

## ARTÍCULO ORIGINAL

# Estudios sobre ADN mitocondrial sugieren un linaje predominante en la cordillera Oriental de Colombia y un vínculo suramericano para los arcaicos de Puerto Rico

MARCELA DÍAZ-MATALLANA<sup>1</sup>, JUAN C. MARTÍNEZ-CRUZADO<sup>2</sup>

## Resumen

**Objetivo:** Este trabajo integra información de la secuencia del ADNmt del norte de Suramérica con Puerto Rico, con el fin de comprender el poblamiento del Caribe, especialmente de los taínos. De paso, arroja información sobre hechos demográficos en la Colombia precolombina.

**Metodología:** Se obtuvieron 59 muestras de Colombia y Venezuela, las cuales fueron analizadas junto a otras dos pertenecientes a los indios warao y disponibles en el *Genbank*. Se alinearon secuencias HVR-I y II (*Hypervariable Region*) y se compararon con el rCRS. El 93,4% de las muestras resultaron ser de origen amerindio.

**Resultados:** Un venezolano exhibió mutaciones relacionadas con el linaje antiguo C-II de Puerto Rico, el cual se estima que arribó a Puerto Rico en la era prearahuaca. Mediante secuenciación completa del ADNmt se demostró que esta muestra, VE6, pertenece al clado americano nativo C1b.

Dos personas de Colombia y Venezuela presentaban la transición 16129 que define el linaje A-VIII de Puerto Rico. Dicha transición dentro del haplogrupo A también se ha encontrado en los ciboneyes de Cuba y en otras tribus americanas. La delección de un par de bases -498d- define el linaje B-I de Colombia (Bogotá y Villa de Leyva, Boyacá), un polimorfismo encontrado en los departamentos correspondientes a la cordillera Oriental y que se extiende al Valle del Cauca y a Panamá.

---

1 Bióloga, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C.; M.Sc. Departamento de Biología, Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez, Mayagüez, Puerto Rico.

2 Biólogo, Ph.D.; profesor titular, Departamento de Biología, Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez, Mayagüez, Puerto Rico.

Recibido: 26-11-2009

Revisado: 13-01-2010

Aceptado: 06-04-2010

**Conclusión:** Este linaje experimentó una expansión demográfica en la cordillera Oriental que lo llevó a expandirse geográficamente hasta Panamá. Sería recomendable ampliar el muestreo de la costa norte de Colombia y Venezuela, para encontrar más conexiones precolombinas con Puerto Rico. Además, sería conveniente verificar la distribución geográfica de 498d con un muestreo más numeroso y que cubra una zona más amplia de Colombia.

**Palabras clave:** ADN mitocondrial, amerindios, Puerto Rico.

## Title

Mitochondrial DNA studies suggest a predominant lineage in the Eastern Cordillera of Colombia and a South American link for the archaics of Puerto Rico

## Abstract

**Objetivo:** This work integrates sequencing information of mtDNA from Northern South America with Puerto Rico, to reach an understanding of the peopling of the Caribbean, especially the Tainos. At the same time, it sheds light on demographic events in the Pre-Columbian Colombia.

**Methodology:** Fifty nine samples from Colombia and Venezuela were obtained, and then analyzed along with two others from Warao Indians available in Genbank. HVR (*Hypervariable Region*) I and II sequences were aligned and compared to the rCRS. Fully 93,4% of the mtDNA samples were shown to be of Amerindian origin.

**Results:** A Venezuelan exhibited ancient mutations related to lineage C-II of Puerto Rico, which has been estimated to have arrived to this island in pre-Arawak times. Through complete mtDNA sequencing, it was shown that this sample, VE6, belongs to the Native American C1b clade.

Two individuals from Colombia and Venezuela showed the 16129 transition that defines lineage A-VIII of Puerto Rico. This transition has also

been found in the Cuban Ciboneys and in various American tribes. A one base pair deletion –498d– defines lineage B-I from Colombia (Bogotá and “Villa de Leyva”, Boyacá), a polymorphism found in the departments belonging to the Eastern cordillera and extending to the Cauca Valley and Panamá.

**Conclusions:** This lineage went through a demographic expansion in the Eastern Cordillera that may have triggered its geographic expansion to Panamá. It would be recommendable to expand the sampling of the Northern Coast of Colombia and Venezuela to find more pre-Columbian connections with Puerto Rico. Furthermore, it would be convenient to verify the geographic distribution of 498d with a bigger sample covering a wider region of Colombia.

**Key words:** mitochondrial DNA, Amerindians, Puerto Rico.

## Introducción

Los genes mitocondriales son altamente polimorfos y la variación existente es de gran interés para los científicos enfocados en la identificación de mutaciones causantes de disfunciones mitocondriales, así como también en la genética de poblaciones humanas[1-5]. El uso de la secuenciación directa de la región no codificadora del ADNmt junto con análisis de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*), permiten análisis complejos de polimorfismos del ADNmt en poblaciones humanas.

Este enfoque ha sido valioso para obtener representaciones genético-moleculares de las poblaciones del mundo, y también para el entendi-

miento de la historia evolutiva humana y las migraciones del pasado[6-9]. La caracterización de los haplogrupos específicos del ADNmt de cada continente determinó que cada uno fue originado por mutaciones particulares. La mayor parte del ADNmt de las poblaciones nativas de América corresponden básicamente a cinco haplogrupos diferentes, los cuales se han designado como A-D y X[10, 11].

A pesar de la reducción bien conocida del tamaño de la población que empezó con la llegada de los europeos a las Américas en 1492, Colombia es hoy uno de los países más ricos en diversidad cultural. Con 45'644,023 habitantes, su área geográfica total comprende 1'138.914 km<sup>2</sup>[12]. En este país viven 85 grupos étnicos[13], y 500.000 nativos hablan 80 lenguas[14].

Las dos poblaciones y culturas precolombinas chibchas más grandes fueron de Colombia. Éstas incluyeron, primero, la tairona (Sierra Nevada de Santa Marta, en el noreste), con un tamaño de población máximo de 468.000 habitantes al momento del contacto español[15]. Se cree que las poblaciones indígenas existentes en la región, kogui, arsario e ijka, son los descendientes directos de los tairona[13, 16]. La segunda cultura precolombina fue la muisca (altiplano cundiboyacense, en las tierras altas de los departamentos de Cundinamarca y Boyacá), la cual fue

una nación de la cultura chibcha que constituyó la confederación muisca encontrada por los españoles en 1537, cuyo tamaño estimado fue de 650.000 habitantes. La tairona y la muisca son referidas ahora como poblaciones chibchas extintas[16].

La población venezolana existente es el resultado de la mezcla entre amerindios, europeos (mayormente españoles) y africanos durante cinco siglos. Los españoles fueron continuamente a Venezuela desde la Conquista y, durante el último siglo, otros europeos, principalmente italianos y portugueses, han contribuido también al patrimonio genético venezolano. La migración africana, principalmente de la región subsahariana, estuvo limitada a los siglos XVI a XIX, un período activo de comercio con esclavos[17]. La República Bolivariana de Venezuela está compuesta por 26'814,843 habitantes; su área geográfica total consta de 912.050 km<sup>2</sup>[12], con 40 lenguas habladas por cerca de 145.230 nativos[14].

Se estima que entre 60.000 y 600.000 indios taínos hablantes de una lengua arahuaca vivieron en Puerto Rico, cuando fue descubierto por Cristóbal Colón en 1493[18]. Los registros históricos tradicionales informan que fueron diezmados por la guerra, el hambre, las enfermedades y la emigración y, como consecuencia, desaparecieron por completo a fi-

nales del siglo XVI[19-24]. Puerto Rico comprende un área geográfica total de 13.790 km<sup>2</sup>, con 3'971.020 habitantes[12]. Como resultado, es una población mezclada y su origen materno es amerindio (61,3%), africano (27,2%) y euroasiático occidental (11,5%)[22].

El objetivo de este trabajo fue realizar una caracterización parcial del ADN mitocondrial de la población de Colombia y Venezuela, y su comparación con la contraparte puertorriqueña, en búsqueda del origen continental de las primeras poblaciones del Caribe y sus movimientos migratorios.

Éste es el primer informe publicado que integra información de secuencia del ADNmt (regiones hipervariables I y II, HVR-I y II) del norte de Suramérica, Colombia y Venezuela, con Puerto Rico. Hasta ahora, solamente se han realizado estudios aislados de ADNmt en cada uno de estos países.

## Materiales y métodos

**Recolección de muestras.** Se examinaron las muestras de enjuague bucal antiséptico de 59 voluntarios colombianos y venezolanos, aparentemente sanos y sin relación de parentesco. Aproximadamente, se obtuvieron 10 ml de la muestra de cada individuo.

En primer lugar, se recolectaron ocho muestras en cuatro estados de

Venezuela: 3 en Caracas; 1 en Mérida, Mérida; 1 en Acarigua, Portuguesa; 2 en Maracaibo, Zulia; y 1 en Santa Cruz del Zulia, Zulia. Se añadieron dos secuencias de ADN mitocondrial de los indios warao, disponibles en *GenBank* (adhesiones AF347012 y AF347013), para efectos del análisis para el total de 61 muestras.

En segundo lugar, se obtuvieron 51 muestras de cuatro departamentos de Colombia: 12 en Santa Marta, Magdalena; 2 en Barranquilla, Atlántico; 25 en Bogotá, Cundinamarca, y 12 en Villa de Leyva, Boyacá.

Se tomaron muestras adicionales: 1 en Atlántida, Honduras, y 1 en Nagarote, Nicaragua. Todos los participantes proporcionaron su consentimiento informado, adecuado para esta investigación. Se llevó a cabo una entrevista genealógica donde se registraron los lugares de nacimiento de los ancestros más lejanos hasta los bisabuelos, para confirmar la ascendencia de los participantes en el estudio y excluir a las personas estrechamente relacionadas[25].

En referencia a Puerto Rico, se emplearon los datos de los RFLP del ADNmt[22], provenientes de 800 individuos seleccionados al azar y sistemáticamente para ser representativos de la isla de Puerto Rico, una población del Caribe muy mezclada con tres componentes principales:

amerindio (n=489), africano subsahariano (n=220) y euroasiático occidental (n=91). Estos datos posibilitaron la comparación de las frecuencias de los haplogrupos amerindios entre las poblaciones de Colombia y Venezuela del presente estudio. Asimismo, se consideraron las secuencias de las HVR-I y HVR-II, obtenidas de 122 individuos de Puerto Rico[26, 27], las cuales permitieron contrastar la presencia o ausencia de las mutaciones nucleotídicas con las poblaciones de Colombia y Venezuela del presente estudio.

**Extracción de ADN genómico.** El precipitado formado del enjuague bucal luego de centrifugación a 7.000 rpm por 10 minutos, fue resuspendido en resina quelante Chelex al 10% (Sigma Chemical Co.®) y transferido a un tubo marcado de microcentrífuga de 1,5 ml. Entonces, las muestras fueron colocadas a 56°C hasta el día siguiente, batidas, hervidas por 8 minutos, batidas nuevamente y centrifugadas a 14.000 rpm por 3 mi-

nutos para liberar el ADN. Las extracciones genómicas se mantuvieron a -20°C.

**Amplificación por PCR.** Las regiones mitocondriales hipervariables I y II, HVR-I y II, fueron amplificadas por separado (tabla 1). Si al secuenciar la HVR-I se determinaba que había ascendencia indígena, entonces la HVR-II era amplificada y secuenciada. Las amplificaciones de ADN se hicieron en un termociclador Eppendorf® (Mastercycler), en reacciones de 25 µl que contenían: 1,5 U de *Taq* ADN polimerasa (New England Biolabs®); solución tampón 1X (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8,3 a 25°C) (New England Biolabs®); 0,4 mM dNTP; 1 µM cada iniciador; 0,4 mg/ml BSA; y 2 µl de ADN molde.

Los ciclos de temperatura fueron programados como sigue: un paso de desnaturalización inicial a 94°C por 30 segundos, 34 ciclos de 94°C por 30 segundos, 51°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto y 10 segundos; exten-

**Tabla 1. Secuencias de iniciadores para amplificar HVR-I y HVR-II**

<b>HVR-I</b>	
<b>Iniciador</b>	<b>Secuencia 5' – 3'</b>
L15766	ATTCTAACCTGAATCGGAGG
L15829	CATCCGTA CTATACTTCACAAC
H34	ACCAAATGCATGGAGAGCTCC
<b>HVR-II</b>	
L16491	GGGGTAGCTAAAGTGAAGT
H501	GTGTGTGCTGGGTAGGATG

sión final a 72°C por 5 minutos. Los productos de amplificación se verificaron en geles de agarosa al 1%, incluyendo marcador de peso molecular  $\phi$ X174 ADN- digerido con *HaeIII* (1.000  $\mu$ g/ml) en cada corrida.

Los productos de PCR fueron visualizados bajo luz ultravioleta luego de la tinción con bromuro de etidio. La secuencia codificadora completa del ADNmt del individuo VE6 (Caracas, Venezuela), se obtuvo mediante la amplificación de 23 fragmentos[25, 28]. Los amplicones se purificaron utilizando el kit de purificación de productos de PCR de alta pureza (Roche Diagnostics Corp. ®).

#### **Reacción de secuenciación cíclica.**

Se realizó en un termociclador Applied Biosystems® (Gene Amp® PCR System 9700). Cada reacción de 5  $\mu$ l contenía 16 ng del amplicón, 0,5  $\mu$ l de reactivos *Big Dye* (Big Dye Terminator v. 3.1, Applied Biosystems®), solución tampón 1X (0,5  $\mu$ l) y el iniciador a 0,16  $\mu$ M (tabla 2). Los

ciclos de temperatura se programaron como sigue: una desnaturalización inicial a 96°C por 1 minuto, 34 ciclos de 96°C por 15 segundos, 50°C por 15 segundos, 60°C por 4 minutos; y un paso final a 4°C por tiempo indefinido. El exceso de terminadores de cadena dideoxi fue removido de las reacciones de secuenciación cíclica mediante precipitación por etanol.

**Secuenciación automática.** Se hizo con un analizador genético Applied Biosystems® (ABI, modelo 3130).

**Análisis de datos.** Las secuencias resultantes HVR-I y II se alinearon y compararon según la secuencia de referencia revisada de Cambridge – rCRS–[29, 30] mediante los programas Omega 2,0 (Oxford Molecular Ltd. ©) y Chromas 1,62 (Technelysium Pty Ltd. ®). La determinación de los haplogrupos mitocondriales americanos nativos se basó en las mutaciones de las regiones hipervariables I y II (tabla 3). Las secuencias HVR-I + II se emplearon para la construcción de re-

**Tabla 2. Iniciadores para secuenciar HVR-I y HVR-II**

<b>HVR-I</b>	
<b>Iniciador</b>	<b>Secuencia 5' – 3'</b>
L15854	CCTAATCCTAATACTACTATC
H16526	GGGAACGTGTGGGCTATTTAGG
H16401	TTGATTTACCGAGGATGGT
H16345	GGGACGAGAAGGGATTTGAC
<b>HVR-II</b>	
L16504	GTGACCTGTATCCGACATCTGG

des medianas con el programa Network 4.5.1.0[31]. Las redes medianas correspondientes a cada uno de los haplogrupos amerindios se construyeron mediante el método *median-joining*[32], para observar la relación genética entre los haplotipos de cada haplogrupo[25]. Al construirlas, se le otorgó un mayor peso a las posiciones más estables[25, 33], evitando así la formación de reticulocitos en las redes de los haplogrupos A y C. Las redes medianas obtenidas en este estudio se compararon con las redes medianas de Puerto Rico[26,27].

Las medidas de diversidad genética y las pruebas estadísticas de la neutralidad se hicieron mediante el programa MEGA4[34, 35]. Las distancias medias se calcularon utilizando el modelo de sustitución de nucleótidos: composición de máxima verosimilitud (*maximum composite likelihood*)[35]. La prueba de neutralidad de Tajima [35, 36] fue aplicada a cada uno de los haplogrupos amerindios (A-D). En el análisis de las distancias genéticas, la diversidad de secuencias y la prueba de neutralidad de Tajima para

subpoblaciones, la metapoblación se definió como el norte de Suramérica, mientras que las subpoblaciones fueron tres y correspondieron a la costa de Colombia, al centro de Colombia y a Venezuela.

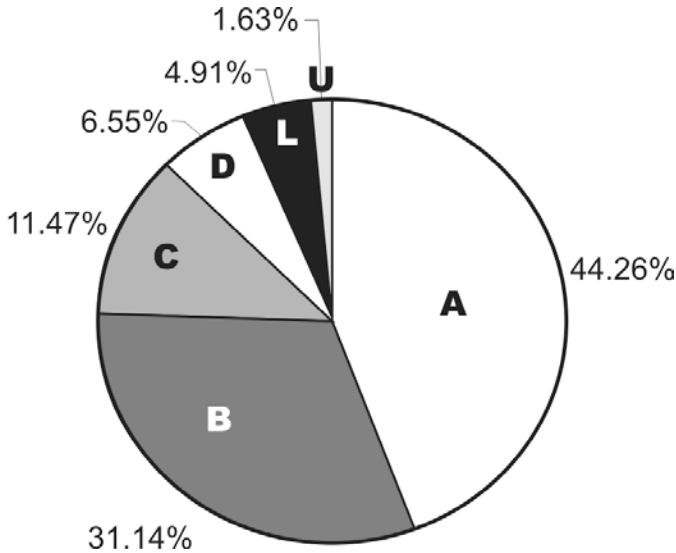
## Resultados

### *Secuenciación de HVR-I y HVR-II*

*Norte de Suramérica.* Con base en las mutaciones diagnósticas de rCRS [29,30], las secuencias de ADNmt HVR-I y HVR-II de 61 participantes del norte de Suramérica, Colombia y Venezuela (tabla 3), correspondieron a los haplogrupos A (n=27), B (n=19), C (n=7), D (n=4), L (n=3), y U (n=1) (figura 1). En la medida en que los cuatro primeros haplogrupos son todos amerindios, el 93,4% del ADNmt de las muestras del norte de Suramérica fueron de origen amerindio. Además, las secuencias del ADNmt HVR-I y HVR-II de Honduras y Nicaragua pertenecieron al haplogrupo A (n=2). El haplogrupo X, un haplogrupo amerindio limitado a América del Norte[10], no se detectó en estas muestras.

**Tabla 3. Mutaciones diagnósticas para determinación haplogrupos americanos nativos del ADNmt**

Haplogrupo	HVR-1					HVR-II
A	16111	16223	16290	16319	16362	146235
B	16189	16217				
C	16223	16298	16325	16327		(249d) (290d) (291d)
D	16223	16325	163962			



**Figura 1.** Distribución general de haplogrupos del ADNmt del Norte de Suramérica, Colombia y Venezuela.

*Colombia.* Las secuencias de ADNmt HVR-I de 51 participantes de Colombia pertenecían a los haplogrupos A (n=21), B (n=19), C (n=3), D (n=4), L (n=3) y U (n=1) (figuras 2 y 3). Cuando se calcularon todas las frecuencias de haplogrupos amerindios, hubo una alta proporción de A (41,17%) y B (37,25%), pero una baja frecuencia de D (7,84%) y C (5,88%). La distribución de los haplogrupos ADNmt en tres regiones de Colombia se presenta en la tabla 4.

En resumen, las tres regiones mostraron altas frecuencias del haplogrupo A. De hecho, el haplogrupo A fue el más frecuente en todas las localida-

des, excepto en Bogotá, Cundinamarca, donde la frecuencia del haplogrupo B fue mayor. En Villa de Leyva, el haplogrupo C estuvo ausente; sin embargo, allí se reportó la presencia del haplogrupo U. El haplogrupo L estuvo presente solamente en Santa Marta y Bogotá.

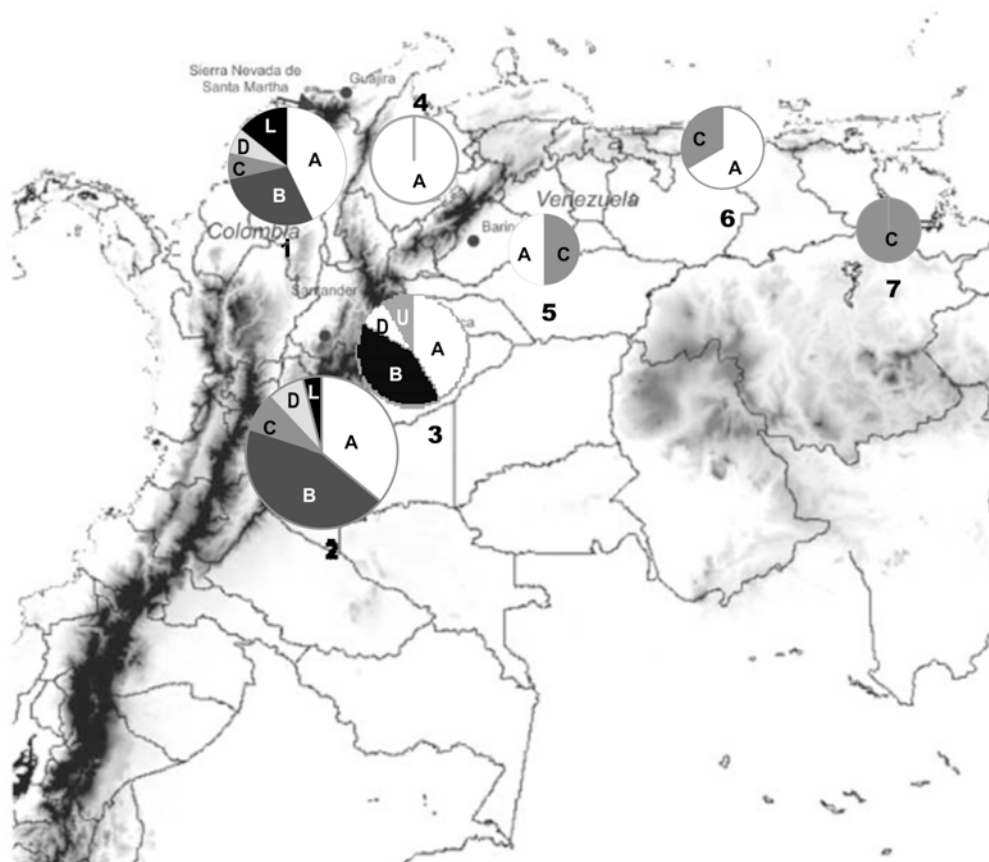
La figura 3 compara estos resultados con los obtenidos por Keyeux *et al.*[37] en tribus indígenas de diversas partes del país, demostrándose en este estudio una importante reducción en la frecuencia del haplogrupo C.

La figura 4 compara la frecuencia de haplogrupos en Bogotá con los in-

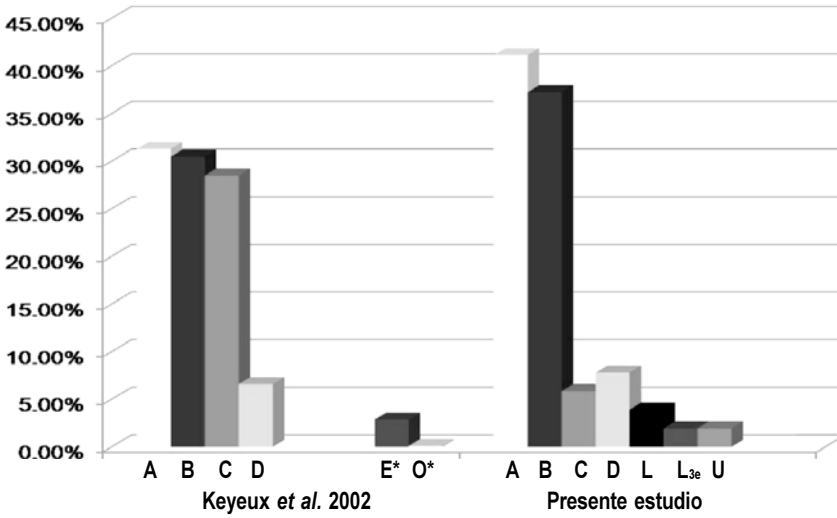


**Tabla 4. Distribución de haplogrupos del ADNmt de tres regiones de Colombia**

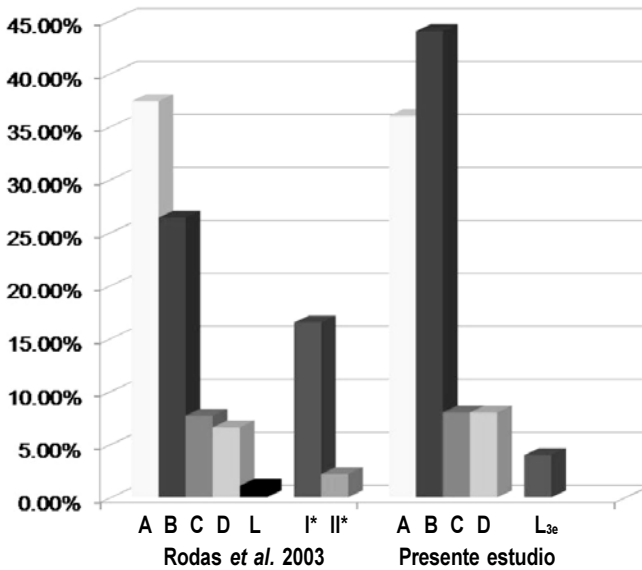
%	A	B	C	D	L	U
<b>Región Atlántica</b>	50	21.42	7.14	7.14	14.28	—
<b>Región Andina</b>						
Bogotá, D.C.	36	44	8	8	4	—
Villa de Leyva	41.66	41.66	—	8.33	—	8.33



**Figura 2.** Distribución detallada de haplogrupos del ADNmt del Norte de Suramérica, Colombia y Venezuela. La cordillera de los Andes está ilustrada como gris-negro, sistema montañoso de tres ramificaciones con su prolongación en Venezuela (cordillera de Mérida). Ubicación en el mapa: **1)** Santa Marta y Barranquilla (n=14); **2)** Bogotá, D. C., Cundinamarca (n=25); y **3)** Villa de Leyva, Boyacá (n=12); **4)** Maracaibo y Santa Cruz del Zulia, Zulia (n=3); **5)** Mérida y Acarigua (n=2); **6)** Caracas, D. F. (n=3); y **7)** Orinoco Delta (n=2) (Indios Warao).



**Figura 3. Comparación de frecuencias de haplogrupos del ADNmt en Colombia.** A la izquierda, resultados de Keyeux *et al.*[37], a la derecha resultados del presente estudio. E\*: No amerindio, O\*: Una muestra indígena de haplogrupo no identificado (Embera, Cauca).



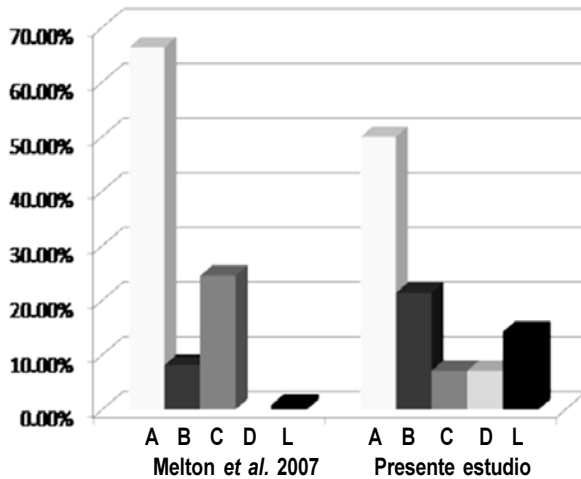
**Figura 4. Comparación de frecuencias de haplogrupos del ADNmt en Bogotá, D.C.** A la izquierda, resultados de Rodas *et al.*[38], a la derecha los resultados del presente estudio. I\* y II\*: Se refiere a “Otros” (no amerindio, no africano). I\*(H, T, U, V, W; L3d): 10394D deI-/10397AluI-/3952HpaI-; II\* [L3 (L3a, L3b, L3c), J, K]: 10394D deI-/10397AluI-/3952HpaI-.

formados por Rodas *et al.*[38] para la misma ciudad, demostrándose en este estudio una mayor frecuencia del haplogrupo *B*.

La figura 5 compara la frecuencia de haplogrupos en la costa norte de Colombia con los chibchas de la misma región que fueron estudiados por Melton *et al.*[15], demostrándose en nuestro estudio un mayor mestizaje y una mayor frecuencia de los haplogrupos *B* y *D* en relación con los haplogrupos *A* y *C* que predominaron en los chibchas.

*Venezuela.* Las secuencias de ADNmt HVR-I y HVR-II de 10 participantes de cuatro estados de Venezuela, pertenecían solamente a los haplogrupos *A* (n=6) y *C* (n=4) (figuras 2 y 6). Entonces, las 10 muestras

procedentes de Venezuela demostraron origen amerindio. Los haplogrupos *B* y *D* estuvieron presentes en las muestras de Colombia, pero ausentes en las muestras de Venezuela. La cordillera de Mérida aparenta tener una influencia en la distribución geográfica de los haplogrupos en Venezuela, puesto que detectamos principalmente al haplogrupo *A* en el noroeste de Venezuela y al haplogrupo *C* en el noreste (figura 2). Además, el ADNmt de un individuo de Caracas (VE6), perteneciente al haplogrupo *C*, evidenció mutaciones (16086, 16183C, y 16278) que lo relacionan con un linaje de Puerto Rico, el cual se cree que llegó a las Antillas Mayores en la época prearahuaca[26, 27]. Por lo tanto, el genoma mitocondrial (VE6) fue amplificado y secuenciado completamente.



**Figura 5. Comparación de frecuencias de haplogrupos del ADNmt en la costa del Caribe de Colombia.** A la izquierda, resultados de Melton *et al.*[15], a la derecha los resultados del presente estudio.

**Redes medianas**

*Haplogrupo A.* La red mediana para el haplogrupo A se ensambló con 29 secuencias de la región control del ADNmt provenientes de Colombia, Venezuela y América Central (tabla 5, figura 7), y exhibió 24 haplotipos. Tres ancestros hipotéticos fueron inferidos. Siete linajes se identificaron en esta red mediana. El haplotipo compuesto por las muestras S7, VE2 y VE8 es considerado como fundador del Nuevo Mundo y se encuentra en el centro de la red. El haplotipo constituido por B10 y VE5 podría indicar una expansión demográfica que dio origen al li-

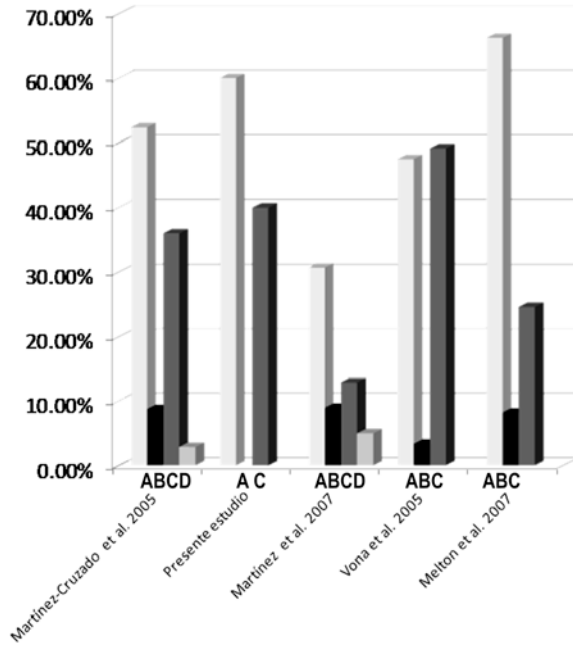
naje A-II. El haplotipo B16 es el más distante del resto de los haplotipos A, porque posee un alto número de polimorfismos particulares.

*Haplogrupo B.* La red mediana para el haplogrupo B fue construida con 17 secuencias HVR-I + II de Colombia (tabla 6, figura 8) y exhibió 9 haplotipos. Se identificaron dos linajes en esta red mediana y no hubo presencia de reticulaciones o ancestros hipotéticos. El nodo o haplotipo compuesto por B7, B15, B19, B23, S10 y S13, podría representar una expansión demográfica. La delección de un par de bases -498d- define el linaje I. Once de las

**Tabla 5. Mutaciones de Secuencia de HVR-I + II usadas para construir red mediana del haplogrupo A**

Sample	15924	16092	16111	16126	16129	16145	16187	16203	16209	16213	16223	16241	16245	16266	16274	16286	16290	16293	16301	16304	16311	16319	16325	16342	16356	16360	16362	16468	64	73	80	103	106-111D	146	150	151	152	153	154	162	185	189	198	204	207	214	226	234	235	263
rCRS <sup>a</sup>	A	T	C	T	G	G	C	A	T	G	C	A	C	C	G	C	C	A	C	T	T	G	T	T	T	C	T	T	C	A	T	G	G	T	C	C	T	A	T	C	G	A	C	T	G	A	A	A		
BAR1	.	C	T	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	A	.	.	.	.	.	C	.	T	G	.	.	.	C	.	.	G	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	G	G	
BAR2S11	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	T	.	.	A	.	.	C	.	C	.	C	.	T	G	.	.	.	C	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	G		
S9	.	.	C	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	T	.	.	C	A	.	.	.	.	.	C	.	T	G	.	.	.	C	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	G		
S7/VEZ/VE8	.	.	T	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	T	.	.	A	.	.	.	.	.	.	C	.	T	G	.	.	.	C	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	G	
B14	.	T	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	T	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	C	.	T	G	.	.	.	C	.	T	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	G	G		
B10/VE5	.	T	.	.	.	.	A	T	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	C	.	T	G	.	.	.	C	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	G	
NI	.	T	.	.	T	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	T	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	C	.	T	G	.	.	.	C	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	G	
HI	.	T	.	.	.	C	T	.	.	T	.	.	.	.	.	T	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	C	.	T	G	.	.	.	C	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	G	
VL4	.	T	.	A	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	T	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	C	.	T	G	.	.	.	C	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	G	G	
S2	.	T	A	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	T	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	C	.	T	G	.	.	.	C	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	G	
B22	.	T	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	T	.	.	A	C	.	.	.	.	.	.	C	.	T	G	.	.	.	C	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	G	
B59	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	T	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	C	.	T	G	.	.	.	C	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	G	
B13	.	T	.	.	.	.	A	T	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	C	.	T	G	.	.	.	C	.	.	G	.	.	C	G	.	.	.	.	G	.	G	G	
S3	.	T	C	.	.	.	C	T	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	C	.	T	G	.	.	.	C	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	G	
S12	.	T	.	.	.	.	.	T	.	T	.	.	.	.	.	T	.	.	A	.	.	C	.	.	.	.	C	.	T	G	.	.	.	C	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	G	
VL9	.	T	.	.	.	.	A	T	.	.	.	.	.	.	.	A	T	.	.	A	.	.	.	.	.	.	C	.	T	G	.	.	.	C	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	G		
VL11	.	T	.	.	.	.	A	T	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	C	.	T	G	.	.	.	C	.	.	G	.	.	C	T	.	.	.	.	.	G	G		
B18	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	A	T	.	.	.	C	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	T	G	.	.	.	C	.	.	G	.	.	.	.	.	.	C	.	G	G			
VL3	.	T	.	.	.	.	.	.	.	T	G	.	C	A	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	C	.	T	G	.	.	.	C	.	.	G	.	.	G	.	A	.	.	.	.	G	G		
VE1	.	T	A	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	C	.	G	.	.	.	C	.	.	G	.	.	C	G	.	.	.	.	.	.	G	G		
VE4	G	.	T	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	C	A	.	.	.	.	.	C	.	T	G	.	A	.	C	A	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	G		
VE3	.	T	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	T	C	.	.	C	.	C	.	.	G	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	G	G		
VL1	.	T	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	C	.	T	G	.	.	.	C	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	G	
B16	.	.	.	.	T	G	.	T	G	T	.	.	.	.	.	T	.	.	A	C	.	.	.	.	.	.	C	C	.	G	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	

<sup>a</sup> Secuencia de Referencia Revisada Cambridge [29, 30].

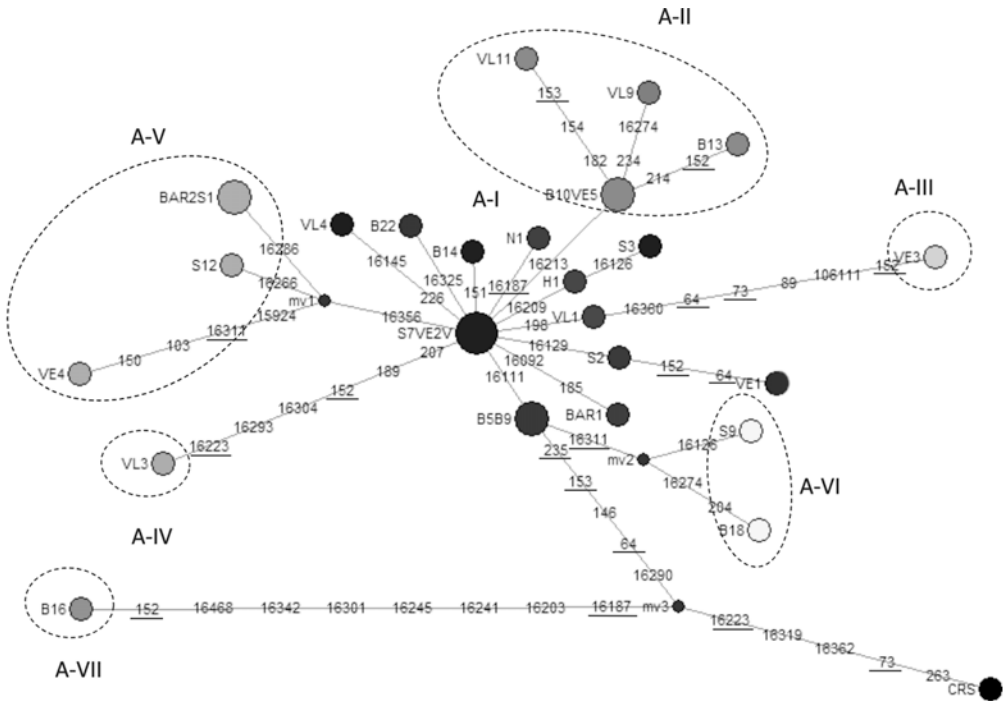


**Figura 6. Frecuencias de haplogrupos del ADNmt en Puerto Rico, Venezuela y Costa Norte de Colombia.** Esta gráfica muestra la predominancia de haplogrupos A y C de acuerdo a cinco estudios diferentes. De izquierda a derecha, los trabajos realizados en **Puerto Rico**[22], **Venezuela** [Presente estudio, 17, 53], y **Costa Norte de Colombia**[15].

**Tabla 6. Mutaciones de Secuencia para HVR-I + II usadas para construir red mediana del haplogrupo B**

Muestra	G <sup>16129</sup>	T <sup>16189</sup>	T <sup>16217</sup>	G <sup>16319</sup>	T <sup>16324</sup>	T <sup>16468</sup>	A <sup>73</sup>	T <sup>146</sup>	T <sup>152</sup>	A <sup>210</sup>	A <sup>263</sup>	C <sup>498D</sup>	A <sup>499</sup>
rCRS <sup>a</sup>	G	T	T	G	T	T	A	T	T	A	A	C	A
B1 VL5 VL8 S8	.	C	C	.	C	.	G	.	.	.	G	-	G
B3	.	C	C	.	.	C	G	.	.	.	G	C	G
B7 B15 B19 B23 S10 S13	.	C	C	.	.	.	G	.	.	.	G	-	G
B8	A	C	C	.	.	.	G	.	.	.	G	C	G
B12	.	C	C	.	.	.	G	C	.	.	G	-	G
B21	.	C	C	.	.	.	G	.	C	.	G	-	G
S5	.	C	C	A	.	.	G	.	.	.	G	C	G
VL2	.	C	C	.	.	.	G	.	.	G	G	-	G
VL13	.	C	C	.	.	.	G	.	.	.	G	C	G

<sup>a</sup> Secuencia de Referencia Revisada Cambridge[29, 30].

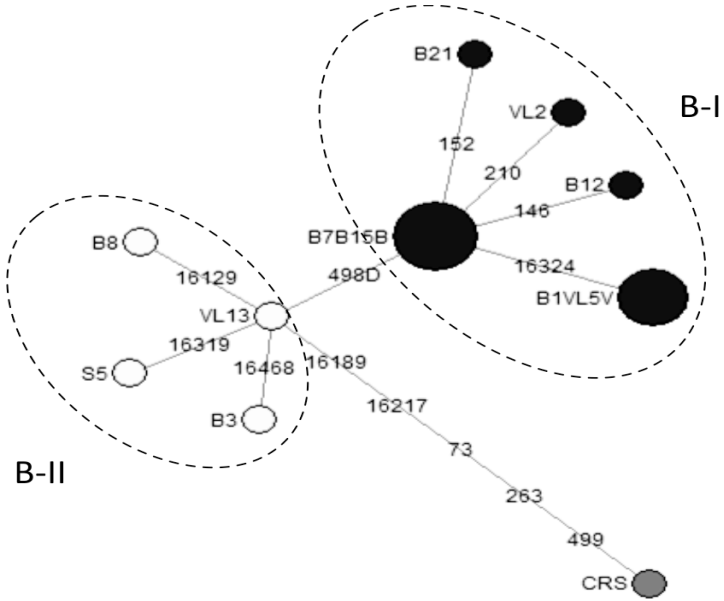


**Figura 7.** Red Mediana de HVR-I + II del haplogrupo A (15924-16468 + 64-263). El tamaño de cada círculo es proporcional a la frecuencia del haplotipo que representa. Mv1, mv2 y mv3 representan ancestros hipotéticos. Los siete linajes (AI-AVII) son indicados con óvalos o círculos demarcados por líneas entrecortadas excepto A-I, cuyos haplotipos se presentan en negro. CRS = Secuencia de Referencia Revisada Cambridge[29, 30]. Algunas mutaciones están subrayadas, indicando que se repiten.

13 muestras que pertenecen al linaje *B-I* (498d) fueron recolectadas en la región central de Colombia (Bogotá y Villa de Leyva), pero, con respecto a los datos del ancestro más lejano en los respectivos consentimientos informados, los lugares corresponden a los departamentos de Cundinamarca (2), Boyacá (5), Valle del Cauca (2), Santander (2), Tolima (1) y La Guajira (1)[25]. En consecuencia, 498d puede ser un polimorfismo “extendido” a los principales departamentos que per-

tencen a la cordillera Oriental de la Región Andina de Colombia.

*Haplogrupo C.* La red mediana para el haplogrupo *C* fue construida con 7 secuencias HVR-I + II de Colombia y Venezuela (tabla 7, figura 9), y exhibió 7 haplotipos. Además, se infieren dos haplotipos hipotéticos ancestrales. Se identificaron tres linajes en esta red mediana. La mutación 493, presente en los haplotipos VE6 y VE7, define una gran familia ameri-



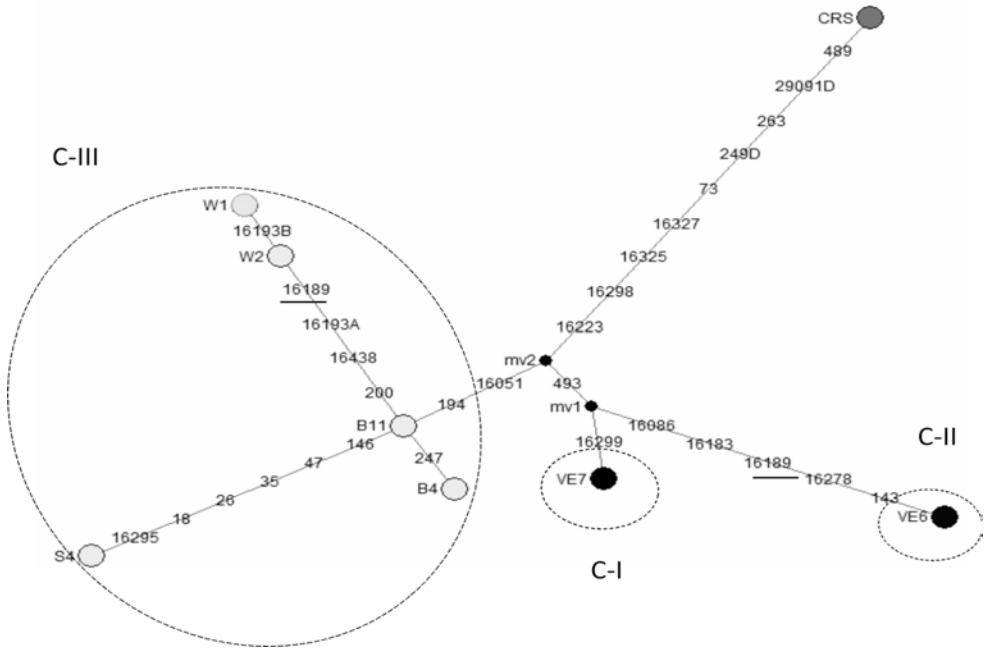
**Figura 8.** Red Mediana de HVR-I + II del haplogrupo B (16129-16468 + 73-499). El tamaño de cada círculo es proporcional a la frecuencia del haplotipo que representa. Los dos Linajes, B-I y B-II, son indicados con óvalos demarcados por líneas entrecortadas. CRS = Secuencia de Referencia Revisada Cambridge[29, 30].

**Tabla 7. Mutaciones de Secuencia de HVR-I + II usadas para construir red mediana del haplogrupo C**

Sample	16051	16086	16183	16189	16193 <sup>A</sup>	16193 <sup>B</sup>	16223	16278	16295	16298	16299	16325	16327	16438	18	26	35	47	73	143	146	194	200	247	249D	263	290-291D	489	493
rCRS <sup>a</sup>	A	T	A	T	A	A	C	C	C	T	A	T	C	C	C	C	G	G	A	G	T	C	A	G	A	A	A	T	A
B4	G	.	.	.	.	T	.	.	C	.	C	T	.	.	.	.	.	G	.	T	.	A	-	G	-	C	.	.	.
B11	G	.	.	.	.	T	.	.	C	.	C	T	.	.	.	.	.	G	.	T	.	-	G	-	C	.	.	.	.
S4	G	.	.	.	.	T	T	C	C	T	T	T	A	A	G	C	T	.	.	-	G	-	C	.	.	.	.	.	.
VE6	.	C	C	C	.	T	T	C	C	T	.	.	.	.	G	A	.	.	.	.	-	G	-	C	G	.	.	.	.
VE7	.	.	.	.	.	T	.	C	G	C	T	.	.	.	G	.	.	.	.	.	-	G	-	C	G	.	.	.	.
W1	G	.	C	C	C	T	.	C	C	T	T	.	.	G	.	T	G	.	-	G	-	C	.	.	.	.	.	.	.
W2	G	.	C	C	.	T	.	C	C	T	T	.	.	G	.	T	G	.	-	G	-	C	.	.	.	.	.	.	.

cana nativa (C1b). Los otros haplotipos en la red deben pertenecer al subhaplogrupo C1d, ya que todos carecen de la transición en la posición

nucleotídica (np) 15930 que define al restante subhaplogrupo del haplogrupo C1 que se encuentra en las Américas, C1c (figura 10) [39-41].



**Figura 9.** Red Mediana de HVR-I + II del haplogrupo C (16051-16438 + 18-493). El tamaño de cada círculo es proporcional a la frecuencia del haplotipo que representa. Mv1 y mv2 representan ancestros hipotéticos. Los tres linajes, C-I-CIII, son indicados con óvalos demarcados por líneas entrecortadas. CRS = Secuencia de Referencia Revisada Cambridge[29, 30]. Algunas mutaciones están subrayadas, indicando que se repiten.

El individuo B11 podría sugerir una expansión demográfica. De acuerdo con esta red filogenética, los indígenas warao (W1 y W2), que habitan la región del delta del Orinoco en Venezuela, están más relacionados con Colombia que con Venezuela a nivel del ADNmt. En este estudio, el individuo VE6 de Caracas, DF, Venezuela, clasificado como haplogrupo C, evidenció varias mutaciones antiguas en HVR-I (16086, 16183C, y 16278), que son diagnósticas del linaje C-II de Puerto Rico (figura 9)[26,27].

Además, se hizo un análisis *in silico* de los RFLP basado en la secuencia del ADN mitocondrial completo (codificante y no codificante) para el individuo VE6, mediante Webcutter 2,0[42]. En este análisis, 110 sitios de restricción se verificaron utilizando 14 endonucleasas y el haplotipo RFLP resultante se comparó con los 25 haplotipos del haplogrupo C (AM 30-43 y 77-87) reportados por Torroni *et al.*[43]. VE6 correspondió a haplotipo de RFLP AM32[25,43].



*Haplogrupo D.* La red mediana del haplogrupo *D* se construyó con 4 secuencias HVR-I + II del norte de Sudamérica y exhibió cuatro haplotipos exclusivamente de Colombia (no mostrada). Además, estuvo presente un ancestro hipotético, que puede inferirse como el haplotipo fundador del haplogrupo *D* del Nuevo Mundo.

### *Medidas de diversidad genética y pruebas estadísticas de neutralidad*

*Haplogrupos A-D.* De acuerdo con los resultados de la prueba de neutralidad de Tajima, cuando ambas regio-

nes hipervariables se calcularon en conjunto, el orden de la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) fue  $D > C > A > B$  (tabla 8). El haplogrupo *A* fue el único en demostrar una *D* de Tajima negativa estadísticamente significativa. La inclusión de las secuencias de la región de América Central no hizo diferencia en ninguno de los resultados.

*Subpoblaciones.* En las tres subpoblaciones donde HVR-I + II (16001-16483 + 16559-499) se calcularon en conjunto, la distancia genética promedio dentro de las subpoblaciones fue: 0,0130 en

**Tabla 8. Prueba de neutralidad de Tajima para HVR-I + II de ADNmt indígena del Norte de Suramérica**

Región Control	HVR -I+ HVR -II					
Haplogrupo	A		A*		D	
Región Cubierta	15920 -16503	15920 -16503	16001 -16483	15920 -16503	15920 -16489	
	16559 -454(a)	16559 -454(a)	16559 -481(a)	16559 -501	16559 -499	
	16 559 -501(b)	16559 -501(b)	16559 -499(b)			
m	27(a)	29 (a)	19 (a)	7	4	
	24(b)	26 (b)	17 (b)			
S	46(a)	46 (a)	13 (a)	18	13	
	43(b)	43 (b)	9 (b)			
P <sub>s</sub>	0.044019(a)	0.044019 (a)	0.013306 (a)	0.016438	0.012015	
	0.039377(b)	0.039377 (b)	0.009054 (b)			
Θ	0.011420(a)	0.011209 (a)	0.003807 (a)	0.006710	0.006554	
	0.010545 (b)	0.010319 (b)	0.002678 (b)			
π	0.004771 (a)	0.004582 (a)	0.002071 (a)	0.005827	0.006007	
	0.004751 (b)	0.004536 (b)	0.001731 (b)			
D	-2.201503 (a) £	-2.207442 (a) £	-1.676358 (a) £	-0.734341	-0.843068	
	- 2.116357 (b) £	-2.126174 (b) £	-1.274866 (b) £			

La Prueba estadística de Tajima [36] fue estimada mediante MEGA4 [35]; m= Número de muestras o secuencias, S=Número de sitios segregantes, P<sub>s</sub>=S/m, Θ=P<sub>s</sub>a<sub>1</sub> y π=diversidad nucleotídica. D=estadístico de Tajima. \*Incluyendo Centroamérica (Honduras y Nicaragua). £ P < 0.05.

Venezuela, 0,0121 en la región de la Costa Atlántica de Colombia, y 0,0108 en el centro de Colombia.

Entre las tres subpoblaciones, las distancias genéticas más grandes fueron centro de Colombia-Venezuela y costa de Colombia-Venezuela, con el mismo valor de 0,0128, mientras que la distancia genética del centro de Colombia a la costa de Colombia fue más pequeña, 0,0114.

Con base en las secuencias de HVR- I + II, la diversidad dentro de las subpoblaciones ( $\pi_s$ ), la población total ( $\pi_T$ ), entre subpoblaciones( $\delta_{ST}$ ) y el coeficiente de diferenciación ( $N_{ST}$ ), fueron 0,0119, 0,0116, -0,0003 y -0,0295, respectivamente.

En relación con la prueba de neutralidad de Tajima, el valor de la di-

versidad nucleotídica ( $\pi$ ) para las subpoblaciones donde HVR-I + II se calcularon en conjunto, Venezuela mostró el valor más alto, mientras que el centro de Colombia mostró el valor más bajo, probablemente debido a los efectos del valor de  $\pi$  más bajo para el haplogrupo B mencionado anteriormente (tabla 9). Ninguna población demostró un valor estadísticamente significativo de la  $D$  de Tajima.

**Discusión**

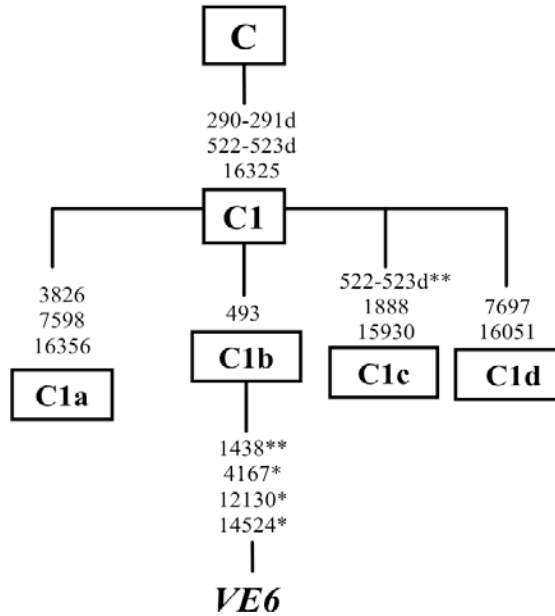
***Secuenciación de HVR-I y HVR-II***

*Norte de Suramérica.* Entre los amerindios, la distribución de los haplogrupos *A-D* para el norte de América del Sur es cónsona con la tendencia general [15, 37, 44-46], donde *A* se presenta con altas frecuencias (~50%) en las poblaciones

**Tabla 9. Prueba de Neutralidad de Tajima para 3 subpoblaciones del norte de Suramérica**

Población	Colombia Costa	Colombia Centro	Venezuela	Total
<b>m</b>	11	33	8	52
<b>S</b>	38	52	30	76
<b>P<sub>s</sub></b>	0.038345	0.052472	0.030426	0.077157
<b>Θ</b>	0.013092	0.012929	0.011735	0.017075
<b>π</b>	0.011815	0.010538	0.012750	0.011419
<b>D</b>	-0.456243	-0.679891	0.458680	-1.160421

La Prueba estadística de Tajima [36] fue estimada mediante MEGA4 [35]; m= Número de muestras o secuencias, S=Número de sitios segregantes, P<sub>s</sub>=S/m, Θ=P<sub>s</sub>a<sub>i</sub> y π=diversidad nucleotídica. D= Estadístico de Tajima.



**Figura 10.** Clasificación de VE6 basado en la secuencia codificante del ADNmt. El clado Americano Nativo *C1b* define el origen filogenético de VE6 [39-41]. \*\*Ausencia de esta mutación (mutación hacia atrás). \* Polimorfismos Especiales de VE6.

del norte y está ausente en el cono sur, mientras que *D* muestra la distribución opuesta. Por el contrario, con excepción de Venezuela, en donde el haplogrupo *C* fue frecuente, los haplogrupos *C* y *D* y haplogrupos no indígenas de América son relativamente escasos en todas las regiones.

La alta frecuencia del haplogrupo *A* observada aquí está en concordancia con estudios anteriores en el Caribe, incluyendo Puerto Rico (*A*=52,4%) [22], República Dominicana (*A*=57,8%) [27] y Cuba (*A*=67,9%) [24], mientras que la baja frecuencia del haplogrupo *D* se observó en Puerto Rico

(*D*=2,9%) [22], República Dominicana (*D*=8,1%) [27] y Cuba (*D*=9,9%) [24].

En las muestras adicionales de Centroamérica, Honduras y Nicaragua, la presencia del haplogrupo *A* concuerda con resultados de otros autores [15, 47, 48].

La segunda frecuencia más alta de haplogrupos amerindios observada en este estudio pertenece a *B*, un patrón similar al observado en América Central [48], pero no en el Caribe.

Por último, las bajas frecuencias de haplogrupos no amerindios *L* y *U* de-

tectadas en este trabajo no están compartidas con los más altos valores encontrados en Puerto Rico[22], Cuba[24] y República Dominicana[27].

*Colombia.* Los resultados de este estudio sugieren que 92,1% de las muestras de ADN mitocondrial de Colombia eran de origen amerindio. Keyeux *et al.*[37] reportaron 96,9% de amerindios pertenecientes a 25 grupos étnicos diferentes (n 681). Yunis *et al.*[49] informaron resultados próximos, donde el 85,5% de la población colombiana presentaba ADNmt de origen indígena (n=1.522).

Por lo tanto, el valor de ADN mitocondrial amerindio en el presente trabajo se encuentra muy cerca del punto medio de los estudios mencionados, teniendo en cuenta que en este estudio ambas regiones hipervariables fueron secuenciadas en un número de muestras menor que el estudiado por Keyeux *et al.*[37], que trabajó con RFLP, y Yunis *et al.*[49].

Hasta donde conocemos, este es el primer trabajo que reporta secuencias de ambas regiones, HVR-I + II, en la población mestiza de Colombia y Venezuela, proveyendo así mayor información acerca de la diversidad mitocondrial indígena.

Al parecer, la cordillera de los Andes orientales de Colombia ha influi-

do en la distribución de los haplogrupos, sobre todo la alta frecuencia de *B* en la zona central (Bogotá y Villa de Leyva), y la ausencia de *C* en Villa de Leyva. Fernández[50] también observó esta alta frecuencia de *B* en restos óseos precolombinos en el altiplano cundiboyacense (territorio muisca). Como los mestizos son generalmente mucho más móviles que los grupos aborígenes, el efecto de la topografía en la distribución de haplogrupos ha sido más evidente en las tribus indígenas[37] que en los mestizos.

El patrón de frecuencias de los haplogrupos notificado por Keyeux *et al.*[37] y por el presente estudio, es similar con la excepción del haplogrupo *C*, que en el presente trabajo muestra una frecuencia mucho menor (figura 3). Esta excepción se explica por las tribus con altas frecuencias del haplogrupo *C* que se muestra por Keyeux *et al.*[37] en la región de la costa norte: Córdoba-Sucre (zenú), Sierra Nevada de Santa Marta (arsario, kogui) y La Guajira (wayuú), pero especialmente, por la cuenca del Amazonas: huitoto, murui-muiname, piaroa, tucano, coreguaje, y nukak, además de dos tribus en los Andes del Sur: ingano y guambiano.

Por otra parte, Keyeux *et al.*[37] no tomaron muestras de la zona centro, como Bogotá o Villa de Leyva. Aunque se requerirán posteriores muestreos de la zona central de Co-

lombia, la imagen que surge es una disminución de frecuencias del haplogrupo *C* en el centro de Colombia, en contraste con la gran frecuencia de este haplogrupo en el norte de Colombia, el sur y la Amazonia[37].

La presencia del haplogrupo *L* (no indígena) en Colombia (en particular, en Santa Marta y Bogotá) en este estudio, también fue detectada por los autores mencionados[15, 37]. Este haplogrupo fue el resultado de la importación de africanos por los portugueses y de otros comerciantes de esclavos a comienzos del siglo XVI. En Colombia, miles de africanos desembarcaron en el Pacífico y en la Costa Atlántica. En la actualidad, sus descendientes son llamados afrocolombianos[38].

*Bogotá, D.C., Colombia.* Yunis *et al.*[51] se refirieron a Cundinamarca, Boyacá y los departamentos de Santander, así como a Bogotá, la capital de la región centro-oriental de los Andes de Colombia, como una población “caucásico-mestiza”. Anteriormente, Rodas *et al.*[38] se refirieron a Bogotá como una población mestiza (la representación de la mayoría de la población urbana del país). Nuestros resultados son muy similares a los de ese estudio (figura 4). Las frecuencias de los haplogrupos *B* y *L* fueron algo más altas y no encontramos una sola muestra perteneciente al haplogrupo *U* de Eurasia occidental. Estas diferen-

cias son menores y se explican por error de muestreo (tamaño de la muestra  $n=25$  en comparación con  $n=91$ ) en el trabajo de Rodas *et al.*[38]. Sin embargo, en apoyo a nuestro estudio, el haplogrupo *B* se detectó en la mayoría de los restos óseos precolombinos de Bogotá (período Herrera)[52].

*Villa de Leyva, Boyacá.* Hasta ahora, no existían reportes de ADNmt acerca de este municipio específico de Boyacá. De 12 personas, encontramos una distribución de haplogrupos similar a la de Bogotá, con la excepción del haplogrupo *C* que estuvo ausente, y la presencia de un individuo clasificado como haplogrupo *U*, que es congruente con Yunis *et al.*[51], quienes consideran al departamento de Boyacá, como una población caucásico-mestiza.

*Región de la costa norte, Colombia.* La gran frecuencia del haplogrupo *A* en la Costa Caribe de Colombia es evidente, tanto en este estudio como en el de Melton *et al.* (figura 5). Sin embargo, las frecuencias de haplogrupos *B*, *C* y *D* son sustancialmente diferentes, probablemente debido a que nuestro estudio analiza secuencias HVR-I y HVR-II de mestizos de Santa Marta y Barranquilla, las ciudades, mientras que Melton *et al.* [15] examinaron sólo secuencias HVR-I de las tribus de la Sierra Nevada de Santa Marta ( $n=80$ ) y La Guajira ( $n=30$ ). Además, el tamaño

de la muestra fue menor en el presente estudio (n=14).

Los wayuú (Guajira) han mostrado altos niveles de haplogrupo *C* en estudios anteriores[15, 37]. La Sierra Nevada de Santa Marta es un sistema montañoso separado de la cordillera de los Andes (5.775 msnm) y constituye un ecosistema único en el mundo[13]. Los descendientes de la cultura indígena tairona (arsario, ijka y kogui) viven en resguardos indígenas ubicados en la mitad de las tierras altas[13].

Considerando ambos estudios en conjunto, es evidente que el haplogrupo *A* predomina ampliamente, tanto en la población de la Sierra Nevada de Santa Marta (lengua chibcha) como en Santa Marta y Barranquilla. Esta característica es compartida con la población chibcha de América Central inferior[15, 43], así como con el Caribe, específicamente, Puerto Rico[22], la República Dominicana[27] y Cuba[24]. Estos habitantes de la costa norte de Colombia difieren de los grupos de América Central[15, 43, 48] en la presencia del haplogrupo *C*. Nuestros resultados, con sólo una muestra de cada uno de Honduras y Nicaragua, son coherentes con este escenario.

*Venezuela.* La prevalencia de los haplogrupos *A* (60%) y *C* (40%) encontrada en Venezuela en este trabajo, es similar a los resultados de Puerto Rico[22], en el que los haplogrupos

americanos nativos *A* (52,4%) y *C* (36,0%) fueron los más comunes (figura 6). Una investigación sobre el ADNmt de Caracas, Venezuela, fue desarrollada mediante RFLP [17]. Cuando se calculó el total de frecuencias de haplogrupos amerindios, *A* (53,4%) y *C* (22,4%) predominaron sobre *B* (15,5%) y *D* (8,6%). Del mismo modo, en un estudio sobre la población guahibo de Venezuela, en el que se analizaron secuencias de ADNmt HVR-I y HVR- II, las frecuencias altas fueron encontradas en *A* (47,46%) y *C* (49,15%), la baja frecuencia en *B* (3,39%) y se observó ausencia de *D*[53]. Todo esto, en combinación con los resultados ya reportados sobre las poblaciones de la región de la costa norte de Colombia, sugiere que los haplogrupos *A* y *C* son los más frecuentes en todo el litoral septentrional del continente (figura 6).

### Redes medianas

*Haplogrupo A.* La transición 16129 se observó en dos muestras de este estudio, SM2 de Santa Marta, Colombia, y VE1 de Caracas, D.F., Venezuela. También, se detectó en 6 de 49 muestras de Puerto Rico, definiendo el linaje *A-VIII*[26, 27], así como en una secuencia HVR-I de ciboneyes de Cuba[54], y además, en cinco muestras de la República Dominicana[55]. Esta particular mutación también se ha detectado en tribus de Norteamérica[56], Centroamérica[47] y Suramé-

rica[15,57,58]. Se ha detectado en las poblaciones indígenas arsario (n=9), ijka (n=28) y kogui (n=3), localizadas en la Sierra Nevada de Santa Marta, que podrían representar a los descendientes de la cultura precolombina tairona.

Por su carácter cosmopolita, así como por su hipermutabilidad[33, 59], la presencia simultánea de la transición 16129 en el Caribe y en el norte de Suramérica no implica necesariamente un origen en común. Para la determinación del origen del linaje A-VIII de Puerto Rico, será necesario secuenciar completamente el ADNmt de las muestras que exhibieron tal transición, como SM2 (Santa Marta, Colombia) y VE1 (Caracas, D.F., Venezuela) en este estudio.

Otros haplotipos con mayor especificidad también son compartidos entre las muestras aquí estudiadas y otras reportadas para la metarregión. La muestra VE3 de este trabajo presentó una delección en np 106-111 (106-111d) asociada con una transición a np 16360. Esta combinación de mutaciones se ha detectado en ADNmt de Costa Rica, República Dominicana y Panamá [55, 60, 61], mientras que en Chile sólo se ha detectado la delección (106-111d)[62].

La transición np 16266 estuvo presente en dos secuencias de la República Dominicana[55], en un individuo de Colombia (este estudio-S12) y en

una secuencia de Brasil[57]. La np 16092 se detectó en una secuencia dominicana[55], en un individuo de Colombia (este estudio-BAR1), en un individuo de Panamá[47], en un nativo del departamento de Ancash, Perú[46] y también, en un haplotipo de Uruguay[55].

El haplotipo VL4 de Colombia presentó las transiciones 16145 (HVR-I) y 226 (HVR-II). Este haplotipo se observó en 17 personas de la población guahibo de Venezuela. Otros dos individuos sólo presentaron la transición 16145, lo que sugiere su anterior aparición[53]. El haplotipo S3 mostró la transición 16126, también detectada en 5 muestras de Panamá[47]. En conclusión, hemos encontrado posibles vínculos con poblaciones centroamericanas, caribeñas, andinas y amazónicas.

*Haplogrupo B.* En todo el mundo, la delección en la posición 498 ha sido reportada únicamente para un miembro de la tribu ngöbe en Panamá y dos miembros de la tribu wayuú, en la península de La Guajira[63].

Un análisis de 2.196 secuencias completas de ADN mitocondrial a nivel mundial, rindió tan sólo una transición en esta posición de nucleótidos[64], lo que sugiere que la posición 498 es muy estable y que los ADNmt que hemos encontrado con esta delección deben guardar una rela-

ción evolutiva muy estrecha entre sí y con los ngöbe y los wayuú, formando así el linaje que llamamos *B-I*.

Nuestro estudio demuestra que este linaje se encuentra, no sólo en Panamá y en la península de La Guajira, sino que es predominante en la cordillera Oriental y que, aún más, se encuentra en el Valle del Cauca. Además, la forma de tipo estrella de este linaje (figura 8) sugiere una expansión de población reciente en las cordilleras andinas, la cual estimamos en  $5.146 \pm 3.205$  años, usando la calibración combinada para las regiones 16051 - 16400 y 68 - 263[64].

Debido a las limitaciones geográficas de nuestro muestreo, es posible que la expansión de la población no se haya limitado únicamente a la región de la cordillera. Sin embargo, el hecho de que el ngöbe reportado por Tamm *et al.*[63] presente un haplotipo derivado, sugiere que descendió de los otros haplotipos de este linaje en Colombia. Esto implicaría una migración en dirección contraria a la que dio origen a las primeras poblaciones suramericanas desde Centroamérica. Esta migración en dirección contraria a la original, es fácil de explicar por una expansión de población reciente de este linaje en Colombia, en una zona que incluye, pero no necesariamente se limita, a la cordillera Oriental.

En concordancia con su hipermutabilidad, la transición 16129 observada en el haplotipo B8 (linaje *B-II*) en este estudio, ha sido reportada en dos haplotipos *B* de Panamá[47] y en algunos nativos de Perú, dos muestras de Puno y uno de Tupe[46]. No hubo coincidencias entre los haplotipos del haplogrupo *B*, de Colombia y de Puerto Rico.

*Haplogrupo C.* En esta red mediana, la transición np 493 define al subhaplogrupo *C1b*, mientras que la combinación de transiciones 16051 y 194 define a *C1d2*[39, 63]. La transición 16051 observada en el haplogrupo *C* también se detectó en 9 individuos de Panamá[47] y *C1d2* ha sido encontrado en la República Dominicana[27]. La transición 16189, presentada en el haplotipo *VE6* y los indios warao del haplogrupo *C* (subhaplogrupo *C1d2*) [10], también se detectó anteriormente en dos restos óseos (162 y 53) de taínos extintos en el sitio precolombino de La Caleta, en República Dominicana[21] y fue ilustrado en la red mediana por Melton *et al.*[15]. Sin embargo, la posición 16189 se considera un sitio hipermutable[33, 59]. Además, los resultados que suelen obtenerse con ADN antiguo no son muy fiables[65].

*VE6* correspondió al haplotipo RFLP AM32[25, 43]. Este haplotipo RFLP tiene una distribución generalizada, tanto en Norteamérica (1 pima



en Sonora, México) como en Suramérica (1 piaroa en Amazonia de Venezuela y Colombia, 5 makiritare en el sur de Venezuela, 1 wapishana en el sur de Guyana y el norte de Brasil, y 1 maruboen el oeste de Brasil)[43]. Sin embargo, su haplotipo de la región control sólo ha sido descrito para Puerto Rico e hispanos en los Estados Unidos, posiblemente de ascendencia puertorriqueña[39].

*VE6 podría haber migrado de Suramérica a Puerto Rico antes de los arahuacos.* La red mediana del haplogrupo *C* de Puerto Rico, se ensambló con 39 secuencias de HVR-I + II[26,27]. Se compone de cuatro linajes, *C-I*, *C-II*, *C-III* y *C-IV*, los cuales podrían haber llegado de forma independiente a la isla. El linaje *C-I* pertenece al haplotipo RFLP AM79, que se caracteriza por la falta de un sitio *RsaI* en np 7013, y ha sido encontrado solamente en dos tribus en el Amazonas: los yanomami (Brasil, Venezuela) y krahó (Brasil)[43].

Por lo tanto, el linaje *C-I* se considera representativo de un proceso migratorio desde Suramérica hacia Puerto Rico. Además, el linaje *C-I* cumple con la desigualdad paramétrica  $S > \Pi > 1,5 \times \rho$ , lo que permite el uso de  $\rho$  como reloj molecular. Así, la llegada de *C-I* a Puerto Rico se ha estimado en aproximadamente  $2.800 \pm 1.600$  años A.P. Esto es coherente con la llegada de las culturas agrocerámicas arahuacas

saladoides y huecoides desde Suramérica a la isla[66-69].

El linaje *C-II*, clado *C1b*, es el segundo mayor linaje del haplogrupo *C* en Puerto Rico. El linaje *C-II* no cumple con la desigualdad paramétrica que permita estimar su tiempo de llegada a través de  $\rho$ . Sin embargo, como *C-II* presenta una mayor diversidad que *C-I*, debió haber llegado a Puerto Rico antes que *C-I*, por lo tanto, antes de la migración arahuaca. El haplotipo de HVR-I + II de *VE6* lo identifica, sin lugar a dudas, como perteneciente al linaje *C-II* de Puerto Rico. Por lo tanto, los hallazgos sugieren la migración hacia Puerto Rico de culturas prearahuacas desde el continente suramericano[26, 27].

*Haplogrupo D.* La transición 16189, observada en el individuo VL10 del haplogrupo *D*, fue encontrada en un nativo (AN22) de Ancash, Perú[46]. La transición 16129 detectada en la muestra B2 (Bogotá, D.C.), fue encontrada en un nativo (YU019) de Yungay, Perú[70]. Interesantemente, la mutación 16129, presente en la muestra B2 del haplogrupo *D*, había sido identificada en un resto óseo (189) de taínos extintos del sitio precolombino de La Caleta en la República Dominicana[21]. Sin embargo, las posiciones 16189 y 16129 son considerados sitios hipermutables por algunos autores[33, 59]. Además, los resultados generalmente obtenidos

con ADN antiguo no son muy fiables[65].

### Medidas de diversidad genética y pruebas estadísticas de neutralidad

*Haplogrupos A-D.* Con respecto a la segregación de los sitios en ambos HVR-I + II para cada haplogrupo A-D, se observó que  $S > p$ , lo cual es indicativo de una expansión demográfica o de selección positiva en el haplogrupo estudiado. Estas observaciones están relacionadas con el valor negativo de la  $D$  de Tajima. El único valor significativo de la  $D$  de Tajima correspondió al haplogrupo A (incluyendo Centroamérica, A\*). Este alto valor ( $p < 0,05$ ) se asocia con la red filogenética del haplogrupo A, la cual está conformada por siete linajes, donde se ilustra la expansión demográfica en comparación con las otras redes medianas (figura 7).

*Subpoblaciones.* La diversidad de las secuencias fue más alta dentro de las subpoblaciones que para toda la población, lo que evidencia la falta de diferenciación de las subpoblaciones, posiblemente a causa de las migraciones internas o al alto flujo génico. El alto flujo génico fue detectado en el registro del ancestro más lejano de los consentimientos informados de todas las muestras, especialmente, las migraciones hacia Bogotá desde otros departamentos, pero también, entre Cundinamarca y Boyacá, y entre al-

gunos departamentos de la región del Atlántico, Magdalena, Atlántico, Bolívar, Córdoba y Sucre. El flujo génico entre las subpoblaciones en la región Andina pudo haber ocurrido durante milenios. Fuselli *et al.*[71] observaron características de la población que son consecuentes, históricamente, con un mayor flujo génico entre las tribus andinas y un menor flujo génico en la cuenca del Amazonas. El coeficiente de diferenciación o parámetro  $F_{ST}$  ( $0 > F_{ST} > 1$ ) es indicativo de que no hay subdivisión entre las subpoblaciones.

La diversidad nucleotídica observada en la población arsario de la Sierra Nevada de Santa Marta ( $\pi=0,012$ ) [15], está muy cerca de la diversidad nucleotídica detectada en la costa de Colombia ( $\pi=0,0118$ ), y también, cercana al valor de Venezuela ( $\pi=0,0127$ ) encontrado en el presente estudio. Del mismo modo, los valores de  $\pi$  en poblaciones de Suramérica, como la shamatari ( $\pi=0,011$ ) [10], zoro ( $\pi=0,011$ ) y gaviao ( $\pi=0,012$ )[72], y de Centroamérica, incluyendo ngöbe ( $\pi=0,012$ )[73], kuna ( $\pi=0,011$ ) y huetar ( $\pi=0,011$ )[46], están cerca de los valores de  $\pi$  de las tres subpoblaciones del norte de Suramérica del presente estudio.

Con respecto a los sitios segregadores en HVR-I + II, se observaron valores negativos estadísticamente no significativos para la  $D$  de Tajima en todas las subpoblaciones, excepto

Venezuela. Estudios con *loci* neutrales, como el ADNmt, típicamente demuestran valores negativos de la *D* de Tajima, como consecuencia de expansiones de población recientes. Entonces, el valor positivo rendido para Venezuela podría sugerir la subdivisión de la población. Cabe señalar que, en el occidente de Venezuela, hay más presencia del haplogrupo *A*, mientras que, en el oriente hay más presencia de haplogrupo *C*. Suponemos que la cordillera de Mérida tiene influencia en la distribución geográfica de los haplogrupos en Venezuela (figura 2).

### Perspectivas

La determinación del origen del linaje *A-VIII* de Puerto Rico requerirá la secuenciación completa del ADNmt de SM2 (Santa Marta, Colombia) y VE1 (Caracas, Venezuela), muestras de este estudio, teniendo en cuenta que la transición 16129 del haplogrupo *A* se observó en estas muestras. También se encontró en los ciboneyes extintos de Cuba y en otras tribus de Norteamérica, Centroamérica y Suramérica, además de la República Dominicana.

Sería recomendable ampliar el muestreo de la Costa Caribe del norte de Suramérica, con el propósito de encontrar más conexiones con Puerto Rico y ayudar en la reconstrucción de las migraciones precolombinas al Caribe.

La distribución geográfica de 498d (linaje *B-I*), un polimorfismo probablemente encontrado en los principales departamentos que pertenecen a la cordillera Oriental andina, debe ser corroborada con un muestreo más numeroso y cubriendo una zona más amplia de Colombia.

### Agradecimientos

El presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Genética Poblacional y Evolutiva, Departamento de Biología, Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez. El apoyo financiero fue otorgado por una subvención de la Fundación Nacional de Ciencias a J.C.M.C.

Los autores desean agradecer a Rafael Montalvo y Carlos A. Muñoz, por sus recomendaciones a este trabajo. Expresamos nuestra gratitud a Damaris Santana, por sus sugerencias en el análisis estadístico. También estamos muy agradecidos con los participantes de Colombia, Venezuela, Honduras y Nicaragua, por su contribución voluntaria a este estudio.

### Bibliografía

1. Herrnstadt C, Elson JI, Fahy E, Preston G, Turnbull DM, Anderson C, *et al.* Reduced-median-network analysis of complete mitochondrial DNA coding-region sequences for the major African, Asian, and European haplogroups. *Am J Hum Genet.* 2002;70:1152-71.

2. Holland MM, Parsons TJ. Mitochondrial DNA sequence analysis: Validation and use for forensic casework. *Forensic Sci Rev.* 1999;11:21-50.
3. Ingman M, Gyllensten U. MtDB: Human Mitochondrial Genome Database, a resource for population genetics and medical sciences. *Nucleic Acids Res.* 2006;34:749-51.
4. Hudson G, Carelli V, Spruijt L, Gerards M, Mowbray C, Achilli A, *et al.* Clinical expression of Leber hereditary optic neuropathy is affected by the mitochondrial DNA-haplogroup background. *Am J Hum Genet.* 2007;81:228-33.
5. Moreno-Loshuertos R, Acín-Pérez R, Fernández-Silva P, Movilla N, Pérez-Martos A, Rodríguez de Córdoba S, *et al.* Differences in reactive oxygen species production explain the phenotypes associated with common mouse mitochondrial DNA variants. *Nature.* 2006;11:1261-8.
6. Bermisheva MA, Viktorova TV, Khusnutdinova EK. Polymorphism of human mitochondrial DNA. *Russ J Genet.* 2003;39:849-59.
7. Kayser M, Choi Y, van Oven M, Mona S, Brauer S, Trent RJ, *et al.* The impact of the Austronesian expansion: evidence from mtDNA and Y chromosome diversity in the Admiralty islands of Melanesia. *Mol Biol Evol.* 2008;25:1362-74.
8. Hill C, Soares P, Mormina M, Macaulay V, Clarke D, Blumbach PB, *et al.* A mitochondrial stratigraphy for Island Southeast Asia. *Am J Hum Genet.* 2007;80:29-43.
9. Behar DM, Villems R, Soodyall H, Blue-Smith J, Pereira L, Metspalu E, *et al.* The dawn of human matrilineal diversity. *Am J Hum Genet.* 2008;82:1130-40.
10. Fagundes NJR, Kanitz R, Eckert R, Valls AS, Bogo MR, Salzano FM, *et al.* Mitochondrial population genomics supports a single pre-clovis origin with a coastal route for the peopling of the Americas. *Am J Hum Genet.* 2008;82:583-92.
11. Schurr T, Sherry S. Mitochondrial DNA and Y chromosome diversity and the peopling of the Americas: Evolutionary and demographic evidence. *Am J Hum Biol.* 2004;16:420-39.
12. Central Intelligence Agency (CIA). The World Factbook. 2009. Disponible en: <http://www.cia.gov/library/publications/the-world-Factbook/index.html>
13. Fundación Hemera. Etnias de Colombia. 2009. Disponible en: [http://hemeracomunicar.com/wiki/index.php?title=P%C3%A1gina\\_Principal](http://hemeracomunicar.com/wiki/index.php?title=P%C3%A1gina_Principal)
14. Lewis, MP (editor). *Ethnologue: Languages of the World*, Sixteenth edition. Dallas, Tex.: SIL International; 2009. Disponible en: <http://www.ethnologue.com/>
15. Melton PE, Briceño I, Gómez A, Devor EJ, Bernal JE, Crawford MH. Biological relationship between Central and South American Chibchan speaking populations: Evidence from mtDNA. *Am J Phys Anthropol.* 2007;133:753-70.
16. Galeón. Culturas indígenas colombianas. 2001. Disponible en: <http://www.galeon.com/culturasamerica/Cultura.htm>
17. Martínez H, Rodríguez-Larralde A, Izaguirre MH, De Guerra D. Admixture estimates for Caracas, Venezuela, based on autosomal, Y-chromosome and mtDNA markers. *Hum Biol.* 2007;79:201-13.
18. Moscoso F. Caciques, aldeas y población taína de Boriquén: Puerto Rico (1492-1582). Academia Puertorrique-

- ña de la Historia. Colombia: Nomos Impresora; 2008;246.
19. Abbad FI. *Historia geográfica, civil y natural de la isla de San Juan Bautista de Puerto Rico*. San Juan. Ediciones Doce Calles e Historiador Oficial de Puerto Rico; 622.
  20. Fernández-Méndez E. *Historia cultural de Puerto Rico*. San Juan. Ediciones El Cemí; 1970;351.
  21. Lalueza-Fox C, Calderón FI, Calafell F, Morera B, Bertranpetit J. MtDNA from extinct Tainos and the peopling of the Caribbean. *Ann Hum Genet*. 2001;65:137-51.
  22. Martínez-Cruzado JC, Toro-Labrador G, Viera-Viera J, Rivera-Vega MY, Startek J, Latorre-Esteves M, *et al*. Reconstructing the population history of Puerto Rico by means of mtDNA phylogeographics analysis. *Am J Phys Anthropol*. 2005;128:131-55.
  23. Martínez-Cruzado JC, Toro-Labrador G, Ho-Fung V, Estévez-Montero MA, Lobaina-Manzanet A, Padovani-Claudio DA, *et al*. Mitochondrial DNA analysis reveals substantial native American ancestry in Puerto Rico. *Hum Biol*. 2001;73:491-511.
  24. Mendizabal I, Sandoval K, Berniell-Lee G, Calafell F, Salas A, Martínez-Fuentes A, *et al*. Genetic origin, admixture, and asymmetry in maternal and paternal human lineages in Cuba. *BMC Evol Biol*. 2008;8:213.
  25. Díaz-Matallana M. In search of pre-Columbian migrations to the Caribbean: Indigenous mitochondrial DNA from northern South America (thesis). Mayagüez, Puerto Rico: University of Puerto Rico.
  26. Martínez-Cruzado JC. The history of mitochondrial DNA lineages in Puerto Rico. In: Fitzpatrick SM, Ross AH, editors. *Island shores, distant pasts: archaeological and biological approaches to the pre-Columbian settlement of the Caribbean*. Gainesville, Florida, USA: University Press of Florida; 2010 (in press).
  27. Martínez-Cruzado JC, Pérez-Quñones MDL, Nieves-Colón MA, Álvarez-Serrano A, Cedeño-González M, Mercedes de la Cruz F, *et al*. Migraciones precolombinas al Caribe: El ADN mitocondrial de dos Antillas Mayores. Presentado en el X Congreso Latinoamericano de Antropología Biológica (ALAB), La Plata, Argentina. 2008. Disponible en: <http://www.xalab.fcnym.unlp.edu.ar/index.html>
  28. Rieder MJ, Taylor SL, Tobe VO, Nickerson DA. Automating the identification of DNA variations using quality-based fluorescence re-sequencing: analysis of the human mitochondrial genome. *Nucleic Acids Res*. 1998;26:967-73.
  29. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, De Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, *et al*. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 1981;290:457-65.
  30. Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet*. 1999;23:147.
  31. Forster M, Forster P, Watson J. Network 4.5.1.0, free phylogenetic software. 2004-2009. Disponible en: <http://www.fluxus-engineering.com/index.htm>
  32. Bandelt HJ, Forster P, Rohl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol*. 1999;16:37-48.
  33. Meyer S, Weiss G, von Haeseler A. Pattern of nucleotide substitution and rate heterogeneity in the hypervariable

- regions I and II of human mtDNA. *Genetics*. 1999;152:1103-10.
34. Nei M, Kumar S. *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press; 2000. p. 333.
  35. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Mol Biol Evol*. 2007;24:1596-9. Disponible en: <http://www.megasoftware.net/>
  36. Tajima F. Statistical methods to test for nucleotide mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. 1989; 123:585-95.
  37. Keyeux G, Rodas C, Gelvez N, Carter D. Possible migration routes into South America deduced from mitochondrial DNA studies in Colombian Amerindian populations. *Hum Biol*. 2002;74:211-33.
  38. Rodas C, Keyeux G, Gelvez N. Mitochondrial DNA studies show asymmetrical Amerindian admixture in Afro-Colombian and mestizo populations. *Hum Biol*. 2003;75:13-30.
  39. Achilli A, Perego UA, Bravi CM, Coble MD, Kong QP, Woodward SR, *et al*. The phylogeny of the four Pan-American mtDNA haplogroups: implications for evolutionary and disease studies. *Plos One*. 2008;3:e1764.
  40. Kivisild T, Shen P, Wall DP, Bao D, Sung R, Davis K, *et al*. The role of selection in the evolution of human mitochondrial genomes. *Genetics*. 2006;172:373-87.
  41. Volodko NV, Starikovskaya EB, Mazunin IO, Eltsov NP, Naidenko PV, Wallace DC, *et al*. Mitochondrial genome diversity in Arctic Siberians, with particular reference to the evolutionary history of Beringia and pleistocenic peopling of the Americas. *Am J Hum Genet*. 2008;82:1084-100.
  42. Heiman M. Webcutter 2.0. Yale University, 1997. Disponible en: <http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>
  43. Torroni A, Schurr TG, Cabell MB, Brown MD, Neel JV, Lersen M, *et al*. Asian affinities and continental radiation of the four founding native American mtDNAs. *Am J Hum Genet*. 1993;53:563-90.
  44. Fox C. Mitochondrial DNA haplogroups in four tribes from Tierra del Fuego-Patagonia: inferences about the peopling of the Americas. *Hum Biol*. 1996;68:855-71.
  45. Lalueza C, Pérez-Pérez A, Prats E, Cornudella L, Turbon D. Lack of founding Amerindian mitochondrial DNA lineages in extinct aborigines from Tierra del Fuego-Patagonia. *Hum Mol Genet*. 1997;6:41-6.
  46. Lewis CM, Tito RY, Lizárraga B, Stone AC. Land, language, and loci: mtDNA in native Americans and the genetic history of Perú. *Am J Phys Anthropol*. 2004;127:351-60.
  47. Kolman CJ, Bermingham E. Mitochondrial and nuclear DNA diversity in the Chocó and Chibcha Amerinds of Panamá. *Genetics*. 1997;147:1289-1302.
  48. Schurr T. Mitochondrial DNA and the peopling of the New World. Genetic variations among native Americans provide further clues to who first populated the Americas and when they arrived. *Am Scientist*. 2000;88:246.
  49. Yunis E, Yunis JJ, *et al*. El 85,5% de las madres colombianas tiene origen indígena. ¿Paisas y santandereanos vienen de los judíos? Como ser indio y europeo al mismo tiempo. *El Tiempo*, Colombia, 2006;13-10.
  50. Fernández C. La arqueología molecular aplicada a la solución de problemas prehistóricos: análisis de ADN mitocondrial en momias y restos óseos

- prehispanicos (tesis). Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 1999.
51. Yunis JJ, Acevedo LE, Campo DS, Yunis EJ. Population data of Y-STR minimal haplotypes in a sample of Caucasian-Mestizo and African descent individuals of Colombia. *Forensic Sci Int.* 2005;151:307-13.
  52. Silva A, Briceño I, Burgos J, Torres D, Villegas V, Gómez A, *et al.* Análisis de ADN mitocondrial en una muestra de restos óseos arcaicos del período Herrera de La Sabana de Bogotá. *Biomédica.* 2008;28:569-77.
  53. Vona G, Falchi A, Moral P, Calo C, Varesi L. Mitochondrial sequence variation in the Guahibo Amerindian population from Venezuela. *Am J Phys Anthropol.* 2005;127:361-9.
  54. Lalueza-Fox C, Gilbert MT, Martínez-Fuentes AJ, Calafell F, Bertranpetit J. Mitochondrial DNA from pre-Columbian Ciboneys from Cuba and the prehistoric colonization of the Caribbean. *Am J Phys Anthropol.* 2003;121:97-108.
  55. Feliciano-Vélez A. Genetic prints of Amerindian female migrations through the Caribbean revealed by control sequences from Dominican haplogroup A mitochondrial DNAs. M.S. University of Puerto Rico, Mayagüez (Puerto Rico). *ProQuest* Dissertations and Theses Database. 2007; AAT 1462981.
  56. Budowle B, Allard MW, Fisher CI, Isenberg AR, Monson KL, Stewart JEB, *et al.* HVI and HVII mitochondrial DNA data in Apaches and Navajos. *Int J Legal Med.* 2002;116:212-5.
  57. Alves-Silva J, Da Silva Santos M, Guimarães PE, Ferreira AC, Bandelt HJ, Pena SD, *et al.* The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet.* 2000;94:444-61.
  58. Moraga MI, Rocco P, Miquel JF, Nervi F, Llop E, Chakraborty R, *et al.* Mitochondrial DNA polymorphisms in Chilean aboriginal populations: Implications for the peopling of the southern cone of the continent. *Am J Phys Anthropol.* 2000;113:19-29.
  59. Bandelt HJ, Quintana-Murci L, Salas A, Macaulay V. The fingerprint of phantom mutations in mitochondrial DNA data. *Am J Hum Genet.* 2002; 71:1150-60.
  60. Castri L, Otárola F, Blell M, Ruiz E, Barrantes R, Luiselli D, *et al.* Indentured migration and differential gender gene flow: The origin and evolution of the East-Indian community of Limón, Costa Rica. *Am J Phys Anthropol.* 2007; 134:175-89.
  61. Santos M, Ward RH, Barrantes R. MtDNA variation in the Chibcha Amerindian Huetar from Costa Rica. *Hum. Biol.* 1994;66:963-77.
  62. Merriwether DA, Ferrel RE, Rothhammer F. MtDNA 6-bp deletion found in the Chilean Aymara: Not a unique marker for Chibcha speaking Amerindians. *Am J Hum Genet.* 1995; 56:812-13.
  63. Tamm E, Kivisild T, Reidla M, Metspalu M, Smith DG, Mulligan CJ, *et al.* Beringian standstill and spread of native American founders. *PLoS One.* 2007;2:e829.
  64. Soares P, Ermini L, Thomson N, Mormina M, Rito T, Röhl A, *et al.* Correcting for purifying selection: An improved human mitochondrial molecular clock. *Am J Hum Genet.* 2009; 84:740-59.
  65. Gilbert MTP, Bandelt HG, Hofreiter M, Barnes I. *Assessing ancient DNA studies.* *Trends Ecol Evol.* 2005;20: 541-4.
  66. Curet LA. Caribbean paleodemography: Population, culture history, and sociopolitical processes in ancient Puerto Rico. Tuscaloosa, Alabama, USA:

- The University of Alabama Press; 2006;233.
67. Chanlatte-Baik LA. *La Hueca y Sorcé* (Vieques, Puerto Rico). Primeras migraciones agroalfareras antillanas. Santo Domingo, República Dominicana. 1981.
  68. Chanlatte-Baik LA, Narganes-Storde YM. La cultura saladoide en Puerto Rico. Su rostro multicolor. Catálogo de exposición. San Juan, Puerto Rico: Museo de Historia, Antropología y Arte, Universidad de Puerto Rico. 2002.
  69. Haviser JB, Strecker M. Zone 2: Caribbean Area and North Coastal South America in Rock Art of Latin America and the Caribbean. Thematic Study: 43-83, Centre de Documentation, UNESCO - ICOMOS, Paris, France. 2006; PDF archive. Disponible en: <http://www.icomos.org/studies/rockart-latinamerica/zone2-1.pdf>
  70. Lewis CM, Lizarraga B, Tito RY, Stone AC. Mitochondrial DNA and the peopling of South America. *Hum Biol.* 2007;79:159-78.
  71. Fuselli S, Tarazona-Santos E, Dupanloup I, Soto A, Luiselli D, Pettener D. Mitochondrial DNA diversity in South America and the genetic history of Andean highlanders. *Mol Biol Evol.* 2003;20:1682-91.
  72. Ward RH, Salzano FM, Bonatto SL, Hultz MH, Coimbra CEA Jr., Santos RV. Mitochondrial DNA polymorphisms in three Brazilian Indian tribes. *Am J Hum Biol.* 1996;8:317-23.
  73. Kolman CJ, Bermingham E, Cooke R, Ward RH, Arias TD, Guionneau-Sinclair F. Reduced mtDNA diversity in the Ngöbe Amerinds of Panama. *Genetics.* 1995;140:275-83.