	0,6927	0,5432	0,4898	0,4955	0,5176	0,6524	0,5991	0,7227	0,6511	0,5246	0,4406	0,7405	0,532	0,7503
ME P	0,5855	0,7005	0,5491	0,4853	0,4819	0,5101	0,6658	0,6133	0,7344	0,6602	0,5201	0,4097	0,7358	0,5217	0,7689
PI C	0,7623	0,8341	0,7341	0,6909	0,6923	0,7119	0,8111	0,7766	0,8538	0,8085	0,7167	0,6424	0,8656	0,7202	0,8725
PI M	0,684	0,8436	0,6942	0,6173	0,6136	0,6106	0,6582	0,6722	0,6348	0,6557	0,6101	0,61	0,6339	0,6926	0,6239
PD	0,316	0,9564	0,9058	0,8827	0,8864	0,8994	0,9418	0,9278	0,9652	0,9443	0,8929	0,839	0,9651	0,9075	0,9676

TABLE 1. Observed allele frequencies and statistical parameters of forensic interest for the 15 STR loci studied.



### DISCUSSION

Distribution of observed allele frequencies and statistical parameters of forensic efficiency for the studied STR loci are shown in Table 1. Hardy-Weinberg Equilibrium was proven by different tests as can be also observed in Table 1. These results revealed a high forensic efficiency of these STR markers in Mestizo Nicaraguan population.

### REFERENCES

1. CIA World Factbook 2007 ([www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/](http://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/)).
2. Flores-Obando RE, Budowle B, Huete-Pérez JA. Allele frequencies for markers CSF1PO, TPOX, TH01, F13A01, FEFPS, vWA, D16S539, D7S820, D13S317 in the general population of Nicaragua. J Forensic Sci 2004; 49(2): 416-7.
3. Sánchez D, González-Andrade F, Martínez-Jarreta B. Population genetics of 12 STR loci in a sample of Mestizo population from Ecuador (South America). J Forensic Sci 2003; 48(2):482-483.
4. Martínez-Jarreta B, Vázquez P, Abecia E, Garde M, De Blas J, Budowle B. Autosomic STR loci (HUMTPOX, HUMTH01, HUMVWA, D18S53S, D1S1656 and D12S391) in San Salvador (El Salvador, Central America). J Forensic Sci 2004,49(3):1-2.



# Characterization of Y-STR loci in a population from Nicaragua and study of the Population Substructure

Baeta M, Nuñez C, Sosa C, Casalod Y, Gascón S, Ge J, Chakraborty R, Martínez-Jarreta B, Budowle B

FORENSIC MEDICINE DEPARTMENT, FACULTY OF MEDICINE, UNIVERSITY OF ZARAGOZA (SPAIN).

## INTRODUCTION

Y-chromosomal STRs typing have become a very useful tool in Forensic Genetics. However, population stratification among world-wide populations has been a concern in the generation of Y-STRs haplotype databases. The lack of independence between loci and smaller effective population size may yield greater populations substructure effects on a locus-by-locus basis than have been observed previously for the autosomal loci (1). Recently, Budowle et al (2) suggested that studies on forensically relevant populations are needed to determine empirically substructure effects and which correction methods might be used when estimating the rarity of a Y STR haplotype. This may be the case of some important population groups not enough genetically characterized, such as some populations from Central American (3) as Nicaraguans (4). Mostly composed by mestizos (69%), for decades Nicaraguan population has migrated to United States, contributing to increase the diversity of its gene pool.

Here we show preliminary results of a population study on Nicaraguan Mestizos based on 17 Y-STRs loci. Genetic parameters that impact forensic statistical calculations and the effects of population substructure when using these 17 YSTR loci were determined .

## MATERIALS AND METHODS

**Population:** Blood from 159 healthy and unrelated mestizos males from Nicaragua were collected.  
**DNA extraction:** Chelex® 100 method (Sigma).  
**DNA quantification:** Quantifiler Human DNA Quantification kit\*.  
**Amplification:** The 17 Y-STRs included in the AmpFLSTR® Yfiler™\* .  
**Typing:** The Y-STRs genotypes were determined using the ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, and automated allele sizing was performed using the GeneMapper ID v3.2.1 software\*.  
**Analyses of data:** Statistical parameters were studied using a program developed by Chakraborty and Lee (5)



## RESULTS

Table1. Locus Specific Power of Discrimination (PD) and Fst

Locus	PD	Fst <sup>1</sup>
DYS456	0.6755	0.0103
DYS389I	0.4914	0.0098
DYS390	0.6261	0.0143
DYS389II	0.6801	0.0086
DYS458	0.7417	0.0019
DYS19	0.6429	0.0281
DYS393	0.4883	0.0437
DYS391	0.56745	0.0090
DYS439	0.6618	0.0014
DYS635	0.6652	0.0075
DYS392	0.6657	0.0037
GATA H4	0.6364	-0.001
DYS437	0.5494	0.0512
DYS438	0.7032	0.0505
DYS448	0.6643	0.0010
DYS385	0.8512	0.0051

Maximum and minimum values in red.  
<sup>1</sup>Fst was calculated by Nicaraguan and Texas populations?  
<sup>2</sup>data unpublished by Budowle et al

Table2. Most frequently haplotypes observed in Nicaragua

Locus	No. of most frequent haplotypes						
	3	2	2	2	2	2	2
DYS456	15	15	15	15	16	16	17
DYS389I	14	14	14	13	14	13	13
DYS390	23	22	24	22	24	24	24
DYS389II	30	30	30	30	31	29	29
DYS458	16	16	16	17	17	18	17
DYS19	14	14	13	14	14	14	14
DYS385 a	12	12	13	12	13	13	13
DYS385 b	10	10	9	10	12	10	11
DYS393	11	12	10	11	13	13	12
DYS391	23	24	21	21	23	23	23
DYS439	11	12	11	11	13	15	13
DYS635	12	11	12	11	11	12	13
DYS392	15	15	14	16	14	14	15
GATAH4	9	9	10	9	13	11	12
DYS437	19	20	20	19	18	20	19
DYS438	13	13	13	15	11	14	11
DYS448	16	14	14	18	14	18	14

The rest of haplotypes (139 out of a total of 147) were observed once

Table3. Shared haplotypes between Nicaraguan and Texas populations

Loci	Haplotypes
DYS456	16 15 16
DYS389I	13 13 13
DYS390	24 24 24
DYS389II	29 29 29
DYS458	17 17 17
DYS19	14 14 14
DYS385 a	13 13 13
DYS385 b	11 11 11
DYS393	12 12 12
DYS391	23 23 23
DYS439	13 13 13
DYS635	13 12 12
DYS392	15 15 15
GATAH4	12 12 12
DYS437	19 19 19
DYS438	11 11 11
DYS448	14 14 14

Table 4. Maximum Fst and accompanying PD values for combination of loci

Combination of loci <sup>2, 3</sup>	Fst <sup>1</sup>	PD
12,	0.0512	0.5494
6,12,	0.0468	0.7546
6,12,13,	0.0296	0.8888
1,6,12,13,	0.0230	0.9291
1,5,6,12,13,	0.0167	0.9570
1,5,6,12,13,14,	0.0111	0.9732
1,5,6,10,12,13,14,	0.0080	0.9739
1,5,6,10,11,12,13,14,	0.0054	0.9830
1,5,6,8,10,11,12,13,14,	0.0040	0.9882
1,3,5,6,8,10,11,12,13,14,	0.0031	0.9889
1,3,5,6,8,9,10,11,12,13,14,	0.0021	0.9896
1,2,3,4,5,7,8,9,10,13,14,15,	0.0016	0.9889
1,2,3,4,5,7,8,9,10,12,13,14,15,	0.0012	0.9898
1,2,3,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,	8.16E-04	0.9913
1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,	6.26E-04	0.9918
0,1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,	4.20E-04	0.9924

<sup>1</sup>Fst was calculated by two populations Nicaraguan /Texas  
<sup>2</sup>0=DYS456, 1=DYS389I, 2=DYS390, 3=DYS389II, 4=DYS458, 5= DYS19, 6=DYS393, 7=DYS391, 8=DYS439, 9=DYS635, 10=DYS392, 11=GATA H4, 12=DYS437, 13=DYS438, 14=DYS448 and 15=DYS385 (contains two alleles)  
<sup>3</sup> These loci were combination of those that yielded the largest Fst value, other combinations yielded smaller Fst values.

## DISCUSSION

The results showed that Y-STR haplotypes are highly polymorphic and have a high power of discrimination in this Central American Mestizo population (Table1). Of all the loci, **DYS385** was the most polymorphic marker and **DYS393** the least discriminating. Most of the haplotypes were observed once:139 out of a total of 147 were unique haplotypes (Table2). The haplotype diversity was 0,9924. The shared haplotypes between Nicaraguan and Texas population are shown in Table3 .

To assess the effect of population substructure,  $F_{ST}$  values were determined (Table4). The  $F_{ST}$  value is 0.00042 for Nicaraguan mestizos for a 16 marker haplotype. Thus,  $F_{ST}$  values were small when 10-16 markers were used to estimate the rarity of a haplotype. So, the data further support the proposition of Budowle et al. (2) that there is no need to include substructure corrections for estimating the rarity of a YSTR profile comprised of 10 or more markers.

### References:

- Budowle B, Adamowicz M, Aranda XG, Barna C, Chakraborty R et al. Twelve short tandem repeat loci Y chromosome haplotypes: genetic analysis on populations residing in North America. *Forensic Sci Int.* 2005 May 28;150 (1):1-15.
- Budowle B, Ge J, Low J, Lai C, Yee WH, Law G, Tan WF, Chang YM, Perumal R, Keat PY, Mizuno N, Kasai K, Sekiguchi K, Chakraborty R. The effects of Asian population substructure on Y STR forensic analyses. *Leg Med (Tokyo).* 2009 Mar;11(2):64-9.
- Martínez-Jarreta B, Vázquez P, Abecia E, Budowle B. Characterization of 17 Y-STR loci in a population from El Salvador (San Salvador, Central America) and their potential for DNA profiling. *Journal of forensic sciences* 2005;50(5): 1243-6.
- Flores-Obando RE, Budowle B. Allele frequencies for markers CSF1PO, TPOX, TH01, F13A01, FESFPS, vWA, D16S539, D7S820, D13S317 in the general population of Nicaragua. *J Forensic Sci* 2004; 49(2): 416-7.
- http://ogi.ucu.edu/downloads/haplo/

**PATTERNS OF mtDNA DIVERSITY IN A CENTRAL AMERICAN POPULATION FROM NICARAGUA**  
 Nuñez C, Casalod Y, Baeta M, Sosa C, González-Andrade F, Martínez-Jarreta B, Budowle B.  
 FORENSIC MEDICINE DEPARTMENT, FACULTY OF MEDICINE, UNIVERSITY OF ZARAGOZA (SPAIN).

**INTRODUCTION**  
 Mitochondrial DNA (mtDNA) has proved to be very useful to describe human genetic variation, infer information about migration patterns, and for identity testing in forensic genetics (1). Population databases are very important for these issues. A major concern has arisen among the international scientific community with regard to the enlargement of population databases to increase the discrimination power (2). Although, several mtDNA sequences from worldwide populations have already been included, there are still some important population groups not enough characterized for this type of genetic system. This is the case of certain Central American populations such as Nicaragua (3). Nicaraguan population has been described as ethnically heterogeneous, since it is composed by Mestizos (69%), Caucasians (17%), Afroamerican (9%) and Native American (5%) (4). In this study, we investigated the sequence diversity of the mtDNA control region and the haplogroups frequency in a population sample from Nicaragua.

**MATERIALS AND METHODS**  
**Population:** Blood stains from 84 healthy and unrelated mestizos individuals from different regions of Nicaragua were collected.  
**DNA extraction:** Chelex® 100 method (Sigma).  
**DNA quantification:** Quantifiler Human DNA Quantification kit\*.  
**Amplification:** HVSI and HVSI1 regions were amplified.  
**Sequencing:** using BigDye® terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit\* and capillary electrophoresis on an ABI Prism 310 Genetic Analyzer\*.  
**Purification:** the first amplification products were purified using Exol and SAP(GE Healthcare). IBIAN® Dye Clean-up (IBIAN Technologies, Zaragoza, Spain) were used to remove dye terminators from sequencing reactions.  
**Data analysis:** sequences were aligned and compared to the rCRS using the sequence analysis and alignment software SeqScape®(Version 2.5), following international guidelines for mtDNA typing. Haplogroups and their frequencies were determined with a mtmanager tool (5). \* Applied Biosystems



Fig 1. Nicaragua location on Central America

**RESULTS**

Sample	Haplogroup	HVS1	HVS2	Sample	Haplogroup	HVS1	HVS2
Nic_001	A2	16111T, 16187T, 16296C, 16231T, 16297T, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C	Nic_299	A2	16111T, 16231T, 16255C, 16297T, 16297C, 16189C, 16174A, 16163C	73C, 146C, 155C, 194T, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C
Nic_002	B4	H498C, H498C, 16212C	73C, 265C, 309, 31C, 315, 31C	Nic_300	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C
Nic_003	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C	Nic_301	B4	H498A, H498C, H498C, H498C, 16212C, 16212C, 16212C	73C, 146C, 151T, 265C, 309, 31C, 315, 31C
Nic_004	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C	Nic_302	A2	16111T, 16187T, H498C, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C
Nic_005	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C	Nic_303	A2	16111T, H498A, H498C, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	73C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C
Nic_006	B4	H498C, H498C, 16212C	73C, 265C, 309, 31C, 315, 31C	Nic_304	A2	16111T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C
Nic_007	B4	H498C, H498C, 16212C	73C, 152C, 265C, 315, 31C	Nic_305	B1	ANDERSON	226C, 309, 31C, 315, 31C
Nic_008	B4	H498C, H498C, 16212C, 16212C	73C, 152C, 265C, 309, 31C, 315, 31C	Nic_306	A2	16111T, H498C, H498C, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 226C, 265C, 309, 31C, 315, 31C
Nic_009	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 199C, 225C, 265C, 315, 31C	Nic_307	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C
Nic_010	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 199C, 225C, 265C, 315, 31C	Nic_308	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C
Nic_011	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C	Nic_309	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C
Nic_012	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C	Nic_310	A4	16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	73C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C
Nic_013	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C	Nic_311	A2	16111T, H498C, H498C, H498C, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C
Nic_014	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C	Nic_312	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C
Nic_015	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 197C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C	Nic_313	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C
Nic_016	B4	H498C, H498C, 16212C	73C, 152C, 265C, 309, 31C, 315, 31C	Nic_314	B4	H498C, H498C, H498C, 16212C, 16212C, 16212C	73C, 152C, 265C, 309, 31C, 315, 31C
Nic_017	A2	16111T, 16187T, H498C, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 226C, 265C, 309, 31C, 315, 31C	Nic_315	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C
Nic_018	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C	Nic_316	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C
Nic_019	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C	Nic_317	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C
Nic_020	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C	Nic_318	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C
Nic_021	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 198T, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C	Nic_319	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C
Nic_022	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C	Nic_320	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C
Nic_023	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C	Nic_321	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C
Nic_024	B4	H498C, H498C, 16212C, 16212C	73C, 265C, 309, 31C, 315, 31C	Nic_322	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C
Nic_025	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C	Nic_323	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C
Nic_026	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C	Nic_324	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C
Nic_027	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C	Nic_325	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C
Nic_028	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C	Nic_326	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C
Nic_029	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C	Nic_327	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C
Nic_030	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C	Nic_328	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C
Nic_031	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C	Nic_329	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C
Nic_032	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C	Nic_330	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C
Nic_033	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C	Nic_331	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C
Nic_034	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C	Nic_332	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C
Nic_035	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C	Nic_333	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C
Nic_036	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C	Nic_334	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C
Nic_037	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C	Nic_335	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C
Nic_038	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C	Nic_336	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C
Nic_039	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C	Nic_337	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C
Nic_040	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C	Nic_338	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C
Nic_041	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C	Nic_339	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C
Nic_042	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C	Nic_340	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 225C, 265C, 309, 31C, 315, 31C
Nic_043	A2	16111T, 16187T, 16222T, 16297C, 16297C, 16174A, 16163C	447, 75C, 146C, 155C, 199C, 225C, 265C, 315, 31C	Nic_341	A2	16111T, 16187T, 1	



## Characterization of Y-STR, autosomal STR loci and mtDNA control region in a population from Nicaragua and study of the Population Substructure

Nuñez C<sup>a</sup>, Baeta M<sup>a</sup>, Sosa C<sup>a</sup>, Casalod Y<sup>a</sup>, Ge J<sup>b</sup>, Budowle B<sup>b</sup>, Martínez-Jarreta B<sup>a</sup>

a) Forensic Medicine Department, Faculty of Medicine, University of Zaragoza (Spain), b) Institute of Investigative Genetics, Department of Forensic and Investigative Genetics, University of North Texas, Health Science Center, Ft Worth, Texas 76107 (USA).

### INTRODUCTION

Generally, autosomal STRs are the current best loci when investigating human identity testing cases. However, in some sexual assault cases, where mixtures are often expected to occur, Y STRs can be quite informative (1). This is especially so when the signal from the male autosomal markers is largely obscured in these situations by an overwhelming amount of a female victim's DNA (2). In these (and other) cases, one may need to obtain a joint match probability for a set of autosomal and Y chromosome markers to extract the most power from an evidentiary profile.

In some forensic investigations the only evidence available contains very limited amounts and/or degraded DNA. Here, the analysis of mitochondrial DNA has proved to be the most efficient technology in order to obtain a genetic profile (3). Since both lineage genetic systems do not recombine and are uniparentally inherited, they are more susceptible to population substructure effects than autosomal STRs. Population substructure effects need to be determined since they may influence forensic statistical calculations for estimating the rarity of a profile (4). Additionally, genetic studies have shown that some level of substructure generally exists within populations groups and that many can be seen as the admixture of subgroups with a somewhat different haplotype composition (5). This population stratification among world-wide populations has been of interest for the generation of genetic databases (6). Thus, studies on forensically relevant populations, based on Y-chromosome STRs and mitochondrial DNA markers, are needed to determine empirically substructure effects (4). Some populations from Central America, such as Nicaraguans, are not well-defined for the battery of forensically-relevant genetic markers. Nicaraguans are predominately composed of mestizos (69%) and immigration continues to contribute to the diversity of its gene pool. In the present study, a population study is described on Nicaraguan Mestizos based on 17 Y-STRs, mitochondrial DNA control region sequence variation, and 15 autosomal STRs. Genetic parameters that impact forensic statistical calculations using these genetic systems were determined comparing Nicaraguan with Caucasian and Hispanic populations from Texas (4).

### MATERIALS AND METHODS

**Sample:** Blood was collected from 163 healthy, unrelated mestizos males from Nicaragua.

**DNA extraction:** Chelex® 100 method (Sigma).

**DNA quantification:** Quantifiler Human DNA Quantification kit\* (Applied Biosystems).

**Amplification:** The 17 Y-STRs included in the AmpFLSTR® Yfiler™\* and 15 autosomal STR loci included in the AmpFLSTR® Identifier® PCR Amplification kit\*. The HVSI (15996-16401) and HVSI (29-408) regions were sequenced using the BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing kit\*.

**Typing:** Autosomal and Y STR genotypes were determined using the ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, and automated allele sizing was performed using the GeneMapper ID v3.2.1 software\*. mtDNA sequences were analyzed by means of Sequencing Analysis software\* and compared with the rCRS with the SeqScape software\*.

**Analyses of data:** Statistical parameters were studied using a program developed by Chakraborty and Lee (7).

\* Applied Biosystems, Foster City, CA.

### RESULTS

**Table 1.** Number of different haplotypes and power of discrimination in Nicaraguan sample

	Y-STR	mtDNA
N° different haplotypes	155	107
PD	0.9932	0.9803

**Table 2.** Most common Y-STR and mtDNA haplotypes in Nicaraguan sample

System	Most common haplotype
Y-STR	19,12,11,11,14,9,10,15,23,30,13,16,16,15,12,14,23
mtDNA	16111T,16187T,16223T,16290T,16319A,16362C,64T,73G,146C,153G,235G,263G,309.1C,315.1C

	Nicaragua	
	Y-STRs	mtDNA
Caucasian <sup>a</sup>	-0.0024	0.00733
Hispanic <sup>b</sup>	0.00037	0.00737
Caucasian + Hispanic	0.00037	0.00259

**Table 4.** *F<sub>st</sub>* values for Nicaragua, and Caucasian and Hispanic populations from Texas

a. N=1711 for Y-STRs; N=1675 for mtDNA.  
b. N=730 for Y-STRs; N=924 for mtDNA.

**Table 3.** PD for each Y-STR marker in the Nicaraguan sample

Marker Combination	PD
DYS456	0.665964
DYS389I	0.5051
DYS390	0.641725
DYS389II	0.697881
DYS458	0.775791
DYS19	0.646694
DYS385	0.873951
DYS393	0.512853
DYS391	0.5666
DYS439	0.660544
DYS635	0.689375
DYS392	0.677105
GATA H4	0.630509
DYS437	0.563137
DYS438	0.720087
DYS448	0.680944

**Table 5.** Independence test based on mismatch distribution of Nicaraguan autosomal STRs, Y-STRs and mtDNA

Marker Groups	p-value
Autosomal STRs v.s. Y STRs	0.1201
Autosomal STRs v.s. mtDNA	0.7997
Y STRs v.s. mtDNA	0.2556

### DISCUSSION

The results showed that Y-STR and mtDNA haplotypes are highly polymorphic and have a high power of discrimination in this Central American Mestizo population (Table 1). Power of discrimination for each Y-STR loci is shown in Table 3. Most of the haplotypes were observed once: 155 Y-STR and 107 mtDNA haplotypes out of a total of 163 were unique haplotypes (Table 2). To assess the effect of population substructure, *F<sub>st</sub>* values were calculated for Nicaragua and diverse Texas populations (Table 4). The *F<sub>st</sub>* values were very small for the Nicaraguan and Caucasian Texan populations as well as for Nicaraguan and Hispanic Texan populations. Thus, statistical calculations for forensically purposes would not be affected when determining the rarity of a Nicaraguan profile based on 16 Y-STR and HVSI/III mtDNA in either the Nicaraguan or the U.S population database.

A test for independence based on mismatch distribution was calculated to determine if the frequencies of autosomal and Y-STR profiles can be multiplied under the assumption of independence (Table 5). There was no detectable evidence for departure from independence between the autosomal and Y-STR markers for Nicaraguans (*p*=0.1201). Hence, the data herein support that a single locus or multilocus autosomal STR profile frequency can be multiplied by the upper bound Y-STR haplotype frequency to provide an estimate of the rarity of the composite profile.

#### References:

1. Prinz M, Boll K, Shaler B. Multiplexing of Y chromosome specific STRs and performance for mixed samples. *Forensic Sci Int*, 1997; 85(3): 209-18.
2. Walsh B, Redd A, Hammer M. Joint match probabilities for Y chromosomal and autosomal markers. *Forensic Sci Int*, 2008; 174: 234-8.
3. Just R, Loney M, Barritt S, Los C, Smith B, Holland T, Parsons T. The use of mitochondrial DNA single nucleotide polymorphisms to assist in the resolution of three challenging forensic cases. *J Forensic Sci*, 2009; 54(4): 887-91.
4. Budowle B, Ge J, Aranda X, Planz J, Eisenberg A, Chakraborty R. Texas population substructure and its impact on estimating the rarity of Y-STR haplotypes from DNA evidence. *J Forensic Sci*, 2009; 54 (5): 1016-21.
5. Salas A, Bandelt HJ, Macaulay V, Richards MB. Phylogeographic investigations: The role of trees in forensic genetics. *Forensic Sci Int*, 2007; 168 (1): 1-13.
6. Kayser M, Brauer S, Schädlich H, Prinz M, Batzer M, Zimmerman P, Boath B, Stoneking M. Y chromosome STR haplotypes and the genetic structure of U.S. populations of African, European and Hispanic ancestry. *Genome Res*, 2003; 13(4): 624-34.
7. <http://cqi.uc.edu/downloads/haplo/>

## Reconstructing the Population History of Nicaragua by Means of mtDNA, Y-Chromosome STRs, and Autosomal STR Markers

Carolina Nuñez,<sup>1\*</sup> Miriam Baeta,<sup>1</sup> Cecilia Sosa,<sup>1</sup> Yolanda Casalod,<sup>1</sup> Jianye Ge,<sup>2,3</sup> Bruce Budowle,<sup>2,3</sup> and Begoña Martínez-Jarreta<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Forensic Genetics, Faculty of Medicine, University of Zaragoza, 50009 Zaragoza, Spain

<sup>2</sup>Institute of Investigative Genetics, Health Science Center, University of North Texas, Ft Worth, TX 76107

<sup>3</sup>Department of Forensic and Investigative Genetics, Health Science Center, University of North Texas, Ft Worth, TX 76107

**KEY WORDS** Central America; genetic admixture; Mestizos; Native Americans

**ABSTRACT** Before the arrival of the Spaniards in Nicaragua, diverse Native American groups inhabited the territory. In colonial times, Native Nicaraguan populations interacted with Europeans and slaves from Africa. To ascertain the extent of this genetic admixture and provide genetic evidence about the origin of the Nicaraguan ancestors, we analyzed the mitochondrial control region (HVS1 and HVS2), 17 Y chromosome STRs, and 15 autosomal STRs in 165 Mestizo individuals from Nicaragua. To carry out interpopulation comparisons, HVS1 sequences from 29 American populations were compiled from the literature. The results reveal a close relationship between Oto-manguean, Uto-Aztecan, Mayan groups from Mexico, and a Chibchan group to Nicaraguan lineages. The Native American contribution to present-day Nicaraguan Mestizos accounts for most of

the maternal lineages, whereas the majority of Nicaraguan Y chromosome haplogroups can be traced back to a West Eurasian origin. Pairwise  $F_{st}$  distances based on Y-STRs between Nicaragua and European, African and Native American populations show that Nicaragua is much closer to Europeans than the other populations. Additionally, admixture proportions based on autosomal STRs indicate a predominantly Spanish contribution. Our study reveals that the Nicaraguan Mestizo population harbors a high proportion of European male and Native American female substrate. Finally, the amount of African ancestry is also interesting, probably because of the contribution of Spanish conquerors with North African genetic traces or that of West African slaves. *Am J Phys Anthropol* 143:591–600, 2010. © 2010 Wiley-Liss, Inc.

Nicaragua is the largest country of Central America, bounded on the North by Honduras, the East by the Caribbean Sea, the South by Costa Rica, and the West by the Pacific Ocean. The origin of the Nicaraguan population, as most populations of Latin American countries, is composed of a substantial ethnic admixture. The colonization of Nicaragua in 1524 (Séjourné, 1972) introduced diverse populations that interacted and mixed with the resident Native Americans. These populations were the European (mainly Spanish) and the sub-Saharan African (who were brought as slaves). Nowadays, the Nicaraguan population is composed of Mestizos (69%), Caucasoids (17%), Africans (9%), and Amerindians (5%; CIA World Factbook, 2007). This panorama makes the study of the Nicaraguan population very interesting in terms of population genetic diversity and admixture.

The first migratory waves from Mesoamerica that established in Nicaragua were the Chorotega (or Mangue). Later, this group was forced to move from their territories to the central region of Nicaragua because of the arrival of the Nicaraos (Tous, 2003). Another Nicaraguan group was the Subtiaba (or Maribio), which may be related to the Chorotega. These groups mainly spoke languages of the Uto-Aztec and Oto-Manguean families. The Chontales (or Matagalpa) also occupied the central mountain region of Nicaragua. Their language has been classified into the Chibcha family (Paul, 2009).

The Caribbean coast of Nicaragua, where the Spanish did not settle until the 19<sup>th</sup> century, has a different history. Tribes with various dialects and languages related to Chibcha inhabited most of this area (Constenla, 2002). The Bawihka group, who lived in Northeast Nicaragua, mixed with African slaves from the British Caribbean territories. They expanded and began to control other indigenous groups such as the Sumus, Ramas, and Garifundas (Helms, 1996). This Afro-indigenous group became known as Miskito and today is the most numerous indigenous group in Nicaragua (VIII Censo de Población y IV de Vivienda, 2005).

A number of forensic and genetic population studies have focused on the American continent. Nevertheless,

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

\*Correspondence to: Carolina Nuñez Domingo, Laboratory of Forensic Genetics, Faculty of Medicine, University of Zaragoza, c/Domingo Miral s/n, 50009 Zaragoza, Spain.  
E-mail: cnunezdo@gmail.com

Received 16 February 2010; accepted 15 May 2010

DOI 10.1002/ajpa.21355  
Published online 18 August 2010 in Wiley Online Library  
(wileyonlinelibrary.com).

some populations are still genetically undefined, particularly populations from Central America such as those residing in Nicaragua.

Mitochondrial DNA and Y chromosome markers are very useful tools for investigating the genetic history of populations (Wallace et al., 1999; Jobling and Tyler-Smith, 2003). Lineage-based genetic marker variation has shown a strong phylogeographical structure among continental areas to the point that the majority of haplogroups are confined to a single continent and can be used to trace past and recent migrations (Roewer et al., 1996, 2005; Sampietro et al., 2005; Tamm et al., 2007). Several studies of different populations of Latin America, using these polymorphisms, observed strong sexual genetic asymmetries between male and female gene pools (Green et al., 2000; Mesa et al., 2000; Carvalho-Silva et al., 2001; González-Andrade et al., 2007). Thus, the mitochondrial DNA shows a predominantly Native American contribution whereas the Y chromosome indicates a substantial European contribution. These findings are in agreement with the historical records, which document that the majority of immigrants who entered America during colonial times were males (Sánchez-Albornoz, 1977). In addition, this asymmetry was reinforced by the social attitude of accepting marriage between European males and Native American females, whereas relationships between Native American men and European females were persecuted (Rodríguez-Delfin et al., 2001).

In the present study, we analyzed the mitochondrial DNA control region, 17 Y chromosome STRs, and 15 autosomal STRs of a population from Nicaragua, with the following aims: a) the genetic characterization of the Nicaraguan population, b) to survey the geographic origin of Nicaraguan ancestors, c) to determine the extent of the admixture present among the current Mestizo population, and d) to evaluate the differential sexual contribution to the gene pool of Nicaragua.

## MATERIALS AND METHODS

### Sample collection and DNA extraction

A total of 165 bloodstains were collected in FTA<sup>®</sup> paper from healthy unrelated Mestizo individuals who were born and reside in different departments of Nicaragua (Chinandega, Leon, Managua, Carazo, Chontales, Matagalpa, Esteli, Madriz, Nueva Segovia, Jinotega, Atlántico Norte, and Atlántico Sur). Informed consent was obtained from all individuals participating in the study. DNA was extracted using the Chelex-100 method (Walsh et al., 1991).

### PCR and mitochondrial DNA sequencing

The hypervariable regions HVSI (positions 15996–16401) and HVSII (positions 29–408) of the mtDNA genome were analyzed. PCR was performed using a 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA) in 20  $\mu$ l reactions using the HotStar Taq Plus Master Mix kit (Qiagen, Chatsworth, CA), including 1  $\mu$ l of the extracted DNA (0.5–3 ng of DNA), and following the manufacturer's conditions with little modifications. Primers for HVSI were L15996-H16401 and for HVSII

L29-H408 (Vigilant et al., 1991), both including the M13 sequence. DNA products were then purified using the MinElute PCR Purification kit (Qiagen, Chatsworth, CA) and sequenced in both directions using M13 primers. Sequencing reactions were performed using the BigDye<sup>®</sup> Terminator v1.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) following the manufacturer's conditions with slight modifications. Purification of sequencing products was performed with DyEx 2.0 Spin kit (Qiagen, Chatsworth, CA). Sequence reaction products were then analyzed on the ABI Prism<sup>™</sup> 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Sequences obtained were analyzed using the Sequencing Analysis software (Applied Biosystems, Foster City, CA) and compared with the rCRS using the SeqScape software (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Haplogroups were assigned by means of mtDNAmanager (Lee et al., 2008) and checked following the most updated versions of the mitochondrial DNA phylogeny (Achilli et al., 2008; van Oven et al., 2009).

**Quality checking.** To minimize the effects of laboratory and documentation errors, two independent members of the laboratory read the sequences separately. In some cases where the sequences were not sufficiently clear or possible phylogenetic inconsistencies were observed, DNA extraction and sequencing were repeated.

### Y chromosome genotyping

Y chromosome short tandem repeat (STR) markers included in the AmpFISTR<sup>®</sup> Yfiler<sup>®</sup> PCR Amplification kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) were analyzed in the ABI Prism<sup>™</sup> 310 Genetic Analyzer according to the manufacturer's recommendations. This set of markers was selected because it includes the "European minimal haplotype" (DYS19, DYS385a/b, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392, and DYS393; Kayser et al., 1997), the Scientific Working Group on DNA Analysis Methods recommended Y-STR loci (DYS438 and DYS439), and the highly polymorphic loci DYS437, DYS448, DYS456, DYS458, Y GATA H4, and DYS635 (formerly known as Y GATA C4) to further increase the power of discrimination (Mulero et al., 2006). Allele identification was performed by GeneMapper<sup>™</sup> ID software, version 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

As an approximate approach, although not 100% accurate, haplogroups were determined with 23-Haplogroup Beta Program of Haplogroup Predictor (Athey, 2006). This tool is based on a Bayesian approach based upon allele frequencies, which were calculated from collections of haplotypes extracted from published articles and databases (Athey, 2005). Such an approach does result in the probability that a Y-STR haplotype is in a haplogroup. The haplogroup assigned was the one that scored the highest probability. Additionally, we performed haplogroup determination by comparing with data sets from the literature in which both Y chromosome single nucleotide polymorphism (SNP) markers and Y-STRs had been typed (Bosch et al., 1999; Bortolini et al., 2003; Zegura et al., 2004; Adams et al., 2008; Coelho, 2009; Hammer et al., 2009). Haplogroup nomenclature is provided according to the most recent update (Karafet et al., 2008). Haplotypes consisting of nine Y-STR loci were searched in the largest Y chromosome haplotype database, YHRD, (Roewer et al., 2001) to observe the concordance between haplogroups and the frequency of each haplotype in worldwide metapopulations.

#### Abbreviations

AMOVA	analysis of molecular variance
HVS	hypervariable regions
MDS	multidimensional scaling
YHRD	Y chromosome haplotype database.

### Autosomal STRs

Fifteen autosomal STRs included in the AmpFISTR<sup>®</sup> Identifier<sup>®</sup> PCR Amplification kit (D8S1179, D7S820, D3S1358, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, D5S818, D21S11, CSF1PO, vWA, TH01, TPOX, D18S51, and FGA; Applied Biosystems, Foster City, CA) were analyzed following the manufacturer's recommendations. The amplified products and reference ladders provided with the kit were analyzed in the ABI Prism<sup>™</sup> 310 Genetic Analyzer. Electrophoresis results were analyzed using GeneMapper<sup>™</sup> ID software, version 3.1.

### Statistical analysis

**Mitochondrial DNA.** Diversity indices of HVSI sequences (haplotype and nucleotide diversity, and mean number of pairwise differences) were calculated using Arlequin 3.1 software (Excoffier et al., 2005). Nucleotide and sequence diversity were computed as proposed by Nei (1987). A median-joining network of Nicaraguan HVSI sequences was constructed using the Network 4.5.1.0 package (Bandelt et al., 1999). Positions 16,029–16,362 were considered, and nucleotide position was given a weight as in Brandstätter et al. (2008). Values of  $\rho$  and  $\sigma$  were converted to age estimates using the most recent mutation rate available for synonymous mutations of the HVSI segment of one transition per 16,677 years (in the nucleotide position range 16,051–16,400) (Soares et al., 2009).

To compare the present Nicaraguan results with other American populations, HVSI sequences from 1,649 American individuals were collected from the literature. American populations used for this purpose were: a) North Americans: Triqui, Tarahumara, Purepecha, Otomi, Mixtec, Xochimilco, Zitlala, Ixhuatlancillo, Necoxtla, Yucatec Maya, and Pima from Mexico (Sandoval et al., 2009), Nuu-Chah-Nulth, Haida, and Bella Coola from Canada (Ward et al., 1991, 1993), Navajo and Apache from Arizona (Budowle et al., 2002); b) Central Americans: Embera, Wounan, and Ngöbé from Panamá (Kolman et al., 1995; Kolman and Bermingham, 1997), Cuba (Mendizabal et al., 2008), El Salvador (Salas et al., 2009); c) South Americans: Arequipa, Tayacaja, San Martín, and Quechua from Peru (Fuselli et al., 2003; Sandoval et al., 2009), Araucarian from Chile (Horai et al., 1993), Cayapa and Waorani from Ecuador (Rickards et al., 1999; Baeta et al., 2009), Yanomami from Brasil (Easton et al., 1996). Population genetic structure was tested by analysis of molecular variance (AMOVA) (Excoffier et al., 1992), and pairwise  $F_{st}$  distances were calculated as proposed by Tajima and Nei (1984) using the Arlequin 3.1 software. To estimate the most likely putative origin (North, Central, or South America) of the Nicaraguan sequences, the probability of origin for each subcontinental region was calculated by a Bayesian approach (Mendizabal et al., 2008).

**Y chromosome.** The haplotype diversity and population pairwise  $F_{st}$  values were calculated with the Arlequin 3.1 software. Population pairwise  $F_{st}$  values were estimated for Nicaragua, Spain ( $n = 148$ ; Martin et al., 2004), Italy ( $n = 79$ ; Capelli et al., 2006), Germany ( $n = 89$ ; Rodig et al., 2007), United Kingdom ( $n = 249$ ; Ballard et al., 2005), France ( $n = 100$ ; Keyser-Tracqui et al., 2003), Arabic and Berber-speaking populations from Morocco ( $n = 109$ ; Quintana-Murci et al., 2004), Guiné-Bissau ( $n = 161$ ; Rosa et al., 2006), Angola ( $n = 236$ ; Coelho

et al., 2009), and Kichwa Native American ( $n = 101$ ; González-Andrade et al., 2007) populations. To maximize the amount of overlapping loci and samples nine Y-STR loci were considered (DYS19, DYS389I/II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, and DYS385a/b) for this purpose.

**Autosomal STRs.** Molecular diversity parameters were determined with the Arlequin 3.1 software. Admixture proportions based on 15 autosomal STRs were computed with Admix 2.0 (Dupanloup and Bertorelle, 2001) using Spanish (Camacho et al., 2007), Mexican Amerinds (Barrot et al., 2005), and Equatorial Guinea (Alves et al., 2005) together with Angola (Beleza et al., 2004) as ancestral populations. Admixture proportions and their standard deviations were estimated from 100,000 bootstrap iterations. This program can compute the estimator  $mY$ , initially described in Bertorelle and Excoffier (1998) and extended to any number of parental populations by Dupanloup and Bertorelle (2001). This estimator takes into consideration the frequencies of different alleles as well as the degree of molecular divergence between them. In the case of multilocus data, this approach is possible only when all loci have approximately the same mutation rate (Bertorelle and Excoffier, 1998). Since all 15 autosomal STRs analyzed herein have not similar mutation rates (Short Tandem Repeat DNA Internet DataBase), we have computed admixture coefficients separately for three classes of loci with similar mutation rates: a) TH01 and TPOX; b) D8S1179, D7S820, D3S1358, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, D5S818, D21S11, CSF1PO, and vWA; c) D18S51 and FGA. We obtained a final estimate from the average over classes of loci, weighted by the number of loci involved in each class.

## RESULTS

### Mitochondrial DNA

**Haplotype and sequence diversity.** A total of 68 different HVSI, 55 different HVSII, and 95 different HVSII/II haplotypes were found in the Nicaraguan population sample (ignoring the common insertions at positions 310 and 315 in the HVSII polyC tract). Mitochondrial DNA haplotypes and their corresponding haplogroups are provided in Supplementary file 1. Two samples were removed from the total because of inconclusive profiles. Some HVSI haplotypes are common in the sample, such as 16111T, 16223T, 16290T, 16319A, and 16362C, which are present in 16 individuals. Similar profiles were observed differing with transitions 16187 C→T and 16299 A→G, in 30 and 12 individuals, respectively.

Summary statistics for mtDNA HVSI sequence diversity are presented in Supporting Information Table S1. Haplotype and nucleotide diversity for the Nicaraguan population studied were 0.934 ( $\pm 0.013$ ) and 0.026 ( $\pm 0.014$ ), respectively. Native American populations with lower sequence diversity were Triqui ( $0.548 \pm 0.056$ ), Zitlala ( $0.593 \pm 0.144$ ), Pima ( $0.553 \pm 0.056$ ), and Waorani ( $0.222 \pm 0.047$ ).

**Haplogroup composition.** Figure 1A shows the frequency of each mtDNA haplogroup observed in the Nicaraguan sample. The most frequent haplogroup was the Native American A2 (73.62%), followed by haplogroup B4\* (14.11%). Haplotypes classified into the B haplogroup may be considered to belong to the common B2 Native American subclade (Achilli et al., 2008), but since

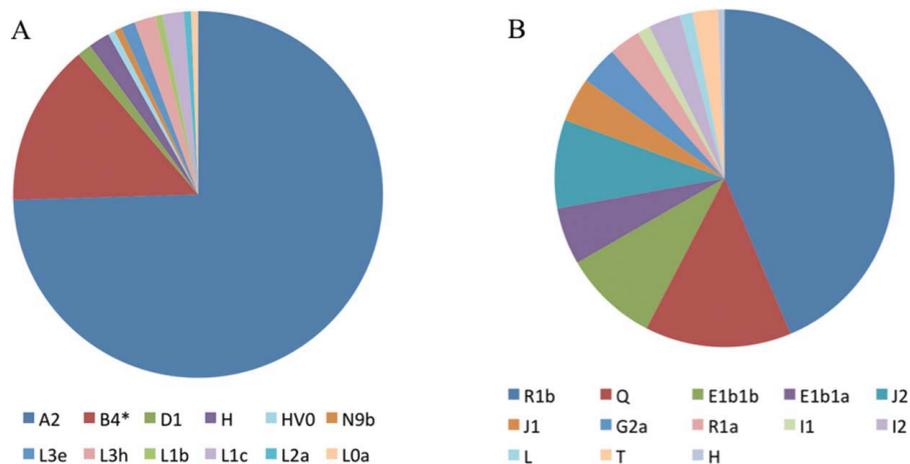


Fig. 1. Frequency of each mtDNA (A) and Y-chromosome (B) haplogroup found in Nicaragua.

the coding positions were not typed this subclade is classified as B4\* haplogroup. Native American haplogroups D1 and X2a were also present, but at very low frequencies (1.22 and 0.61%, respectively). The presence of one sample belonging to the X2a haplogroup may be because of recent migration from North America, since X2a has not been observed in Central America (Perego et al., 2009). Other Native American lineages, such as C1 and D4h3 (Tamm et al., 2007; Perego et al., 2009) are absent from our Nicaraguan sample.

Other non-Native American haplogroups were observed at low frequencies, H (2.45%), V (0.61%), L0a (0.61%), L1b (0.61%), L1c (1.84%), L2a (1.22%), L3e (1.22%), and L3h (1.84%). These latter haplogroups were not considered for computational analysis. Most of these sequences belong to sub-Saharan L haplogroups. Particularly, subhaplogroups L0a, L1b/c, L2a, and L3e/h were observed, which vary in their distribution throughout Africa (Salas et al., 2002; Coelho et al., 2009). Central America mainly harbors subhaplogroups of Western and West-Central Africa origin, such as L1b/c and L3e, consistent with the major source regions for American mtDNA lineages of African ancestry (Salas et al., 2004).

**Median-joining network.** With the aim of investigating the genetic relationship between the A2 mtDNA lineages observed in our dataset of Nicaragua, a median-joining network was constructed. The phylogeny of A2 in Nicar-

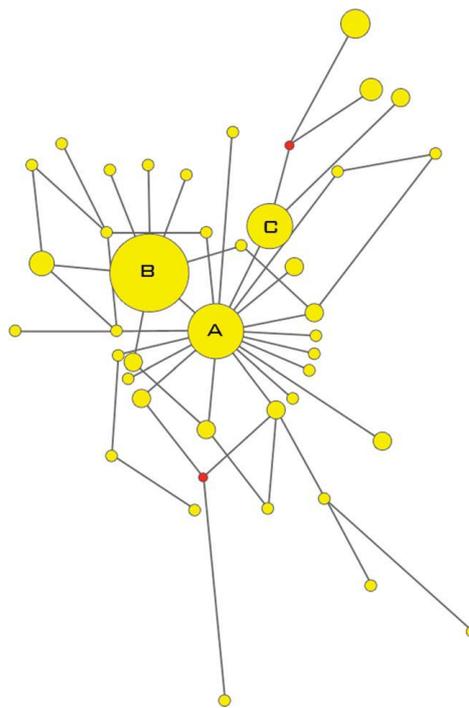


Fig. 2.

**Fig. 2.** Median-joining network of haplogroup A2 mtDNA sequences from Nicaragua. Only the variation contained in the HVSI region (range 16,029–16,362) was used. The areas of the circles are proportional to the number of individuals bearing the corresponding haplotype. A, B, and C show the haplotypes 16111T, 16223T, 16290T, 16319A, 16362C; 16111T, 16187T, 16223T, 16290T, 16319A, 16362C; and 16111T, 16223T, 16290T, 16299G, 16319A, 16362C, respectively.

agua is star-like (Fig. 2). It is rooted by the diagnostic sites C16111T, T16223C, C16290T, G16319A, and T16362C in HVSI (A in Fig. 2). Compared with the American database compiled herein, this haplotype was also observed in all American populations with the exception of Tarahumara, Necoxtla, Pima, and Wounan from Mesoamerica, and Arequipa, Araucarian, Quechua, Cayapa, Yanomami, and Waorani from South America. The haplotype referred to as B in Figure 2 of the Nicaraguan sample was also found in the Mexican populations Xochimilco and Maya, and in Ngöbé, Cuba, and El Salvador populations, all from Mesoamerica. Interestingly, haplotype referred to as C in Figure 2 bearing the transition 16299 A→G was only shared by four individuals from El Salvador. The estimated age for the haplogroup A2 based on the HVSI region was dated in  $13,834 \pm 7,113$  Y.B.P.

**AMOVA analysis.** When all American populations were classified by three major geographic regions: North, Central, and South, AMOVA analysis showed that 25.22% of the variability lies among populations within groups, 72.50% within populations, and a nonsignificant 2.28% ( $P > 0.05$ ) between groups. The results indicate genetic heterogeneity among the subcontinental regions and a lack of continental structure.

**Estimation of the geographic origin.** With the purpose of obtaining rough estimates for the putative geographic origin of Nicaraguan mtDNA lineages at a continental scale, the identical matching sequences in our database were searched in 29 published American populations classified by main geographical regions: North ( $n = 884$ ), Central ( $n = 287$ ), and South ( $n = 478$ ). Only 18 Native American Nicaraguan lineages, representing 60.7% of the Nicaraguan individuals, were found in the American database. The distribution of the Native American Nicaraguan sequences could be described as follows: 39.5% (SD = 5.2%) to North, 55.5% (SD = 5.3%) to Central, and 4.9% (SD = 2.3%) to South. The average proportions of Nicaraguan sequences found in each geographical region can be used as an approximation to infer the relationship of this population within the continent. As expected, the Nicaraguan mtDNA pool shows a closer relationship to Central American populations. Nonetheless, it is noteworthy that a high percentage (39.5%) of Nicaraguan lineages can be ascribed to a North American origin.

**Pairwise  $F_{st}$  distances.** To compare the Nicaraguan population with each of the American populations from our database, pairwise  $F_{st}$  distances were estimated (Supporting Information Table S2). The lower  $F_{st}$  values were for Nicaragua with Triqui, Mixtec (nonsignificant value,  $P > 0.05$ ), Xochimilco, and Zitlala from Mexico, Ngöbé and El Salvador populations from Central America.

#### Y chromosome

**Haplotype diversity.** From a total of 165 Nicaraguan individuals, there were 158 distinct haplotypes observed (based on 17 Y chromosome STR polymorphisms). Y chromosome STR haplotypes and their corresponding haplogroups are presented in Supplementary file 1. Most common haplotypes and their frequency in the Nicaraguan sample are shown in Supporting Information Table S3. Haplotype diversity was high, estimated as  $0.9993 \pm 0.0008$ , explained by the high polymorphic value of this set of markers.

**Haplogroup composition.** Figure 1B shows the haplogroup frequencies in the Nicaraguan dataset. The majority of Nicaraguan lineages can be traced back to the West Eurasian gene pool. The haplogroup with the highest frequency was haplogroup R1b (43.63%), followed by other Eurasian haplogroups at lower frequencies, J2 (8.48%), J1 (4.24%), G2a (3.63%), R1a (3.03%), T (2.42%), I1 (1.21%), I2 (3.03%), L (1.21%), and H (0.6%). African (E1b1a, E1b1b) and Native American (Q) haplogroups represent the 14.54% and 13.93% of the Nicaraguan sample, respectively.

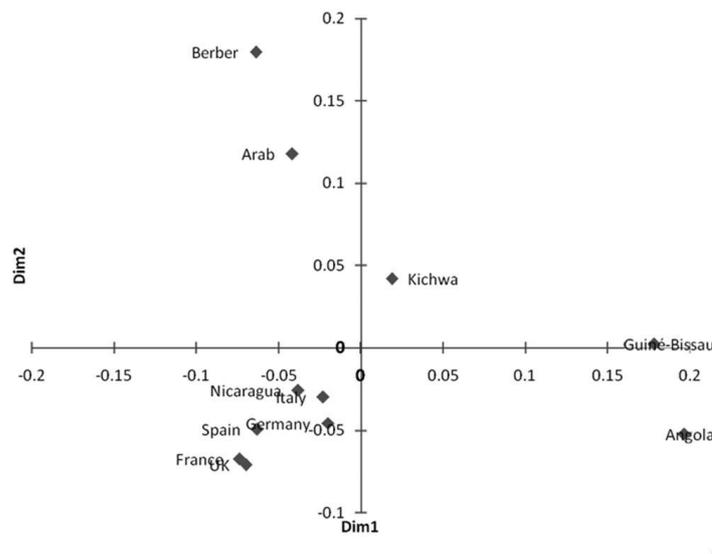
Multidimensional scaling (MDS) analysis of genetic distances based on Y-STR pairwise  $F_{st}$  estimates (Fig. 3) show a close correspondence between Nicaraguan Mestizos and European populations. In terms of pairwise distance estimates, Nicaragua appears to be much closer to Spain ( $F_{st} = 0.0144$ ) and Italy ( $F_{st} = 0.0140$ ) (Supporting Information Table S4). These results are in agreement with the haplogroup frequencies found in Nicaragua. R1b, the haplogroup with the highest frequency in our sample (43.63%), is the most common in Western Europe (Rosser et al., 2000; Semino et al., 2000), and approaches 66% in Spain (Adams et al., 2008). Moroccan populations show a lower genetic distance (Supporting Information Table S4) with Nicaragua than the other African populations. This result could be explained because the Iberian Peninsula and Balearic Island populations show 10.6% North African ancestry (Adams et al., 2008), because of the Islamic occupation from the 8th to the 15th century. Thus, Spanish conquerors could have introduced genetic traces of North African origin during the colonization of Nicaragua.

Among African haplogroups found in Nicaragua, E1b1b (or E3b) is the most frequent haplogroup (9.09%). This haplogroup is the most seen in North Africa (Arredi et al., 2004), but it has also been observed in Europe (Semino et al., 2000) and Western Asia (Underhill et al., 2000). On the other hand, E1b1a is restricted to Africa, being distributed at different frequencies throughout the continent, particularly in Western Africa at higher frequencies (Coelho et al., 2009). This proportion of E1b1a lineages found in Nicaragua (5.45%) may be because of the Western African slaves introduced by the Spanish during colonial times (Rout, 1976).

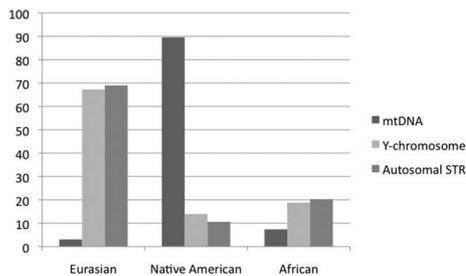
Haplogroup J is also present in the Nicaraguan sample at similar frequencies to E1b1a/b haplogroups (J1: 4.24%; J2: 8.48%). J2 lineages seem to display a decreasing frequency gradient from the Near East toward Western Europe, whereas J1 shows its highest frequencies in the Middle East, North Africa, and Ethiopia, and its lowest in Europe, having been observed only in the Mediterranean area (Semino et al., 2004).

#### Autosomal STRs

Autosomal STR genotypes and allele frequencies are provided in Supplementary file 1. Genetic diversity was high, estimated as  $0.792 \pm 0.06$ , according to expectations for admixed populations. Admixture proportions based on 15 autosomal STRs were calculated using Spanish, African from Equatorial Guinea and Angola, and Mexican Amerinds as ancestral populations. Admixture proportions in Nicaraguan Mestizos were ( $0.690 \pm 0.113$ ) Spanish, ( $0.203 \pm 0.089$ ) African, and ( $0.106 \pm 0.079$ ) Amerindian. Large standard deviations are a reflection of short genetic distances among the source populations.



**Fig. 3.** Multidimensional scaling (MDS) analysis based on Y-STR pairwise  $F_{st}$  estimates among European (Spain, Italy, France, Germany, and United Kingdom), African (Arabic and Berber-speaking populations from Morocco, Guiné-Bissau, and Angola), and American populations (Nicaraguan Mestizos and Amerindian Kichwa). Stress value = 0.12.



**Fig. 4.** Admixture estimates based on mtDNA, Y-chromosome STRs, and autosomal STRs data.

There are currently several existing panels of markers for ancestry analysis. To obtain accurate admixture estimates, the average allele frequency difference among ancestral populations and the choice of these populations are factors to take into consideration (Barnholtz-Sloan et al., 2008). Although representative populations have been used as ancestral populations in this study, the average allele frequency difference between ancestral populations is not  $>0.1$  (data not shown). Thus, these results should be regarded as a rough ancestry approximation.

#### Admixture estimates

Admixture estimates of the present Nicaraguan population are shown in Figure 4. Mitochondrial DNA and Y-

chromosome admixture proportions were based on haplogroup frequencies, grouping haplogroups by Native American, Eurasian, or African origin. The results indicate a vast Eurasian contribution on the basis of both autosomal STRs (69%) and Y chromosome haplogroup frequencies (67.27%), whereas the Amerindian component is mainly due to maternal contribution (89.57%). An African contribution was also detected, being higher with autosomal STRs (20.3%) and Y-chromosome (18.78%) than with mtDNA estimates (7.36%).

#### DISCUSSION

When Spanish conquerors arrived in Nicaragua, they found a densely populated area with several ethno-linguistic groups. Some of the major groups that inhabited Nicaragua before Columbian times may have migrated south from Mexico, being descendants of Aztec and Mayan cultures from Mesoamerica. Also, other groups belonging to the Chibcha linguistic family were generally present in the Central Mountain region and the Caribbean coast of Nicaragua. Mitochondrial DNA data obtained here supports that these groups could be the ancestors of the current Nicaraguan population, mainly composed of Mestizos. Haplotypic comparisons and pairwise  $F_{st}$  values show a relation of Nicaraguan lineages to Triqui, Mixtec (Oto-manguan linguistic family), Xochimilco, Zitlala (Uto-Aztecan linguistic family), Maya Mexican populations, and Ngobé (Chibcha linguistic family) from Panamá. In addition, when our Native American mtDNA sequences were analyzed within the

continental landscape, 39.5% of the lineages can be attributed to a North American origin.

Haplogroup A2 shows the highest frequency in Nicaragua (73.62%), and a significant percent of the Native American lineages (39.3%) remain unobserved in the other American populations used in this study. The high frequency of A2 haplogroup in Nicaragua is in agreement with the frequencies of this haplogroup in other Mesoamerican populations (Santos et al., 1994; Batista et al., 1995; Boles et al., 1995; Kolman et al., 1995; Kolman and Bermingham, 1997; Salas et al., 2009; Sandoval et al., 2009). It is worth mentioning that there is a substantial heterogeneity of haplogroup frequency patterns in America, even between genetically and geographically close populations (Salas et al., 2009). In the case of Mesoamerica, although haplogroup A2 shows a wide distribution, haplogroup B2, C1, and D1 seem to show discontinuities (Santos et al., 1994; Batista et al., 1995; Boles et al., 1995; Kolman et al., 1995; Kolman and Bermingham, 1997; Green et al., 2000; Salas et al., 2009; Sandoval et al., 2009). In the case of haplogroup C1, it is found at high frequencies in Mexico (Green et al., 2000; Sandoval et al., 2009) and Panamá, and at lower frequencies in Guatemala and El Salvador, whereas in Nicaragua and Costa Rica it is absent. The absence of haplogroup C1 in the dataset may reflect the Chibchan origin of some Nicaraguan lineages since other Chibchan groups lack this haplogroup as well (Santos et al., 1994; Batista et al., 1995; Kolman et al., 1995). European and African mtDNA haplogroups were also observed at low frequencies in our dataset (3.06% and 7.34%, respectively). Correspondingly, the impact of non-American populations on the mtDNA pool of Nicaragua is very low.

Despite the numerous Native American people inhabiting Nicaragua during the colonial period, historical records report that the arrival of the Spanish caused a drastic demographic decline, estimated at 90–95% of the indigenous population, and subsequently a new group developed, the Mestizos (Tous, 2003), currently the most abundant group in Nicaragua. This group originated primarily by admixture of Native American women and European men. The Nicaraguan mtDNA and Y chromosome lineages clearly show a strong unidirectional sex bias in European–Native American admixture. The mtDNA is mostly of Native American origin and Y chromosome lineages have a predominantly west Eurasian ancestry. Pairwise *F<sub>st</sub>* distances for Y-STR markers show a close relationship between Nicaragua and European populations studied, particularly with Spain. Y chromosome haplogroup R1b, which is present in a particularly high frequency in the Spanish population (Adams et al., 2008), is the most frequent in Nicaragua. The influence of the other European populations may reflect more recent migrations to the country. Y chromosome subhaplogroups E1b1a/b and J1 account together for 18.78% of the total haplogroups. Because of their distinct distributions throughout Africa, these two subhaplogroups may have been the result of Spanish soldiers with North African ancestry or West African male slaves transported to the region, since West Africa was one of the most important sources of slaves to the Americas (Rout, 1976). Further analysis using Y chromosome SNPs need to be performed to confirm and deepen into these results.

Y chromosome STR haplotypes show a substantial interpopulation differentiation both on a worldwide and continental scale (Kayser et al., 2001; Roewer et al., 2005), and their variability is partitioned by haplogroup

background (Bosch et al., 1999). Although SNPs can allow us to identify deep lineages of Y chromosomes and provide a better Y haplogroup resolution, Y-STRs can be highly informative markers for studies of recent evolutionary (or historical) events (Roewer et al., 1996; Pérez-Lezaun et al., 1997).

Admixture proportions based on autosomal STRs show a predominantly Spanish contribution (69%), followed by 20.3% African and 10.6% Amerindian to the genetic pool of Nicaraguan Mestizos. Similar proportions of Spanish ancestry have been found in Mestizo Mexicans (Cerdas-Flores et al., 2002; Simms et al., 2008), and in areas with relatively low pre-Columbian Native population density (Central Valley of Costa Rica, Medellín from Colombia, and Rio Grande do Sul from Brazil) (Wang et al., 2008). However, this is not true for Nicaragua, which was highly populated when the Spanish arrived (Tous, 2003). Admixture estimates obtained for mtDNA contrast sharply with those obtained for Y chromosome and autosomal markers, which show a similar admixture pattern. Initial asymmetric mating involving mainly immigrant male and Native American women would explain the proportions seen for mtDNA and Y chromosome, but not for autosomal STRs. Thus, subsequent asymmetry in mating primarily between Mestizo women and European male, within a background of substantial decrease of Native American population, need to be referred to explain the results.

Finally, the African ancestry proportion is also evident for autosomal markers (20.3%). The highest African ancestry based on autosomal microsatellites has been determined in Mestizos from circum-Caribbean areas and in South American regions with past large African immigrations (Zúñiga et al., 2006; Mendizabal et al., 2008; Simms et al., 2008; Wang et al., 2008). Nowadays, the important proportion of African ancestry in Nicaragua is also evident within the census (VIII Censo de Población y IV de Vivienda, 2005). Afro-indigenous groups such as Miskitos, Sumus, Garifundas, and Ramas account for ~30% of the Nicaraguan population distributed throughout the country.

#### LITERATURE CITED

- Achilli A, Perego UA, Bravi CM, Coble MD, Kong QP, Woodward SR, Salas A, Torroni A, Bandelt HJ. 2008. The phylogeny of the four pan-American MtDNA haplogroups: implications for evolutionary and disease studies. *PLoS One* 3:e1764.
- Adams SM, Bosch E, Balaesque PL, Ballereau SJ, Lee AC, Arroyo E, López-Parra AM, Aler M, Grifo MS, Brion M, Carracedo A, Lavinha J, Martínez-Jarreta B, Quintana-Murci L, Picornell A, Ramon M, Skorecki K, Behar DM, Calafell F, Jobling MA. 2008. The genetic legacy of religious diversity and intolerance: paternal lineages of Christians, Jews, and Muslims in the Iberian Peninsula. *Am J Hum Genet* 83:725–736.
- Alves C, Gusmao L, Lopez-Parra AM, Soledad Mesa M, Amorim A, Arroyo-Pardo E. 2005. STR allelic frequencies for an African population sample (Equatorial Guinea) using Amp FISTR Identifier and Powerplex 16 kits. *Forensic Sci Int* 148:239–242.
- Arredi B, Poloni ES, Paracchini S, Zerjal T, Fathallah DM, Makrelouf M, Pascali VL, Novelletto A, Tyler-Smith C. 2004. A predominantly neolithic origin for Y-chromosomal DNA variation in North Africa. *Am J Hum Genet* 75:338–345.
- Athey TW. 2005. Haplogroup prediction from Y-STR values using an allele frequency approach. *J Genet Geneal* 1:1–7.

- Athey TW. 2006. Haplogroup prediction from Y-STR values using a Bayesian-allele-frequency approach. *J Genet Geneal* 2:34–39.
- Baeta M, Nuñez C, González-Andrade F, Sosa C, Casalod Y, Bolea M, Zweynert S, Vacas O, González-Solorzano J, Geppert M, Roewer L, Martínez-Jarreta B. 2009. Mitochondrial analysis revealed high homogeneity in the Waorani population—the last nomadic group of hunter-gatherers from Ecuador. *Forensic Sci Int: Genet Supp Ser* 2:313–314.
- Ballard DJ, Phillips C, Thacker CR, Robson C, Revoir AP, Syndercombe Court D. 2005. Y chromosome STR haplotypes in three UK populations. *Forensic Sci Int* 152:289–305.
- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16:37–48.
- Barnholtz-Sloan JS, McEvoy B, Shriver MD, Rebbeck TR. 2008. Ancestry estimation and correction for population stratification in molecular epidemiologic association studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17:471–477.
- Barrot C, Sanchez C, Ortega M, Gonzalez-Martin A, Brand-Casadevall C, Gorostiza A, Huguet E, Corbella J, Gene M. 2005. Characterisation of three Amerindian populations from Hidalgo State (Mexico) by 15 STR-PCR polymorphisms. *Int J Legal Med* 119:111–115.
- Batista O, Kolman CJ, Bermingham E. 1995. Mitochondrial DNA diversity in the Kuna Amerinds of Panama. *Hum Mol Genet* 4:921–929.
- Beleza S, Alves C, Reis F, Amorim A, Carracedo A, Gusmao L. 2004. 17 STR data (AmpF/STR Identifier and Powerplex 16 System) from Cabinda (Angola). *Forensic Sci Int* 141:193–196.
- Bertorelle G, Excoffier L. 1998. Inferring admixture proportions from molecular data. *Mol Biol Evol* 15:1298–1311.
- Boles TC, Snow CC, Stover E. 1995. Forensic DNA testing on skeletal remains from mass graves: a pilot project in Guatemala. *J Forensic Sci* 40:349–355.
- Bortolini MC, Salzano FM, Thomas MG, Stuart S, Nasanen SP, Bau CH, Hutz MH, Layrisse Z, Petzl-Erler ML, Tsuneto LT, Hill K, Hurtado AM, Castro-de-Guerra D, Torres MM, Groot H, Michalski R, Nymadawa P, Bedoya G, Bradman N, Labuda D, Ruiz-Linares A. 2003. Y-chromosome evidence for differing ancient demographic histories in the Americas. *Am J Hum Genet* 73:524–539.
- Bosch E, Calafell F, Santos FR, Perez-Lezaun A, Comas D, Benchemsi N, Tyler-Smith C, Bertranpetit J. 1999. Variation in short tandem repeats is deeply structured by genetic background on the human Y chromosome. *Am J Hum Genet* 65:1623–1638.
- Brandstatter A, Zimmermann B, Wagner J, Gobel T, Rock AW, Salas A, Carracedo A, Parson W. 2008. Timing and deciphering mitochondrial DNA macro-haplogroup R0 variability in Central Europe and Middle East. *BMC Evol Biol* 8:191.
- Budowle B, Allard MW, Fisher CL, Isenberg AR, Monson KL, Stewart JE, Wilson MR, Miller KW. 2002. HVI and HVII mitochondrial DNA data in Apaches and Navajos. *Int J Legal Med* 116:212–215.
- Camacho MV, Benito C, Figueiras AM. 2007. Allelic frequencies of the 15 STR loci included in the AmpF/STR Identifier PCR amplification kit in an autochthonous sample from Spain. *Forensic Sci Int* 173:241–245.
- Capelli C, Arredi B, Baldassari L, Boschi I, Brisighelli F, Caglia A, Dobosz M, Scarnicci F, Vetrugno G, Pascali VL. 2006. A 9-loci Y chromosome haplotype in three Italian populations. *Forensic Sci Int* 159:64–70.
- Carvalho-Silva DR, Santos FR, Rocha J, Pena SD. 2001. The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. *Am J Hum Genet* 68:281–286.
- Cerda-Flores RM, Budowle B, Jin L, Barton SA, Deka R, Chakraborty R. 2002. Maximum likelihood estimates of admixture in Northeastern Mexico using 13 short tandem repeat loci. *Am J Hum Biol* 14:429–439.
- CIA World Factbook. 2007. <https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/>
- Coelho M, Sequeira F, Luiselli D, Beleza S, Rocha J. 2009. On the edge of Bantu expansions: mtDNA, Y chromosome and lactase persistence genetic variation in southwestern Angola. *BMC Evol Biol* 9:80.
- Constenla A. 2002. Acerca de la relación genealógica de las lenguas lenca y las lenguas misumalpa. First Archaeological Congress of Nicaragua. *Revista de Filología y Lingüística de la Universidad de Costa Rica* 28:189–205.
- Dupanloup I, Bertorelle G. 2001. Inferring admixture proportions from molecular data: extension to any number of parental populations. *Mol Biol Evol* 18:672–675.
- 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* 59:213–225.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 1:47–50.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479–491.
- 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* 20:1682–1691.
- Gonzalez-Andrade F, Sanchez D, Gonzalez-Solorzano J, Gascon S, Martinez-Jarreta B. 2007. Sex-specific genetic admixture of Mestizos, Amerindian Kichwas, and Afro-Ecuadorans from Ecuador. *Hum Biol* 79:51–77.
- Green LD, Derr JN, Knight A. 2000. mtDNA affinities of the peoples of North-Central Mexico. *Am J Hum Genet* 66:989–998.
- Hammer MF, Behar DM, Karafet TM, Mendez FL, Hallmark B, Erez T, Zhivotovsky LA, Rosset S, Skorecki K. 2009. Extended Y chromosome haplotypes resolve multiple and unique lineages of the Jewish priesthood. *Hum Genet* 126:707–717.
- Helms M. 1996. "Miskito". *Encyclopedia of World Cultures*. Retrieved April 06, 2010 from <http://www.encyclopedia.com/doc/1G2-3458001376.html>
- 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.
- Jobling MA, Tyler-Smith C. 2003. The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age. *Nat Rev Genet* 4:598–612.
- Karafet TM, Mendez FL, Meilerman MB, Underhill PA, Zegura SL, Hammer MF. 2008. New binary polymorphisms reshape and increase resolution of the human Y chromosomal haplogroup tree. *Genome Res* 18:830–838.
- Kayser M, Caglia A, Corach D, Fretwell N, Gehrig C, Graziosi G, Heidorn F, Herrmann S, Herzog B, Hidding M, Honda K, Jobling M, Krawczak M, Leim K, Meuser S, Meyer E, Oesterreich W, Pandya A, Parson W, Penacino G, Perez-Lezaun A, Piccinini A, Prinz M, Schmitt C, Schneider PM, Szibor B, Teifel-Greding J, Weichhold G, de Knijff P, Roewer L. 1997. Evaluation of Y-chromosomal STRs: a multicenter study. *Int J Legal Med* 110:125–133,141–149.
- Kayser M, Krawczak M, Excoffier L, Dieltjes P, Corach D, Pascali V, Gehrig C, Bernini LF, Jespersen J, Bakker E, Roewer L, de Knijff P. 2001. An extensive analysis of Y-chromosomal microsatellite haplotypes in globally dispersed human populations. *Am J Hum Genet* 68:990–1018.
- Keyser-Tracqui C, Ricaut FX, Blandin P, Ludes B. 2003. French allele frequencies and haplotypes of nine Y-specific STRs. *J Forensic Sci* 48:242–244.
- Kolman CJ, Bermingham E. 1997. Mitochondrial and nuclear DNA diversity in the Choco and Chibcha Amerinds of Panama. *Genetics* 147:1289–1302.
- Kolman CJ, Bermingham E, Cooke R, Ward RH, Arias TD, Guionneau-Sinclair F. 1995. Reduced mtDNA diversity in the Ngobe Amerinds of Panama. *Genetics* 140:275–283.
- Lee HY, Song I, Ha E, Cho SB, Yang WI, Shin KJ. 2008. mtDNAManager: a Web-based tool for the management and quality analysis of mitochondrial DNA control-region sequences. *BMC Bioinformatics* 9:483.
- Martin P, Garcia-Hirschfeld J, Garcia O, Gusmao L, Garcia P, Albarran C, Sancho M, Alonso A. 2004. A Spanish population

- study of 17 Y-chromosome STR loci. *Forensic Sci Int* 139:231–235.
- Mendizabal I, Sandoval K, Berniell-Lee G, Calafell F, Salas A, Martínez-Fuentes A, Comas D. 2008. Genetic origin, admixture, and asymmetry in maternal and paternal human lineages in Cuba. *BMC Evol Biol* 8:213.
- Mesa NR, Mondragón MC, Soto ID, Parra MV, Duque C, Ortiz-Barrientos D, García LF, Velez ID, Bravo ML, Múnera JG, Bedoya G, Bortolini MC, Ruiz-Linares A. 2000. Autosomal, mtDNA, and Y-chromosome diversity in Amerinds: pre- and post-Columbian patterns of gene flow in South America. *Am J Hum Genet* 67:1277–1286.
- Mulero JJ, Chang CW, Calandro LM, Green RL, Li Y, Johnson CL, Hennessy LK. 2006. Development and validation of the AmpFISTR Yfiler PCR amplification kit: a male specific, single amplification 17 Y-STR multiplex system. *J Forensic Sci* 51:64–75.
- Nei N. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. New York: Columbia University Press.
- Paul LM, editor. 2009. *Ethnologue: languages of the world*, 16th ed. Dallas, TX: SIL International.
- Perego UA, Achilli A, Angerhofer N, Accetturo M, Pala M, Olivieri A, Kashani BH, Ritchie KH, Scozzari R, Kong QP, Myres NM, Salas A, Semino O, Bandelt HJ, Woodward SR, Torroni A. 2009. Distinctive Paleo-Indian migration routes from Beringia marked by two rare mtDNA haplogroups. *Curr Biol* 19:1–8.
- Perez-Lezaun A, Calafell F, Seielstad M, Mateu E, Comas D, Bosch E, Bertranpetit J. 1997. Population genetics of Y-chromosome short tandem repeats in humans. *J Mol Evol* 45:265–270.
- Quintana-Murci L, Bigham A, Rouba H, Barakat A, McElreavey K, Hammer M. 2004. Y-chromosomal STR haplotypes in Berber and Arabic-speaking populations from Morocco. *Forensic Sci Int* 140:113–115.
- Rickards O, Martínez-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* 65:519–530.
- Rodrig H, Grum M, Grimmecke HD. 2007. Population study and evaluation of 20 Y-chromosome STR loci in Germans. *Int J Legal Med* 121:24–27.
- Rodríguez-Delfín 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.
- Roewer L, Croucher PJ, Willuweit S, Lu TT, Kayser M, Lessig R, de Knijff P, Jobling MA, Tyler-Smith C, Krawczak M. 2005. Signature of recent historical events in the European Y-chromosomal STR haplotype distribution. *Hum Genet* 116:279–291.
- Roewer L, Kayser M, Dieltjes P, Nagy M, Bakker E, Krawczak M, de Knijff P. 1996. Analysis of molecular variance (AMOVA) of Y-chromosome-specific microsatellites in two closely related human populations. *Hum Mol Genet* 5:1029–1033.
- Roewer L, Krawczak M, Willuweit S, Nagy M, Alves C, Amorim A, Anslinger K, Augustin C, Betz A, Bosch E, Cagliá A, Carracedo A, Corach D, Dekairelle AF, Dobosz T, Dupuy BM, Füredi S, Gehrig C, Gusmao L, Henke J, Henke L, Hidding M, Hohoff C, Hoste B, Jobling MA, Kärger HJ, de Knijff P, Lessig R, Lieberherr E, Lorente M, Martínez-Jarreta B, Nieves P, Nowak M, Parson W, Pascali VL, Penacino G, Ploski R, Rolf B, Sala A, Schmidt U, Schmitt C, Schneider PM, Szibor R, Teifel-Greding J, Kayser M. 2001. Online reference database of European Y-chromosomal short tandem repeat (STR) haplotypes. *Forensic Sci Int* 118:106–113.
- Rosa A, Ornelas C, Brehm A, Villems R. 2006. Population data on 11 Y-chromosome STRs from Guine-Bissau. *Forensic Sci Int* 157:210–217.
- Rosser ZH, Zerjal T, Hurler ME, Adojaan M, Alavantic D, Amorim A, Amos W, Armenteros M, Arroyo E, Barbujani G, Beckman G, Beckman L, Bertranpetit J, Bosch E, Bradley DG, Brede G, Cooper G, Córte-Real HB, de Knijff P, Decorte R, Dubrova YE, Evgrafov O, Gilissen A, Glisic S, Gölge M, Hill EW, Jeziorowska A, Kalaydjieva L, Kayser M, Kivisild T, Kravchenko SA, Krumina A, Kucinskas V, Lavinha J, Livshits LA, Malaspina P, Maria S, McElreavey K, Meitinger TA, Mikelsaar AV, Mitchell RJ, Nafa K, Nicholson J, Nørby S, Pandya A, Parik J, Patsalis PC, Pereira L, Peterlin B, Pielberg G, Prata MJ, Prevederé C, Roewer L, Rootsi S, Rubinsztein DC, Saillard J, Santos FR, Stefanescu G, Sykes BC, Tolun A, Villems R, Tyler-Smith C, Jobling MA. 2000. Y-chromosomal diversity in Europe is clinal and influenced primarily by geography, rather than by language. *Am J Hum Genet* 67:1526–1543.
- Rout L. 1976. *The African experience in Spanish America: 1502 to the present days*. Cambridge, England: Cambridge University Press.
- Salas A, Lovo-Gomez J, Alvarez-Iglesias V, Cerezo M, Lareu MV, Macaulay V, Richards MB, Carracedo A. 2009. Mitochondrial echoes of first settlement and genetic continuity in El Salvador. *PLoS One* 4:e6882.
- Salas A, Richards M, De la Fe T, Lareu MV, Sobrino B, Sanchez-Diz P, Macaulay V, Carracedo A. 2002. The making of the African mtDNA landscape. *Am J Hum Genet* 71:1082–1111.
- Salas A, Richards M, Lareu MV, Scozzari R, Coppa A, Torroni A, Macaulay V, Carracedo A. 2004. The African diaspora: mitochondrial DNA and the Atlantic slave trade. *Am J Hum Genet* 74:454–465.
- Sampietro ML, Caramelli D, Lao O, Calafell F, Comas D, Lari M, Agusti B, Bertranpetit J, and Lalueza-Fox C. 2005. The genetics of the pre-Roman Iberian Peninsula: a mtDNA study of ancient Iberians. *Ann Hum Genet* 69(Pt 5):535–548.
- Sánchez-Albornoz N. 1977. *La población de America Latina: desde los tiempos precolombinos al año 2000*, 2nd ed. Madrid: Alianza Editorial.
- Sandoval K, Buentello-Malo L, Penalzoza-Espinosa R, Avelino H, Salas A, Calafell F, Comas D. 2009. Linguistic and maternal genetic diversity are not correlated in Native Mexicans. *Hum Genet* 126:521–531.
- Santos M, Ward RH, Barrantes R. 1994. mtDNA variation in the Chibcha Amerindian Huetar from Costa Rica. *Hum Biol* 66:963–977.
- Séjourné L. 1972. *América Latina. Antiguas culturas precolombinas*, Vol.21. Madrid: Historia Universal Siglo XXI.
- Semino O, Magri C, Benuzzi G, Lin AA, Al-Zahery N, Battaglia V, Maccioni L, Triantaphyllidis C, Shen P, Oefner PJ, Zhivotovskiy LA, King R, Torroni A, Cavalli-Sforza LL, Underhill PA, Santachiara-Benerecetti AS. 2004. Origin, diffusion, and differentiation of Y-chromosome haplogroups E and J: inferences on the neolithization of Europe and later migratory events in the Mediterranean area. *Am J Hum Genet* 74:1023–1034.
- Semino O, Passarino G, Oefner PJ, Lin AA, Arbuzova S, Beckman LE, De Benedictis G, Francalacci P, Kouvatsi A, Limborska S, Marekikae M, Mika A, Mika B, Primorac D, Santachiara-Benerecetti AS, Cavalli-Sforza LL, Underhill PA. 2000. The genetic legacy of Paleolithic Homo sapiens sapiens in extant Europeans: a Y chromosome perspective. *Science* 290:1155–1159.
- Short Tandem Repeat DNA Internet DataBase.<http://www.cstl.nist.gov/strbase/>
- Simms TM, Garcia C, Mirabal S, McCartney Q, Herrera RJ. 2008. The genetic legacy of the Transatlantic Slave Trade in the island of New Providence. *Forensic Sci Int Genet* 2:310–317.
- Soares P, Ermini L, Thomson N, Mormina M, Rito T, Rohl A, Salas A, Oppenheimer S, Macaulay V, Richards MB. 2009. Correcting for purifying selection: an improved human mitochondrial molecular clock. *Am J Hum Genet* 84:740–759.
- Tajima F, Nei M. 1984. Estimation of evolutionary distances between nucleotide sequences. *Mol Biol Evol* 1:269–285.
- Tamm E, Kivisild T, Reidla M, Metspalu M, Smith DG, Mulligan CJ, Bravi CM, Rickards O, Martínez-Labarga C, Khusnutdinova EK, Fedorova SA, Golubenko MV, Stepanov VA, Gubina MA, Zhadanov SI, Ossipova LP, Damba L, Voevoda MI, Dipierri JE, Villems R, Malhi RS. 2007. Beringian standstill and spread of Native American founders. *PLoS One* 2:e829.

- Tous, M. 2003. De la Gran Nicoya precolombina a la Provincia de Nicaragua, siglos XV y XVI. Un estudio de la subárea arqueológico-cultural de la Gran Nicoya y de sus transformaciones derivadas de la conquista española, PhD Thesis, Universitat de Barcelona. <http://www.tdx.cesca.es/TDX-0505103-110130/>
- Underhill PA, Shen P, Lin AA, Jin L, Passarino G, Yang WH, Kauffman E, Bonn -Tamir B, Bertranpetit J, Francalacci P, Ibrahim M, Jenkins T, Kidd JR, Mehdi SQ, Seielstad MT, Wells RS, Piazza A, Davis RW, Feldman MW, Cavalli-Sforza LL, Oefner PJ. 2000. Y chromosome sequence variation and the history of human populations. *Nat Genet* 26:358-361.
- van Oven M, Kayser M. 2009. Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Hum Mutat* 30:E386-E394.
- Vigilant L, Stoneking M, Harpending H, Hawkes K, Wilson AC. 1991. African populations and the evolution of human mitochondrial DNA. *Science* 253:1503-1507.
- Wallace DC, Brown MD, Lott MT. 1999. Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. *Gene* 238:211-230.
- 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* 10:506-513.
- Wang S, Ray N, Rojas W, Parra MV, Bedoya G, Gallo C, Poletti G, Mazzotti G, Hill K, Hurtado AM, Camrena B, Nicolini H, Klitz W, Barrantes R, Molina JA, Freimer NB, Bortolini MC, Salzano FM, Petzl-Erler ML, Tsuneto LT, Dipierri JE, Alfaro EL, Bailliet G, Bianchi NO, Llop E, Rothhammer F, Excoffier L, Ruiz-Linares A. 2008. Geographic patterns of genome admixture in Latin American Mestizos. *PLoS Genet* 4:e1000037.
- Ward RH, Frazier BL, Dew-Jager K, Paabo S. 1991. Extensive mitochondrial diversity within a single Amerindian tribe. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:8720-8724.
- Ward RH, Redd A, Valencia D, Frazier B, Paabo S. 1993. Genetic and linguistic differentiation in the Americas. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:10663-10667.
- Zegura SL, Karafet TM, Zhivotovsky LA, Hammer MF. 2004. High-resolution SNPs and microsatellite haplotypes point to a single, recent entry of Native American Y chromosomes into the Americas. *Mol Biol Evol* 21:164-175.
- Zuniga J, Ilzarbe M, Acunha-Alonzo V, Rosetti F, Herbert Z, Romero V, Almeciga I, Clavijo O, Stern JN, Granados J, Fridkis-Hareli M, Morrison P, Azocar J, Yunis EJ. 2006. Allele frequencies for 15 autosomal STR loci and admixture estimates in Puerto Rican Americans. *Forensic Sci Int* 164:266-270.
- VIII Censo de Población y IV de Vivienda. Cifras oficiales del censo 2005. <http://www.inide.gob.ni>