

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y  
BIOQUÍMICAS  
CARRERA DE BIOQUIMICA**



**DISTRIBUCIÓN DE HAPLOTIPOS DE LA REGIÓN  
HIPERVARIABLE MITOCONDRIAL DE LAS  
POBLACIONES INDÍGENAS ORIGINARIAS URU Y  
AYOREA DE BOLIVIA**

**TESIS DE GRADO PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIATURA EN  
BIOQUIMICA**

**POR: WENDY SOFIA VILLARROEL SALGUEIRO**

**LA PAZ –BOLIVIA  
Diciembre, 2011**

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y  
BIOQUÍMICAS  
CARRERA DE BIOQUIMICA**



**DISTRIBUCIÓN DE HAPLOTIPOS DE LA REGIÓN  
HIPERVARIABLE MITOCONDRIAL DE LAS  
POBLACIONES INDÍGENAS ORIGINARIAS URU Y  
AYOREA DE BOLIVIA**

**TESIS DE GRADO PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIATURA EN  
BIOQUIMICA**

**POR: WENDY SOFIA VILLARROEL SALGUEIRO**

**TUTORES: Dr. LUIS FERNANDO SOSA TORDOYA  
Lic. DANIELA ANDREA ARTEAGA VOIGT**

**LA PAZ –BOLIVIA  
Diciembre, 2011**

**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL MARCO DEL:**

**CONVENIO UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS – POLICÍA BOLIVIANA**



**UMSA – FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS  
CARRERA DE BIOQUÍMICA**



**IITCUP- CENTRO DE INVESTIGACIÓN GENÉTICA**



**PROYECTO CONCURSABLE ASDI: “FILOGEOGRAFÍA DE LOS PUEBLOS  
INDÍGENAS URU Y AYOREO BASADO EN EL ANÁLISIS DEL ADN  
MITOCONDRIAL”**



**LA PAZ- BOLIVIA  
Diciembre, 2011**

**Dedicatoria:**

A mis padres por su constante apoyo, entrega y sacrificio, por impartirme todos los valores para desarrollar una vida correcta.

## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias a Dios por permitirme alcanzar logros que en un principio eran lejanos.

Gracias a mi familia por apoyarme y creer en mí.

Gracias al Dr. L. Fernando Sosa Tordoya por ser Coordinador del Proyecto Concursable: “FILOGEOGRAFÍA DE LOS PUEBLOS INDÍGENAS URU Y AYOREA, BASADO EN EL ESTUDIO DEL ADN MITOCONDRIAL” y su constante apoyo, orientador de la presente Tesis.

Gracias a Daniela Andrea Arteaga Voigt, Ruddy Luna Barrón, Karina Salazar Chávez, Vanesa Serrudo Gonzáles, Marco Mendoza Careaga que fueron las primeras persona (amigos, camaradas) en impulsar todo este proyecto.

Gracias a Daniela Andrea Arteaga Voigt, por ser mentora en todo el desarrollo de la investigación y muchas más a realizar.

Gracias por su constante apoyo incondicional y compañeros camaradas a todo el equipo de investigación TANTASARAÑANI, sigamos adelante desarrollando las investigaciones y demás, bajo lo correcto y con ética profesional, siempre al lado de Dios.

**DISTRIBUCIÓN DE HAPLOTIPOS DE LA REGIÓN HIPERVARIABLE  
MITOCONDRIAL DE LAS POBLACIONES INDÍGENAS ORIGINARIAS URU Y  
AYOREA DE BOLIVIA**

**INDICE**

<b><u>INDICE.....</u></b>	<b><u>6</u></b>
<b><u>INDICE DE FIGURAS.....</u></b>	<b><u>9</u></b>
<b><u>INDICE DE TABLAS.....</u></b>	<b><u>10</u></b>
<b><u>RESUMEN.....</u></b>	<b><u>11</u></b>
<b><u>SUMMARY.....</u></b>	<b><u>13</u></b>
<b><u>I. INTRODUCCIÓN.....</u></b>	<b><u>15</u></b>
<b><u>II. HISTORIA DE LAS POBLACIONES AMERICANAS.....</u></b>	<b><u>17</u></b>
<b><u>III. PUEBLOS INDIGENAS ORIGINARIOS DE BOLIVIA.....</u></b>	<b><u>20</u></b>
<b><u>A. POBLACIÓN INDÍGENA ORIGINARIA URU.....</u></b>	<b><u>23</u></b>
<b><u>I. UBICACIÓN GEOGRÁFICA.....</u></b>	<b><u>23</u></b>
<b><u>II. ORIGEN MÍTICO DE LA POBLACIÓN ORIGINARIA URU.....</u></b>	<b><u>24</u></b>
<b><u>III. CARACTERÍSTICAS SOCIOCULTURALES.....</u></b>	<b><u>25</u></b>
<b><u>IV. HISTORIA DE LA POBLACIÓN ORIGINARIA URU.....</u></b>	<b><u>26</u></b>
<b><u>B. POBLACIÓN INDIGENA ORIGINARIA AYOREA.....</u></b>	<b><u>27</u></b>
<b><u>I. UBICACIÓN GEOGRÁFICA.....</u></b>	<b><u>27</u></b>
<b><u>II. ORIGEN MÍTICO DE LA POBLACIÓN ORIGINARIA AYOREA.....</u></b>	<b><u>27</u></b>
<b><u>III. CARACTERÍSTICAS SOCIOCULTURALES.....</u></b>	<b><u>28</u></b>
<b><u>IV. HISTORIA DE LA POBLACIÓN ORIGINARIA AYOREA.....</u></b>	<b><u>29</u></b>
<b><u>IV. ESTUDIOS ANTROPOLÓGICOS Y GENÉTICOS DE LOS PUEBLOS INDIGENAS</u></b>	
<b><u>    30</u></b>	
<b><u>A. MARCADORES GENÉTICOS EN EL ESTUDIO DE POBLACIONES INDÍGENAS.....</u></b>	<b><u>31</u></b>
<b><u>V. EL ADN MITOCONDRIAL.....</u></b>	<b><u>33</u></b>
<b><u>A. ORIGEN DE LA MITOCONDRIA.....</u></b>	<b><u>33</u></b>
<b><u>B. ORGANIZACIÓN GENÓMICA DEL ADN MITOCONDRIAL.....</u></b>	<b><u>34</u></b>
<b><u>C. EL ADN MITOCONDRIAL EN EL ESTUDIO DE POBLACIONES.....</u></b>	<b><u>35</u></b>
<b><u>I. POLIPLASMÍA.....</u></b>	<b><u>366</u></b>

II.	HERENCIA MATERNA.....	36
III.	TASA DE MUTACIÓN.....	37
IV.	HETEROPLASMÍA.....	37
1.	TIPOS DE HETEROPLASMIA.....	39
D.	REGIÓN CONTROL.....	40
E.	TÉCNICAS DE ESTUDIO DE LA REGIÓN CONTROL EN POBLACIONES HUMANAS.....	41
F.	APLICACIONES DEL ESTUDIO DE LA REGIÓN CONTROL EN POBLACIONES INDÍGENAS. .	45
<b>VI.</b>	<b><u>NOMENCLATURA.....</u></b>	<b>47</b>
<b>VII.</b>	<b><u>ANÁLISIS DE DATOS.....</u></b>	<b>49</b>
A.	HAPLOGRUPOS MITOCONDRIALES.....	49
B.	MEDIAN NETWORKS (REDES DE HAPLOTIPOS).....	50
C.	DIVERSIDAD GÉNICA.....	51
D.	DISTANCIA GENÉTICA: MODELOS DE SUSTITUCIÓN.....	51
E.	MODELOS DE AGRUPACIÓN: NEIGHBOR JOINING.....	52
F.	EVOLUCIÓN.....	53
G.	FILOGENÉTICA.....	53
<b>VIII.</b>	<b><u>JUSTIFICACIÓN.....</u></b>	<b>54</b>
<b>IX.</b>	<b><u>HIPOTESIS.....</u></b>	<b>55</b>
<b>X.</b>	<b><u>OBJETIVOS.....</u></b>	<b>55</b>
A.	OBJETIVO GENERAL.....	55
B.	OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	55
<b>XI.</b>	<b><u>DISEÑO METODOLOGICO.....</u></b>	<b>56</b>
A.	POBLACIONES DE ESTUDIO.....	56
B.	SITIO DE ESTUDIO.....	56
C.	TOMA DE MUESTRA.....	58
D.	ANÁLISIS GENÉTICOS.....	58
I.	OBTENCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN TOTAL.....	58
II.	ANÁLISIS POR PCR Y SECUENCIACIÓN.....	59
E.	ANÁLISIS DE DATOS.....	60
I.	ANÁLISIS COMPARATIVO DE LAS REGIONES POLIMÓRFICAS.....	60
<b>XII.</b>	<b><u>CRITERIOS ÉTICOS.....</u></b>	<b>61</b>
<b>XIII.</b>	<b><u>RESULTADOS.....</u></b>	<b>62</b>
A.	TAMAÑO DE LA MUESTRA.....	62
B.	CUANTIFICACIÓN Y CALIDAD DEL ADN TOTAL.....	63
C.	AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN HIPERVARIABLE (HVI Y HVII) DEL ADN MITOCONDRIAL.....	66
D.	ANÁLISIS DE SECUENCIAS.....	66
E.	ANÁLISIS FILOGENÉTICO.....	70

<b>XIV. DISCUSIÓN .....</b>	<b>75</b>
<b>I. OBTENCIÓN, CUANTIFICACIÓN DE ADN Y AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN HIPERVARIABLE MITOCONDRIAL .....</b>	<b>75</b>
<b>II. ANÁLISIS DE LOS HAPLOTIPOS .....</b>	<b>78</b>
<b>A. ANÁLISIS FILOGENÉTICO.....</b>	<b>82</b>
<b>XV. CONCLUSIONES.....</b>	<b>89</b>
<b>XV. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>90</b>
<b>XVI. REFERENCIAS .....</b>	<b>91</b>
<b>XVII. GLOSARIO .....</b>	<b>106</b>
<b>XVIII. ANEXOS.....</b>	<b>109</b>
<b>A. ANEXO 1: CONSENTIMIENTO INFORMADO .....</b>	<b>109</b>
<b>B. ANEXO 2: PROTOCOLO DE OBTENCIÓN DE ADN. MODIFICADO DE MILLER ET AL., (1988) Y KIT WIZARD GENOMIC DNA PURIFICATION (PROMEGA). .....</b>	<b>112</b>
<b>C. ANEXO 2: INSTRUCCIONES KIT BIG DYE TERMINATOR CYCLE SEQUENCING V. 3.1.....</b>	<b>113</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Teorías del poblamiento americano .....	19
<b>Figura 2.</b> Distribución del los pueblos de las Tierras Altas y Tierras Bajas de Bolivia. ....	22
<b>Figura 3.</b> Pobladores Uru Chipaya.....	23
<b>Figura 4.</b> Historia sobre el Origen Mítico de la población Uru.....	24
<b>Figura 5.</b> Viviendas “ <i>Phutucus</i> ” “ <i>Huayllichus</i> ” del pueblo Uru. ....	25
<b>Figura 6.</b> Pueblo Indígena Ayoreo.....	29
<b>Figura 7.</b> Teoría Endosimbionte de la mitocondria. ....	33
<b>Figura 8.</b> Estructura del ADN mitocondrial. ....	35
<b>Figura 9.</b> Heteroplasmía: Proceso de Cuello de Botella en el Oocito.....	38
<b>Figura 10.</b> Ejemplo de Heteroplasmía puntual.....	39
<b>Figura 11.</b> Ejemplo de Heteroplasmía longitud.....	40
<b>Figura 12.</b> Principales componentes de la Región Control del ADN mitocondrial .....	41
<b>Figura 13.</b> Nucleótido en ausencia del grupo hidroxilo en su extremo 3’ (ddNTP).....	43
<b>Figura 14.</b> Técnica de terminación de cadena de Sanger.....	44
<b>Figura 15.</b> Detección por medio de técnicas Automatizadas. ....	45
<b>Figura 16.</b> Distribución de los Haplogrupos por continente en base al ADN mitocondrial .....	50
<b>Figura 17.</b> Mapa de las zonas de estudio. ....	57
<b>Figura 18.</b> Condiciones de PCR. ....	59
<b>Figura 19.</b> Corrida electroforética en gel de agarosa al 1% de extractos de ADN total .....	63
<b>Figura 20.</b> Corrida electroforética en gel de agarosa al 1,2% de productos de PCR de la Región Hipervariable I y II .....	66
<b>Figura 21.</b> Electroferograma de la región hipervariable HVI . ....	67
<b>Figura 22.</b> Árbol Filogenético de los pueblos indígenas Uru y Ayoreo. ....	71
<b>Figura 23.</b> Árbol Filogenético de los pueblos indígenas Uru y Ayoreo, y poblaciones mestizas de La Paz, Oruro y Santa Cruz. ....	72
<b>Figura 24.</b> Árbol Filogenético de los pueblos indígenas Uru y Ayoreo, y pueblos del mundo.....	74
<b>Figura 25.</b> Proceso de Pirosecuenciación.....	77
<b>Figura 26.</b> Frecuencias de los polimorfismos de la Región HVI en las poblaciones Uru y Ayorea.....	80
<b>Figura 27.</b> Frecuencias de los polimorfismos de la Región HVII en las poblaciones Uru y Ayorea.....	80
<b>Figura 28.</b> Red de haplotipos de la región hipervariable I de los pueblos indígenas Uru y Ayoreo y otros pueblos del mundo.....	85
<b>Figura 29.</b> Posibles rutas migratorias de los pueblos indígenas originarios Uru y Ayoreo.....	87

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Principales diferencias entre genoma nuclear y mitocondrial. ....	34
<b>Tabla 2.</b> Designación de Haplotipos para cada población en estudio. ....	60
<b>Tabla 3.</b> Cantidad de muestras analizadas en el presente estudio. ....	62
<b>Tabla 4.</b> Muestras colectadas y concentración de ADN (ng/ul) obtenido. ....	64
<b>Tabla 5.</b> Frecuencias haplotípicas de las muestras analizadas en los pueblos Uru y Ayoreo. ....	68
<b>Tabla 6.</b> Designación de haplogrupos en las poblaciones Uru, Ayoreo y mestizas de La Paz, Oruro y Santa Cruz. ....	69

**DISTRIBUCIÓN DE HAPLOTIPOS DE LA REGIÓN HIPERVARIABLE  
MITOCONDRIAL DE LAS POBLACIONES INDÍGENAS ORIGINARIAS URU Y  
AYOREA DE BOLIVIA**

**RESUMEN**

Los eventos de migración hacia el continente americano ocurridos antes de nuestra era (30-40 mil años atrás), han permitido el desarrollo de distintas poblaciones humanas (indígenas), con características culturales propias, gracias a las cuales se las puede identificar por medio de investigaciones desarrolladas por la antropología, arqueología, lingüística, etnología, entre otras. En las últimas décadas se unió a estas investigaciones sobre la historia de la evolución humana, la genética en base, principalmente al estudio del ADN mitocondrial y el cromosoma Y generando nuevas hipótesis y cuestionamientos sobre la evolución y las migraciones humanas, ocurridas hace miles de años atrás.

Es así que en el presente trabajo se analizó los haplotipos mitocondriales de dos pueblos indígenas de Bolivia los Uru (Oruro) y Ayoreo (Santa Cruz), pues estas poblaciones en su historia mítica dicen ser las más antiguas del país. La obtención del ADN se realizó con el método modificado de Miller *et al.* (1981) y el Kit Wizard Genomic DNA Purification (PROMEGA), la amplificación y secuenciación de la región hipervariable se utilizó primers específicos, obteniendo de esta forma secuencias útiles y legibles para el análisis de los polimorfismos.

Los haplotipos de ambas poblaciones indígenas y poblaciones mestizas de La Paz, Oruro y Santa Cruz, se compararon con la Secuencia Revisada Cambridge y relacionándose también con otros pueblos indígenas del mundo y un ancestro africano y el homínido neandertal, utilizando como grupo externo la secuencia *Pan troglodyts* (chimpancé).

El análisis de la Región Hipervariable I y II, revelaron que los pueblos indígenas

originarios Uru y Ayoreo poseen polimorfismos distintos y únicos identificados como: URU1, URU2, URU3, URU4, AYO1 y AYOE, además están distribuidos en dos linajes mitocondriales distintos, donde la población indígena Uru pertenece al Haplogrupo B y la población indígena Ayorea pertenece al Haplogrupo C. Por otra parte, en las poblaciones mestizas La Paz, Oruro y Santa Cruz, presentaron 20 haplotipos compartidos y 10 haplotipos únicos y distintos, no existiendo haplotipos compartidos con los pueblos Uru y Ayoreo.

Además, en la comparación filogenética, el pueblo indígena Ayoreo presenta una relación estrecha con pueblos indígenas de Norte, Centro y Sudamérica, por el contrario, el pueblo indígena Uru muestra una estrecha relación con pueblos indígenas provenientes de la Polinesia, indicando de esta forma, distintas rutas migratorias, distintos linajes y conservación en la estructura genética de las poblaciones Uru a través del tiempo.

**Palabras Clave:** Pueblos Indígenas, Haplotipos, Rutas Migratorias, Filogenia, Linajes.

# **DISTRIBUTION OF HAPLOTYPES OF THE MITOCHONDRIAL HYPERVARIABLE REGION OF ORIGINATING INDIGENOUS POPULATIONS URU AND AYOREO OF BOLIVIA**

## **SUMMARY**

Migration events to the Americas occurred BC (30 – 40 thousand years ago) have allowed the development of different human populations (indigenous) with cultural characteristics, through which they can be identified by research by anthropology, archeology, linguistics, ethnology, among others. In recent decades is linked to this research on the history of human evolution, the genetic base, primarily the study of mitochondrial DNA and Y chromosome generating new hypotheses and questions about evolution and human migration that occurred thousands of years ago.

Thus, in this paper analyzed the mitochondrial haplotypes of two indigenous peoples of Bolivia, Uru (Oruro) and Ayoreo (Santa Cruz), as these populations as a mythical story say they are the oldest in the country. Obtaining DNA was performed with the modified method of Miller et al. (1981) and the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega), amplification and sequencing of the hypervariable region-specific primers was used, thereby obtaining useful and readable sequences for polymorphism analysis. The haplotypes of both indigenous and mestizo populations of La Paz, Oruro and Santa Cruz, were compared with the revised Cambridge sequence and also interacting with other indigenous peoples of the world and African ancestry and the Neanderthal hominid, using as outgroup the sequence *Pan troglodytes* (chimpanzee).

The analysis of the hypervariable region I and II, revealed that the original indigenous peoples and Ayoreo Uru have different and unique polymorphisms identified as: URU1, URU2, URU3, URU4, AYO1 and AYO2 and also are distributed in two different mitochondrial lineages, where Uru Indian population belongs to Haplogroup B and the population belong to Haplogroup Ayoreo C. Moreover, mixed populations in La Paz,

Oruro and Santa Cruz, shared haplotypes were 20 and 10 unique and distinct haplotypes, with no shared haplotypes and Ayoreo Uru people.

In addition, phylogenetic comparison, the indigenous people Ayoreo has a close relationship with indigenous peoples of North, Central and South America, by contrast, the Uru tribe shows a close relationship with indigenous peoples from Polynesia, thus indicating, different migration routes, different lineages and conservation in the genetic structure of populations over time Uru.

**Keywords:** Indigenous Peoples, haplotypes, Migration Routes, Phylogeny, Lineages.

**DISTRIBUCIÓN DE HAPLOTIPOS DE LA REGIÓN HIPERVARIABLE  
MITOCONDRIAL DE LAS POBLACIONES INDÍGENAS ORIGINARIAS URU Y  
AYOREA DE BOLIVIA**

**I. INTRODUCCIÓN**

La población mundial actual son resultado de alguna migración que empezó hace unos 30 a 40 mil años atrás. Donde la antropología, arqueología y otras ramas afines han podido fechar algunos asentamientos con el fin de conocer ciertos rasgos muy generales del patrón de la migración humana (Sutcliffe, 1998). Hoy en día, persiste la herencia de esta gran migración en su religión, cultura, tradiciones y también en la estructura genética de cada población, a pesar de la colonización de tierras lejanas, dejando así marcas en su registro genético que aún hoy son visibles, creando una imagen de cuándo y dónde se movieron los humanos antiguos en el mundo (National Geographic Society, 1996).

Las poblaciones indígenas originarias son aquéllas que habitaban un territorio antes de la llegada de los colonizadores y hasta hoy han mantenido sus características biológicas, su lengua vernácula y sus costumbres, a pesar de los eventos migratorios - conquista y relaciones socio-culturales que, en la actualidad, han generado una entremezcla racial, lo que conocemos como poblaciones mestizas o mixtas (CINU, 2000; Rondón *et al.*, 2008).

En Bolivia, se han reconocido 36 pueblos indígenas originarios, cada uno caracterizado por su diversidad cultural reflejada en sus tradiciones, costumbres y lengua (Fariñas, 2008). Entre estos, las naciones Uru (Tierras Altas) y Ayorea (Tierras Bajas), anuncian en su historia mítica ser los primeros pobladores de Bolivia, hecho que está apoyado principalmente por la antigüedad de sus caracteres lingüísticos (Badani, 2006; Gómez, 2009). La antigüedad de la familia lingüística “Puquina” propio de los Uru, ha sido corroborada y Saigens (1985) citado en Bert *et al.* (2004) determinó que los pueblos amazónicos de Bolivia presentan una continuidad cultural con este grupo lingüístico,

considerándose también antigua la familia lingüística “Zamuco”, que consta de dos lenguas, el Ayoreo, propio del llamado “ Pueblo Originario Ayoreo” y el chamacoco (Fabre, 2009). Estas poblaciones han sido protagonistas de publicaciones basadas en estudios antro-po-socio-culturales (Badani, 2006; Ministerio de Educación, 2008; Koop & Díez, 2009), documentándose pocos estudios en el marco de la antropología genética, una rama especializada de la genética que permite estudiar profundamente las relaciones entre poblaciones humanas y sus linajes a través de marcadores genéticos (Bert *et al.*, 2004; Dornelles *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2008).

Los marcadores genéticos, al ser hereditarios, se transmiten de generación en generación, formando una historia compleja que puede rastrearse atrás en el tiempo, mostrando información de la variabilidad de las poblaciones. Así, un marcador genético de gran importancia en el estudio de variabilidad e historia de las poblaciones humanas es el ADN mitocondrial que en los últimos años ha permitido agruparlas en un pequeño número de haplogrupos diferentes (Bailliet *et al.*, 1994; Fernández, 2000; Bert *et al.*, 2004; Álvarez, *et al.*, 2007), demostrando que cada población guarda una gran riqueza genética, identificando relaciones entre poblaciones geográficamente separadas (Coral *et al.*, 1995), rastreando y reconstruyendo la historia evolutiva de las poblaciones humanas ( Fernández, 2000; Izaguirre & De La Rúa., 2000).

En Bolivia, estudios del ADN mitocondrial realizados por Costa *et al.* (2008), sugieren que la población boliviana está compuesta por haplotipos únicos que se conservaron aún después de la colonización. En relación a las naciones Uru y Ayorea, Dornelles *et al.* (2004), encontró que en el grupo ayoreo de Pozo Verde – Santa Cruz se presenta un único haplotipo designado por AY01, sugiriendo un efecto fundador. Por otro lado, Sandoval *et al.* (2004), señala que entre los pobladores de las islas de Los Urus (Perú) existe una alta proporción del haplotipo A2, comúnmente encontrado en poblaciones amazónicas.

En este sentido y, de acuerdo a lo expuesto anteriormente, surge los siguientes cuestionamientos: ¿Los haplotipos mitocondriales de las poblaciones Indígenas

originarias Uru y Ayorea, son únicos y diferentes entre sí?, ¿Cuál es la relación filogenética entre los pueblos Indígena Originario Uru y Ayoreo con respecto a los pueblos indígenas del mundo?. La presente investigación pretende generar conocimiento científico genético de las poblaciones indígenas originarias Uru y Ayorea en base a la distribución de haplotipos de la región hipervariable del ADN mitocondrial de las mismas, lo que permitirá inferir sobre su llegada al continente americano y antigüedad, así como establecer las relaciones entre ellas y otras poblaciones del mundo, considerando sus orígenes mitológicos coincidentes, aportando de esta manera al conocimiento de la riqueza cultural de nuestro país, guardada en nuestro material genético y, coadyuvando a responder preguntas acerca del origen e historia (cultural y evolutiva) realizadas por los mismos pueblos.

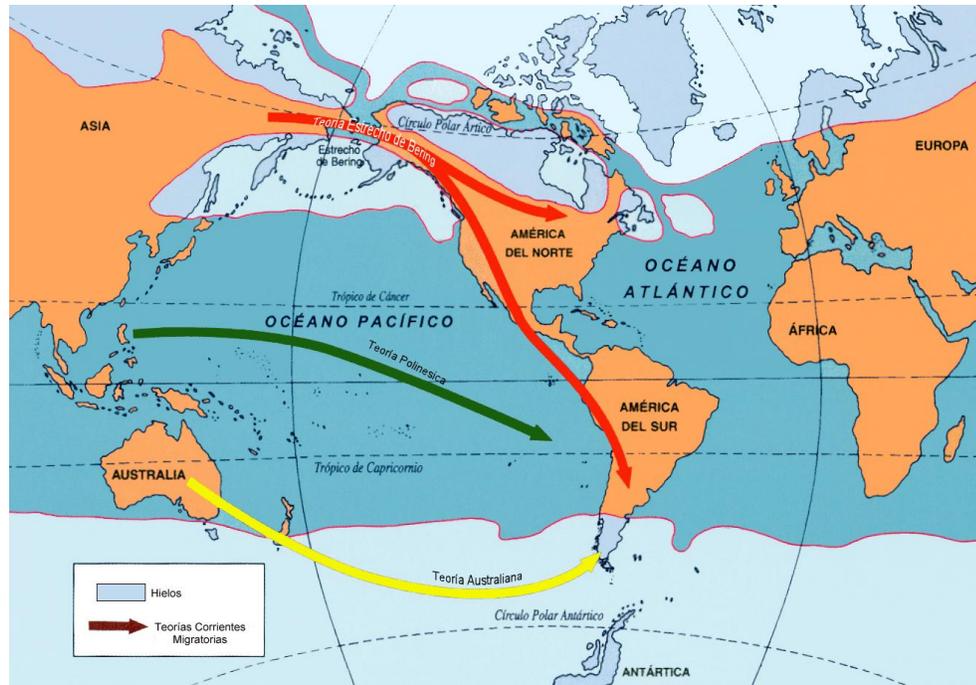
## **II. HISTORIA DE LAS POBLACIONES AMERICANAS**

El origen del hombre Americano y subsecuentemente de las poblaciones americanas, se remonta a unos 30 mil a 40 mil años, cuando los primeros hombres modernos (*Homo sapiens*) ingresaron al continente americano por el estrecho de Bering (Gisberth & Gisberth, 1998), en el período llamado **Pleistoceno**, caracterizado por la **Glaciación**.

Durante la Glaciación, el nivel de los mares descendió considerablemente, formando grandes bloques de hielo sobre Europa, Asia y Norteamérica, donde las bajas temperaturas modificaron el tamaño y el tipo de vegetación, lo que provocó grandes desplazamientos y la extinción de distintas especies de animales. Así, una de las teorías migratorias plantea que el hombre moderno aprovechó esta formación para trasladarse al continente Americano (Gómez & Méndez, 2003)

En contraste a esta ruta migratoria, otros investigadores mencionan que hubo otras rutas de penetración a América a través de Australia, Polinesia, Melanesia y Japón. *Los Australianos* habrían viajado de isla en isla (Tasmania, Islas Auckland, Campbell, Macquarie y Esmeralda), atravesando luego el casquete antártico y entrarían en Sudamérica por el sur del Cabo de Hornos. *Los melanesios y polinesios* habrían ingresado por vía oceánica, utilizando la enigmática isla de Pascua como escala para instalarse en las costas chilena, colombiana y californiana (Fig. 1). *Los Japoneses* migraron a través de la ruta Siberiana llegando hasta el continente americano por el Estrecho de Beiring (Freed & Freed, 1967; Gómez & Méndez, 2003; Frank, 2008)

Producto de las distintas rutas migratorias del Viejo mundo al Nuevo mundo y de las constantes migraciones de hombres hacia América, Freed & Freed (1967) postulan: “*los hombres modernos que migraron hacia el nuevo mundo tienden a separarse dentro de grupos organizados de individuos que llamamos sociedades, donde “cada sociedad tiene su propia cultura”*”. Así, posteriormente, como resultado del surgimiento de la agricultura, se produjo la formación de los primeros grupos humanos sedentarios, dando el inicio a las primeras civilizaciones americanas (Gómez & Méndez, 2003; Frank, 2008).



**Figura 1. Teorías del poblamiento americano**

Fuente: <http://cens30de8historiaygeografia2.blogspot.com/>

Por otro lado, también se ha postulado que estas civilizaciones se desarrollaron de forma absolutamente independiente, sin que existiera influencia de culturas del Viejo Mundo. Así, Grasso (1997) postuló que “*Hubo una sola civilización originaria en el mundo y que las poblaciones indígenas americanas son descendientes de ésta*”. Así, en el año 2000 a.C. ya se encontraban delimitadas áreas con su propia realidad socio- cultural, entre las que se destacan:

**Área mesoamericana o Mesoamérica.** Comprende la región de México, Guatemala, Honduras y parte de Nicaragua, donde se erigieron grandes y magníficos templos de forma piramidal y las primeras construcciones correspondían a la cultura Olmeca (Frank, 2008). – A este período corresponden también las culturas **Zapoteca, Maya, Teotihuacan, Tolteca y Azteca**, las cuáles compartieron diversas características comunes, siendo sociedades altamente desarrolladas, con intensa vida urbana y complejas relaciones que definían las esferas sociales y políticas y su particular carácter espiritual (Ortiz, & Orozpe, 1998).

**Área Andina.** Se extiende desde el sur de Colombia hasta Ecuador, Perú, Bolivia, Norte de Chile y Noroeste de Argentina (Frank, 2008). Una característica relevante de esta área, son las condiciones extremas: desiertos, manglares, selvas, añadiéndose a esto la altitud, la cual obligó a la adaptación física de las poblaciones humanas (Silva, 2006).

Se ha comprobado que los pueblos del área andina, desde miles de años atrás, ya poseían un sistema de escritura, con el cuál, plasmaban los hechos que se desarrollaban a su alrededor. Además, empezaron a ocupar grandes extensiones de terreno, avanzando hacia el sur, según los recursos que iban encontrando y las condiciones climáticas a las cuales se adaptaban, de manera que empezaron a diferenciarse rápidamente unos pueblos de otros, tanto en el ámbito tecnológico y científico como en el agrario (Lumbreras, 1999).

Silva (2006) y Araya (1995), mencionan que las civilizaciones más notables de esta área son los Mochicas en el Perú, que conformaron la más antigua expresión de una civilización basada en la agricultura, siguiéndoles los Tihuanacotas de una ciudad ubicada a 3842 metros de altura, en Bolivia. Posteriormente, se encuentran Los Incas, imperio que abarcaba 4500 km desde Ecuador, incluyendo parte de Perú y Bolivia hasta Chile (Alvear, 2004). El imperio inca, llegó a construir un perfecto sistema de organización social, económica y política, realizando grandes e importantes obras de ingeniería y construcción (carreteras, sistemas de riego y otros), alcanzando un alto grado de desarrollo cultural, siendo por tanto, considerados el imperio más próspero y organizado de la América precolombina (Alvear, 2004; Silva, 2006)

De esta manera, las poblaciones indígenas actuales están compuestas por descendientes de pueblos que anteriormente habitaron un determinado territorio y, que a pesar de la conquista, donde los redujeron hasta una situación colonial, mantuvieron sus costumbres y tradiciones (Morales, 2001)

### **III. PUEBLOS INDIGENAS ORIGINARIOS DE BOLIVIA**

En el año 2007, la constitución Política del Estado Boliviano, se declara “*ella misma Multiétnica y Pluricultural*” (art.1), *reconociendo los derechos de los pueblos indígenas, respeto de sus “Tierras comunitarias de origen”, personalidad jurídica y ejercicio de aplicación de normas* (art. 171). El último censo realizado en el año 2001, el país ha reconocido que existen 36 Pueblos Indígenas Originarios, donde el 62 % de la población total reconoce ser descendiente de alguno de estos (Molina, 2007).

Bolivia, generalmente es considerado como un país particularmente andino (altiplánico), pues predominan en su densidad poblacional los aymaras y quechuas. Sin embargo, geográficamente, dos tercios del territorio boliviano pertenecen al Oriente, Chaco y Amazonía, donde habitan 300.000 indígenas distribuidos en 33 pueblos diferenciados entre sí (López, 2005). Así, los 36 pueblos indígenas originarios se dividen en: Pueblos Indígenas de las Tierras Altas y Pueblos Indígenas de las Tierras Bajas.

Los Pueblos Indígenas de las Tierras Altas (Figura 2), son aquéllos que habitan la zona occidental o andina del país, e incluyen los Aymaras, Quechuas y los Urus. De estos 1470 habitantes son aymaras (23%), 2125 son quechuas (33%) y 1500 son Urus (0,02%). Los Aymaras, fueron estableciendo sus territorios en la región andina hace unos miles de años, adaptándose a las dificultades y condiciones del altiplano, desarrollando estrategias de subsistencia que los llevaron a ser caracterizados como pastores y agricultores. Los Quechuas, residen mayoritariamente en los valles de la geografía boliviana, según datos históricos, resultado de la ocupación Inca que habría impuesto su lengua y territorio. Los españoles, al entrar en contacto con estos pueblos, se propusieron cristianizarlos o “civilizarlos”, para lo cual utilizaron la lengua de las clases altas como primera “lengua general”. De esta manera, no sólo se preservó sino que se expandió su uso como medio de comunicación, siendo actualmente Quechuas y Aymaras considerados como parte de un mismo proceso de desarrollo andino expresado en dos lenguas (Ibarra, 2000; López, 2005; Fisher *et al.*, 2008).



Figura 2. Distribución de los pueblos de las Tierras Altas y Tierras Bajas de Bolivia.

Fuente: Modificado de <http://cens30de8historiaygeografia2.blogspot.com/>

Los Urus, por otro lado, son una sociedad netamente rural (aunque se registraron migraciones hacia localidades rurales Chilenas y urbanas), distribuida en tres subgrupos: Los Uru Chipaya, Uru Iru- Itu y los Uru del Lago Poopó. Este pueblo se caracteriza por su lealtad lingüística, donde el 95% de la población total habla el Uru –Chipaya (que descende de la lengua antigua de los Chullpas el “*Puquina*”) (Ibarra, 2000; López, 2005; Kopp & Díez, 2009).

En las tierras bajas (Figura 2) los Pueblos indígenas son 33, los cuáles se encuentran en los departamentos de Beni, Santa Cruz, Pando, Norte de La Paz y parte de los departamentos de Chuquisaca, y Tarija. Estos pueblos habitan los llanos y bosques húmedos de la cuenca amazónica, bosques secos del Chaco y alrededor de la cuenca del Río de la Plata. Son aproximadamente 300 mil habitantes que corresponden al 3% de la población nacional. Entre algunos de los problemas que enfrentan estos pueblos se

encuentran las migraciones hacia sus territorios de los mayoritarios pueblos Aymara y Quechua, los cuáles se han asentado en espacios de caza, recolección y agricultura. Algunos fueron utilizados como mano de obra forzada, otros fueron reducidos en asentamientos urbanos una vez que perdieron sus tierras, y otros confinados en las áreas marginales de los que fueron sus territorios ancestrales (Ibarra, 2000; López, 2005; Parellada, 2007).

### ***a. POBLACIÓN INDÍGENA ORIGINARIA URU***

#### **i. Ubicación geográfica**

Los Uru en Bolivia se dividen en 3 subpueblos denominados: Uru Chipaya, Uru del Poopó y Uru Iruhito (Figura 3), mientras que en Perú se encuentran los Uros Chulluni, que se denominan así mismos “Gente de Agua” y descendientes de los *Chullpas* (Cáceres, 2009).



**Figura 3. Pobladores Uru Chipaya.**

Fuente: Modificado de <http://cens30de8historyaygeografia2.blogspot.com/>

El Municipio Indígena Originario Uru Chipaya, es la Tercera Sección de la Provincia Sabaya (llamado anteriormente Atahuallpa), que está a 187 Km al sur – oeste de la ciudad de Oruro, conformado por cuatro Ayllus: al oeste el Ayllu Aransaya (“*lo de*

*arriba*” en aymara), al este el Ayllu Manasaya (“*lo de abajo*”), al extremo este el Ayllu Ayparavi y al sur el Ayllu Wistrullani (Cáceres, 2009; Kopp & Díez, 2009).

Los Uru del Poopó comprenden las comunidades de Llapallapani, Puñaca Tinta María y Villañeque, que se Ubican a lo largo de las orillas del lago Poopó en el Departamento de Oruro – Bolivia (Cáceres, 2009).

## ii. Origen mítico de la población originaria Uru

Según relatos de los propios pobladores Uru, su origen es de carácter pre-solar, es decir, que son descendientes de los Chullpas (Ibarra, 2000; López, 2005; Kopp & Díez, 2009).

Los antiguos Chullpas estaban acostumbrados a vivir en la oscuridad y la penumbra: al predecir la aparición de la luz del sol (*thuñi*) por el oeste, todos los pobladores decidieron construir la salida de sus viviendas orientadas hacia el este (Figura 4), con el propósito de poder protegerse de los rayos del sol y así poder adaptarse a la nueva era. Pero el sol salió por el este, extinguiendo a los habitantes de ese entonces. Sólo se salvó una pareja que sobrevivió sumergiéndose en las aguas de los lagos y ríos, y de quienes son descendientes los actuales Uru Chipaya (que se denominan así mismos en su lengua como *Qhas Qut Suñs Uru*) y que se consideran *chullpa pucho* (remanentes de los chullpas) (Ibarra, 2000; López, 2005; Kopp & Díez, 2009).



**Figura 4. Historia sobre el Origen Mítico de la población Uru.**

Fuente: <http://tierradevientos.blogspot.com/2010/10/los-chipaya.html>

### iii. Características socioculturales

La lengua originaria que los Uru Chipaya es el “uru chipaya” o según otros investigadores el “Puquina”, aunque también practican otros idiomas como el aymara, castellano y quechua, siendo los uru chipaya cuatrilingües (Ibarra, 2000; López, 2005; Kopp & Díez, 2009). En los Uru del Poopó, según Cáceres (2009), casi se ha perdido el uso de su lengua originaria, el “puquina”, donde, los pobladores practican en su mayoría las lenguas aymara, quechua y castellano. Un mismo panorama se encuentra en los Uru Irohito, donde solo las personas ancianas practican el “puquina”, pero ya los habitantes jóvenes, solo practican el Aymara y castellano (Cáceres, 2009).

Los Uru son politeistas, es decir tienen creencia en varios dioses que son el Agua, la lluvia, el fuego, el viento, el frío, personificados en “wakas” o sitios naturales. Los principales dioses son *Mallku Lauca* (divinidad de la vida, personificado en el Río Lauca) y la *Pachamama* (la madre tierra) (Ibarra, 2000; López, 2005; Kopp & Díez, 2009).

Los Uru Chipaya se singularizan con la morfología arquitectónica de sus viviendas, llamadas “*Phutucus*” y “*Huayllichus*” (Fig. 5), La vivienda como en ninguna otra cultura andina, tiene la forma de un cono con base de planta circular; esto para poder protegerse del clima frío del lugar (Ibarra, 2000; López, 2005; Kopp & Díez, 2009).



**Figura 5. Viviendas “Phutucus” “Huayllichus” del pueblo Uru.**

**Fuente:** <http://www.eldeber.com.bo/antiores/20040828/10.html>

Anecdóticamente, se dice que los aymaras observaron con recelo las viviendas de los chipayas y como estas estaban hechas de *Ch'ipas* de paja y barro los llamaron despectivamente “*Ch'ipayas*” (Ibarra, 2000; López, 2005; Kopp & Díez , 2009).

#### **iv. Historia de la población originaria Uru**

Condarco (1999), maniesfa distintas hipótesis sobre el origen de los URU: “*Unos les atribuyen origen trans- pacífico, queriendo encontrar sus raíces en la Polinesia. Otros, afincando sus hipótesis en referencias lingüísticas, les confieren procedencia Arawak, emparentándolos con la gran familia que se expandió desde las Antillas hasta el Paraguay: ocupando los contrafuertes orientales de los Andes, desde donde habrían ascendido a la meseta interandina; asentándose a los largo del eje fluvio- lacustre del altiplano. Sea como fuere, lo evidente es la gran antigüedad de esta peculiar cultura....*”

Otras investigaciones postulan que los Uru estarían relacionados con la cultura Chiripa, remontando su origen alrededor de mil años atrás. en el período arqueológico denominado “formativo”, caracterizado por las culturas Wankarani, Chiripa y Pucara. Aunque no existen vestigios arqueológicos de los Uru, pues ellos han dado fe que su hazienda natural era el agua y no la tierra o rocas, y por tanto no produjo cultura material propia imperecedera (Ibarra, 2000; López, 2005; Kopp & Díez, 2009).

Los Aymaras conquistaron las tierras donde antes vivían los Uru. Luego los Uru y Aymaras fueron sometidos por los Incas que hablaban quechua, pero estos no pudieron imponer su lengua entre los Kollas aymara – puquina, por lo que los investigadores se atreven a decir que, mas bien los incas hablaban el puquina o llamada también para ellos “Machhaj Juyay “*el idioma secreto de los incas*”. Los españoles en la colonia temprana consideraon la lengua Puquina como una de las *lenguas generales indígenas*, junto al aymara y el quechua (Ibarra, 2000; López, 2005; Kopp & Díez, 2009).

La más importante conclusión de varios investigadores es: “Los Uru constituyen la cultura más antigua del mundo andino que haya sobrevivido hasta ahora, ya que las investigaciones realizadas, demuestran que los Uru son un pueblo que está relacionado con las primeras culturas que habitaron el territorio Boliviano, y la única que existe hasta ahora (Cáceres, 2009; Kopp & Díez, 2009).

## ***b. POBLACIÓN INDIGENA ORIGINARIA AYOREA***

### **i. Ubicación geográfica**

La población Originaria Ayorea se encuentra esparcida por la provincia de Chiquitos: Yoquiday/ Poza Verde (municipio Pailón, diez kilómetros al sur de la estación Pailón), Santa Teresita (a unos quince kilómetros al sudoeste de Taperas y 35 kms. al sudeste de San José de Chiquitos, en el municipio San José, Tobité (a unos 25 kms. de la estación de ferrocarril El Portón de la línea Santa Cruz- Corumbá, en el municipio Roboré) (Ministerio de Educación, 2008; Fabre, 2009; Gómez, 2009; Choque, 2010). En la provincia de Ñuflo de Chavez: Zapocó, en el río Zapoco Norte, a unos 100 kms. al sudeste de Concepción y al sudoeste de San Ignacio de Velasco, en el municipio de Concepción. En la provincia Germán Busch, municipio Puerto Suárez en El Carmen (entre Puerto Suárez y Santiago de Chiquitos) son naturales de Rincón del Tigre, donde habita la mayor concentración **ayorea** de Bolivia (Ibarra, 2000; MINISTERIO DE EDUCACIÓN, 2008; Gómez, 2009; Rivero, 2010)

### **ii. Origen mítico de la población originaria Ayorea**

El pueblo Ayoreo, que en su lengua significa “gente verdadera”, según sus relatos mitológicos, fueron enviados por la divinidad sol para ser los habitantes del universo (Gómez, 2009), son un pueblo antiguo, según se puede demostrar por su sistema de contar originario que sólo alcanza hasta dos, repitiéndose para alcanzar unos pocos números más, por ejemplo el cinco, que no esta representado con una “mano” como nos enseñan de niños, sino dos-dos y uno (Ibarra, 2000; MINISTERIO DE EDUCACIÓN,

2008; Gómez, 2009; Rivero, 2010).

### iii. Características Socioculturales

La familia lingüística **zamuco** consta en la actualidad de dos lenguas, el **ayoreo** y el **chamacoco**, que corresponden a sendos grupos étnicos. Estos, y los otros idiomas extintos de la misma familia, fueron y/o siguen siendo hablados en el Chaco boreal, tanto en el Paraguay como en el sudeste de Bolivia (Mansilla, 2004; Ministerio de Educación, 2008; Fabre, 2009; Gómez, 2009; Choque, 2010), donde la primera mención del gentilicio **ayoré** aparece en 1955, para referirse a grupos ubicados al norte de San José de Chiquitos. La autodenominación varía en función del sexo y número del individuo: **ayoré** (femenino singular), **ayoréi** (masculino singular), **ayorédie** (femenino plural) **ayoréiode** (masculino plural) (Mansilla, 2004; Molina & y Albó, 2007; Ministerio de Educación. 2008; Gómez, 2009).

Los **ayoreo** se dividen en siete clanes patrilineares y exógamos. Estos nombres aparecen todos en el masculino singular: (1) **Etacori**, (2) **Picanerai**, (3) **Dosapei**, (4) **Jnurumini**, (5) **Chiquenoi**, (6) **Cutamurajai** y (7) **Posorajai** ) (Mansilla 2004; Ministerio de Educación, 2008; Gómez, 2009), esta división esta en relación paralela a su organización política, donde el nombre del clan sigue siendo el apellido (nombre de la familia) de todas y todos los miembros del pueblo Ayoreo (Ibarra, 2000; MINISTERIO DE EDUCACIÓN, 2008; Gómez, 2009; Rivero, 2010).

Los miembros de este pueblo originario son cazadores, recolectores y pescadores. Naturalmente muchos de sus clanes se han iniciado en la agricultura, por influencia de los pueblos vecinos (Ibarra, 2000; MINISTERIO DE EDUCACIÓN, 2008; Gómez, 2009; Rivero, 2010).



**Figura 6. Pueblo Indígena Ayoreo.**

**Fuente:** <http://www.apcob.org.bo/pagina.php?page=proyectos&cont=zapoco>

#### **iv. Historia de la población originaria Ayorea**

Su primer contacto con los españoles se remonta a 1537, cuando Juan Ayolas llegó al Chaco. Luego vinieron los encuentros sin paz con incursiones dirigidas por Ñuflo de Chávez (1546), Irala (1547) y otra vez Ñuflo de Chávez (1559). Desde 1691 hasta 1724 los jesuitas tenían una serie de contactos fuertes con la Ayoreos, quienes se negaron rotundamente a unirse a la misión. Fue en 1711 hasta 1724 cuando el padre Achá tuvo éxito en la reunión de varios clanes Zamuco para fundar la primera misión de ayoreo, San Ignacio de los Zamucos (1724-1745). Durante la guerra del Chaco, los Ayoreo, se vieron atrapados y tuvieron que abandonar sus tierras cuando los ejércitos rivales ocuparon sus fuentes de agua y sal, huyendo a las montañas y entrando en el dominio de los chiquitanos, quienes se las arreglaron para establecer un grado relativo de la convivencia (Ibarra, 2000; MINISTERIO DE EDUCACIÓN, 2008; Gómez, 2009; Rivero, 2010). No fue sino hasta los años 40 que un número de sacerdotes católicos recuperó el contacto con ellos. En 1950 fue fundada Rincón del Tigre y la Misión Sudamericana comenzó a trabajar con los ayoreos de Zapocó, así como en Santa Teresita a partir de 1957 (Ibarra, 2000; MINISTERIO DE EDUCACIÓN, 2008; Gómez,

2009; Rivero, 2010)

#### **IV. ESTUDIOS ANTROPOLOGICOS Y GENÉTICOS DE LOS PUEBLOS INDIGENAS**

La Antropología es el estudio de los seres humanos desde una perspectiva biológica, social y humanista, fundamentalmente es multicultural, donde los antropólogos consideran primordial realizar trabajos de campo y dan especial importancia a las experiencias de primera mano, participando en las actividades, costumbres y tradiciones de la sociedad a estudiar (Bohannan, 1996; Berdichewsky, 2002; Colomer, 2004)

Una de las ramas de la antropología tiene como objetivo reconstruir la línea evolutiva del hombre. En la década de 1960, los paleoantropólogos encontraron una serie de fósiles en la garganta de Olduvai, África oriental, desencadenando una revisión profunda de la evolución biológica de los seres humanos. Algunos utensilios de piedra sin tallar, hallados con ciertos fósiles de *Homo* en yacimientos del este de África, demuestran que hace casi 3 millones de años, estos ya eran capaces de fabricar herramientas. Todos los seres humanos actuales son *Homo sapiens sapiens* y descienden de los mismos orígenes universales y complejos (Bohannan, 1996; Berdichewsky, 2002; Colomer, 2004)

Posteriormente y, a medida que se fueron desarrollando técnicas para medir características físicas y biológicas en el hombre, como el color de la piel y los ojos, la textura del cabello, el tipo sanguíneo, la capacidad craneana y demás variables, la clasificación de las razas se hizo más compleja, ya que estos rasgos genéticos siempre han variado con la geografía, según la respuesta biológica de su adaptación al entorno. Los calificativos "asiático", "negro", "hispano" o "blanco" obedecen a definiciones sociales que conllevan una gran mezcla de características genéticas y culturales (Bohannan, 1996; Berdichewsky, 2002; Colomer, 2004).

Así, los antropólogos centraron su atención en los complejos patrones de la genética humana, estudiaron la interacción de las adaptaciones genéticas y las adaptaciones (no

genéticas) fisiológicas y culturales, en relación con la enfermedad, la desnutrición y la presión del entorno, así como las grandes altitudes y los climas calurosos. También han estudiado las diferencias (mutaciones) en el ácido desoxirribonucleico (ADN) de diferentes poblaciones humanas, utilizando patrones de similitud genética entre ellas, para inferir la historia demográfica: estructura de acoplamiento, la historia de la migración y la mezcla con los grupos circundantes (Bohannan, 1996; Berdichewsky, 2002; Colomer, 2004).

El genoma humano es la molécula que contiene el código genético, donde las mutaciones genéticas y la interacción del efecto fenotípico de estas mutaciones con el medio ambiente, son las fuerzas que guían la evolución, generando de esta forma la enorme diversidad de seres vivos que han existido en el pasado y en el presente (Bailliet et al. 1994; Coral, Salamanca & Buentello, 1995; Fernández, 2000; Klein & Shiffner, 2003; Biachi et al., 2003).

El genoma humano está constituido de dos genomas principales: el genoma nuclear que consta de 23 pares de cromosomas, 22 pares de cromosomas autosómicos y un par de cromosomas correspondientes a X y/o Y, que están localizados en el núcleo de la célula y un tipo de genoma circular localizado en las mitocondrias, llamado genoma mitocondrial (ADN mitocondrial); este tipo de ADN se encuentra en múltiples copias en comparación al genoma nuclear (Oliva & Vidal, 2006). Estos dos tipos de genomas constituyen piezas fundamentales de información individual, ya que en su estructura se encuentran los denominados “*marcadores genéticos*”, que son sitios característicos encontrados en el ADN entre dos individuos, los cuales son transmitidos de generación en generación y que pueden ser rastreados a través del tiempo (Moreno, 2011).

#### ***a. Marcadores genéticos en el estudio de poblaciones indígenas***

Desde principios del siglo XX, se han realizado los primeros estudios utilizando marcadores genéticos. Los llamados *marcadores genéticos clásicos*, abarcan un conjunto de marcadores que no son a base del ADN, estudiando mas bien su estructura compuesta

por aminoácidos y no por nucleótidos. Aquí encontramos el sistema ABO, Rh, MNSs, Duffy, HLA y haploglobulinas entre otros (Landsteiner, 1901 citado en Cavalli *et al.*, 1994). Estos marcadores han contribuido al conocimiento de los orígenes y afinidades de los distintos grupos indígenas de América, demostrando, cuando se han realizado con un arreglo suficientemente grande en su estructura, que los pueblos aborígenes de América se encuentran genéticamente relacionados con las poblaciones del noreste de Asia. Marcadores genéticos de origen asiático se encuentran en Norte América y Sur América, y los perfiles genéticos de las poblaciones de Sur América son más parecidos a los perfiles genéticos de Norte América (Szathmary, 1993). Además, permitieron realizar estudios en las poblaciones Yámanas y Machupes de Chile sugiriendo que estos tienen un origen paleoíndio (es la era más larga de la prehistoria americana donde los primeros pueblos asiáticos cruzaron por el estrecho de Beiring hace aproximadamente 40 000 hasta 10 000 años) (Rothhammer & Llop, 2004).

Los marcadores genéticos en base al ADN, muestran una mayor variabilidad entre pueblos geográficamente separados o no (Dornelles *et al.*, 2004; Rothhammer & Llop, 2004). Dentro de estos marcadores de ADN se encuentra el ADN mitocondrial (ADNmit), que es una herramienta útil, usada a menudo para la identificación individual, permitiendo establecer relaciones de parentesco materno entre individuos. Así, también es usado para determinar el origen de una población y las probables rutas de colonización que tomaron sus fundadores ancestrales (Torrioni *et al.*, 1993a; Torrioni *et al.*, 1993b; Coral *et al.*, 1995; Rothhammer & Llop, 2004; Alvares, 2008).

Wallace *et al.* (1985) estudiaron la filogenia del ADNmt en poblaciones indígenas americanas, mediante los polimorfismos en base a enzimas de restricción, donde compararon los patrones de restricción con los observados en poblaciones europeas, africanas y asiáticas, determinando un haplotipo característico de la población americana, el cual también se presenta en una proporción mucho menor en las poblaciones asiáticas. Además, estos polimorfismos no fueron detectados en otros continentes, concluyendo que las tribus amerindias poseen un pequeño número de linajes fundadores.

## V. EL ADN MITOCONDRIAL

### a. Origen de la Mitochondria

El origen de la mitocondria se ha descrito a través de la “*Teoría Endosimbionte*” (Fig. 7), donde una célula procariota fue fagocitada por otra célula eucariota, sin ser inmediatamente digerida, por lo que, se produjo una simbiosis entre ambos tipos de células (González-Sastre, 2003; Oliva & Vidal, 2006; Sheffler, 2008; Álvarez, 2008).

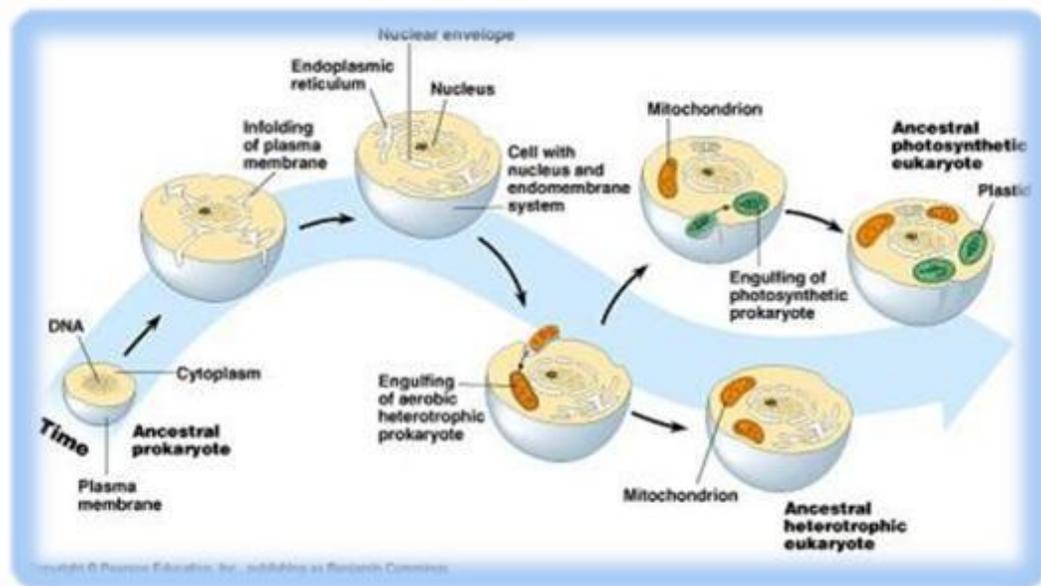


Figura 7. Teoría Endosimbionte de la mitocondria.

Fuente: <http://biologiamedica.blogspot.com/2011/09/la-teoria-endosimbiotica.html>

Las mitocondrias son organelos independientes, citoplasmáticos de las células eucariotas, con una función muy importante, la de realizar el proceso metabólico de la célula, produciendo de esta forma la mayor parte de energía que utiliza la célula. Estos organelos poseen su propio ADN, llamado ADN mitocondrial (González-Sastre, 2003; Sheffler, 2008; Álvarez, 2008).

### ***b. Organización genómica del ADN mitocondrial***

El ADN mitocondrial es un tipo de genoma eucariota que se encuentra dentro de la mitocondria, del que pueden existir miles de copias por célula. Su tamaño es de 16.569 bp, y es esencial por contener genes relacionados con el metabolismo oxidativo. Además de tener herencia no mendeliana, lo que lo hace distinto al genoma nuclear, en la tabla 1 se resumen las principales diferencias entre el genoma mitocondrial y el genoma nuclear (Oliva & Vidal, 2006; Álvarez, 2008).

**Tabla 1. Principales diferencias entre genoma nuclear y mitocondrial.**

	Genoma Nuclear	Genoma mitocondrial
Tamaño	3.000.000 Kb	16,5 Kb
Número de moléculas distintas	23 en las mujeres 24 en el hombre	1
Número de copias por célula diploide	2	> 1000
Tipo de DNA	Lineal	Circular
Presencia de nucleosomas	Si	No
Número de genes	35.000 aprox.	37
Densidad génica	1 gen cada 30-60 Kb	1 gen cada 0,45 Kb
DNA codificante	2%	95%
Presencia de intrones en los genes	Sí	No
Secuencias repetitivas	20%	<1%
Recombinación	>1 por cromosoma y meiosis	No
Herencia	Mendeliana (excepción Y)	Exclusivamente por vía materna

Fuente: Álvarez, 2011; Oliva & Vidal, 2006

Las dos cadenas del ADN mitocondrial tienen una proporción diferente de Citocinas y Guaninas, por tanto existe una cadena rica en bases púricas llamada cadena pesada o H (*heavy*), y la otra cadena es rica en bases pirimídicas llamada cadena liviana o L (*Light*), donde por convenio la numeración se realiza en la cadena L de 1 a 16569 (Bauer, 2004; Bandelt *et al.*, 2006; Álvarez, 2008; Koehler & Sheffler, 2008).

La información que lleva (genes) es muy compactada, se presentan uno a continuación

del otro sin intrones o tramos no codificantes, hasta incluso unos genes llegan a solaparse (Fig. 8). En total, son 37 genes que codifica el ADN mitocondrial, que representan el 90% del total de la molécula, en donde 28 genes son codificados por la cadena H y 9 por la cadena L. De los 37 genes, 22 codifican para ARNt, 2 para ARNr (12S y 16S) y 13 codifican para ARNs mensajeros (Bauer, 2004; Bandelt *et al.*, 2006; Álvarez, 2008; Koehler & Sheffler, 2008).

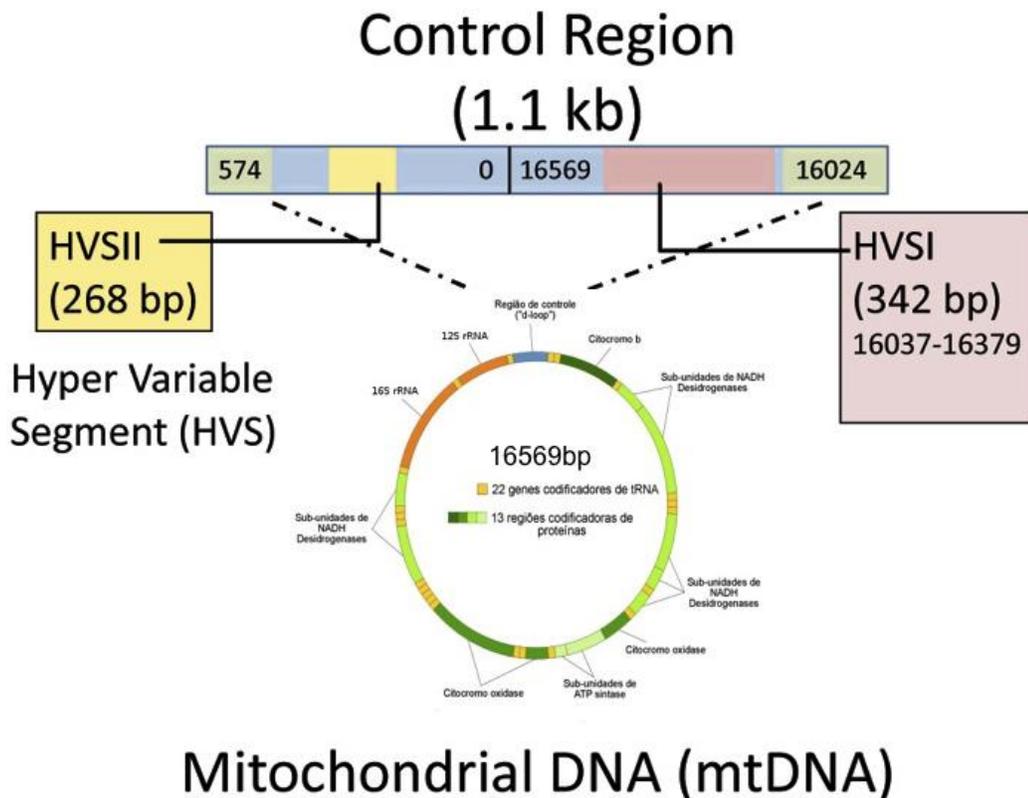


Figura 8. Estructura del ADN mitocondrial.

Fuente: Modificado <http://slab.lscore.ucla.edu/Mitochondria/HVSI.htm>

### *c. El ADN mitocondrial en el estudio de Poblaciones*

El ADN mitocondrial es una molécula menos compleja que el ADN nuclear (ver tabla 1) y constituye una herramienta útil para la reconstrucción del pasado reciente de las poblaciones humanas, gracias a diferentes características que posee, pues es una molécula poliplásmica, con una tasa de mutación más rápida que permite acumular

cambios en su secuencia que están dados únicamente por mutaciones, debido a la falta de recombinación, además de tener herencia únicamente materna (Wallace, 1999).

### **i. Poliplasmía**

Se designa así al elevado número de copias de ADNmt que existe en cada mitocondria y, por tanto en la célula. En el interior de la mitocondria, el ADN mitocondrial se encuentra unido a proteínas, formando un complejo denominado *nucleoide*. Una mitocondria puede contener entre 2 y 10 de estas estructuras, dando un total de copias de ADNmt por célula que oscila entre 100 y 10000. Esta característica es muy importante en casos en los que el material genético se encuentra degradado o en escasa cantidad (Fernández, 2000; Montiel, 2000; Pereira dos Santos, 2005; Solórzano, 2006; Álvarez, 2008; Sheffler, 2008).

### **ii. Herencia materna.**

El ADN mitocondrial humano se hereda de forma no mendeliana sólo por vía materna. Esto se debe a que cuando un espermatozoide fecunda un óvulo penetra el núcleo con su ADN pero deja afuera su cola y citoplasma, donde están las mitocondrias. Por lo tanto, en el desarrollo del cigoto sólo intervendrían las mitocondrias contenidas en el óvulo (Fernández, 2000; Montiel, 2000; Pereira dos Santos, 2005; Schwartz & Vissing, 2003; Solórzano, 2006; Álvarez, 2008; Sheffler, 2008). Sin embargo, Schwartz & Vissing (2003) describieron el primer caso de contribución paterna del ADNmt en un individuo con una miopatía mitocondrial. Posteriormente, varios investigadores han estudiado esta posibilidad en pacientes con enfermedades mitocondriales y no se ha encontrado ningún otro caso de contribución paterna (Filosto *et al.*, 2003; Taylor *et al.*, 2003; Schwartz y Vissing, 2004). Ese fenómeno puede ser explicado, de acuerdo a Sutovsky *et al.* (2000), quien lo estudió en algunos mamíferos, por una aparente destrucción selectiva de las mitocondrias paternas, gracias a la acción de la ubiquitina, tal que las mitocondrias

paternas pueden penetrar en el óvulo durante la fecundación, hecho que resulta en la sola presencia del ADNmt materno.

### **iii. Tasa de mutación.**

El ADNmt tiene una alta tasa de mutación (evolución) hasta 10 veces con respecto al ADN nuclear, esto causado por la falta de protección de las histonas, la ineficiencia de los sistemas de reparación y la continua exposición a los efectos mutagénicos de los radicales de oxígeno (Fernández, 2000; Singh *et al.* 2005; Terreros, 2010).

Esta característica, permite diferenciar entre muestras biológicas y determinar si provienen del mismo linaje materno (Terreros, 2010). La tasa de mutación depende de la velocidad a la que surgen y su fijación permite introducir una escala temporal en la evolución y así poder dilucidar el ancestro común más reciente entre dos linajes, es decir, estimar el tiempo de divergencia entre ellos ( Fernández, 2000; Singh *et al.* 2005; Álvarez, 2008; Singh *et al.* 2005; Terreros, 2010).

### **iv. Heteroplasmía**

La heteroplasmía es la presencia de dos tipos diferentes de ADN mitocondrial en una misma célula, hecho que puede producirse por:

- Error de la polimerasa (Pereira dos Santos, 2005; Álvarez, 2008).
- Carencia de mecanismos de reparación (cadena respiratoria) (Danielson *et al.*, 2007; Paneto *et al.*, 2007).
- Cuello de botella durante la oogénesis (Pereira dos Santos, 2005; Álvarez, 2008).
- Herencia paterna (Schwartz & Vissing, 2003)

La heteroplasmía es producida por distintos fenómenos, donde el más relevante está dado por el número de mutaciones y, en particular, por transiciones (T→C), que eliminan el nucleótido original, debido a la deriva génica (Santos *et al.*, 2008), presentándose un fragmento homopolimérico poli C de las regiones Hipervariables I y II. Además, este tipo de mutación puede llegar a fijarse dentro de la población, principalmente por el fenómeno de cuello de botella que ocurre en el oocito (Fig. 9).

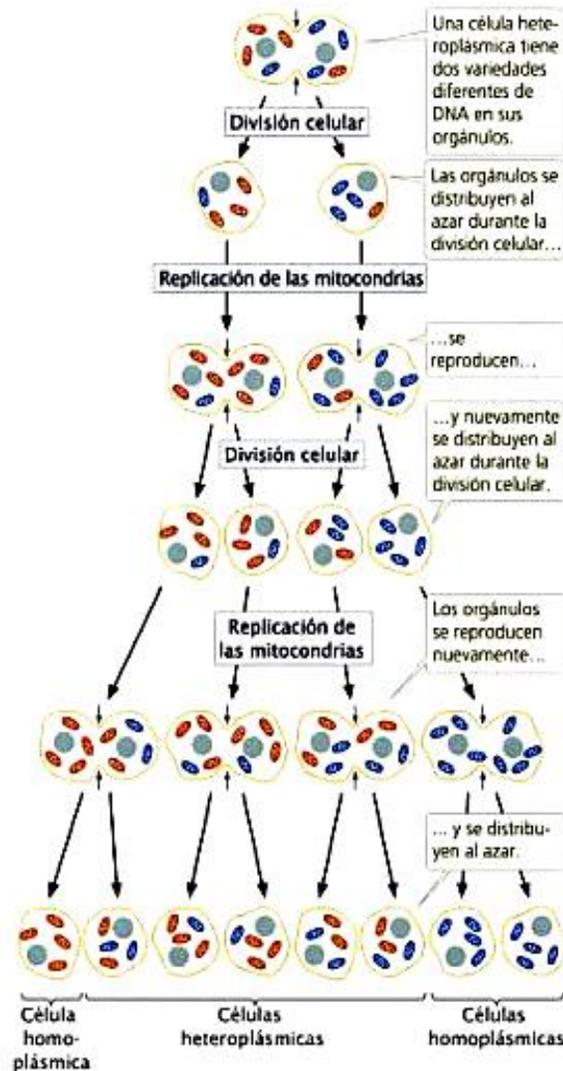


Figura 9. Heteroplasmía: Proceso de Cuello de Botella en el Oocito.

Fuente: Pierce, 2009.

La heteroplasmía se puede presentar en distintas formas, como ser:

- Un individuo puede presentar más de un tipo de ADNmt en un solo tejido.
- Un individuo puede tener un tipo de ADNmt en un tejido y otro tipo en otro tejido distinto.
- Un individuo puede poseer heteroplasmía en un tejido y ser homoplásmico en otro tipo de tejido (Álvarez, 2008).

## 1. Tipos de heteroplasmia

### a. Heteroplasmía puntual

Cuando se presenta en una sola base la sobre posición de dos picos distintos (Pereira dos Santos, 2005; Terreros, 2010).

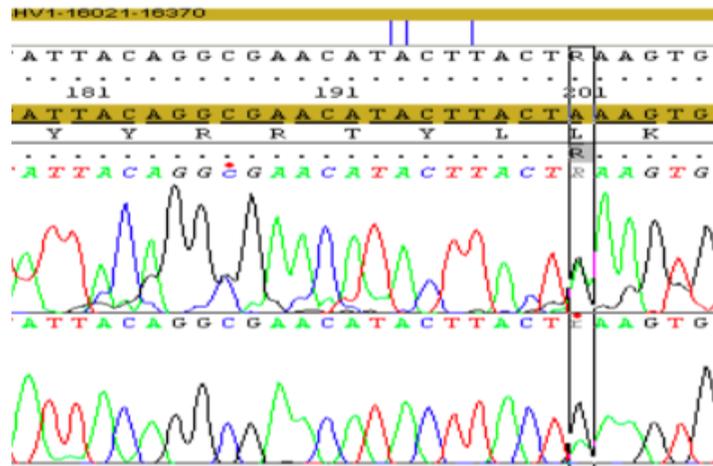


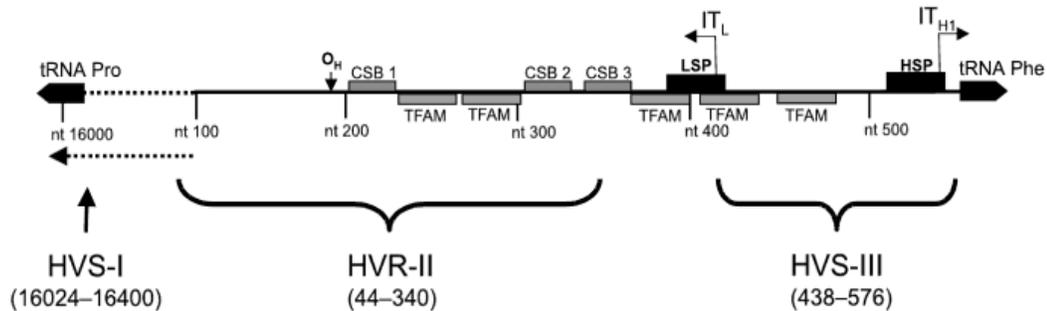
Figura 10. Ejemplo de Heteroplasmía puntual

Fuente: Terreros, 2010

### b. Heteroplasmía de longitud



2,CSB-3), que son parte de la replicación y las secuencias de cadena D-loop de terminación asociados (TAS) (Koehler & Bauer, 2004).



**Figura 12. Principales componentes de la Región Control del ADN mitocondrial**

Fuente: Koehler & Bauer, 2004

Además de los promotores en la región D-loop, existen dos pequeñas regiones conocidas como regiones hipervariable I (HVI) que abarca una longitud desde 16024 a 16365 nt y Región hipervariable II (HVII) que abarca desde 73 a la 340 nt en las cuáles, la tasa de mutación es especialmente alta, no existiendo evidencia de que las mutaciones se sitúen dentro de las regiones promotoras (región donde se inicia la replicación del ADNmt) (Koehler & Bauer, 2004; Crawford, 2007). Como resultado del alto contenido de mutaciones y, la falta de un código o secuencias reguladoras en las regiones hipervariables, éstas se han convertido en una fuente muy importante de variación genética humana (Crawford, 2007).

#### ***e. Técnicas de estudio de la región control en poblaciones humanas***

La presencia de dos o más variantes alélicas en un mismo locus se denomina polimorfismo. En el trabajo realizado por Terreros (2010), describe “*polimorfismo es la presencia, en una población, de dos o más formas alélicas discretas. En términos más sencillos, asume que un locus es polimórfico cuando el alelo más común para este, tiene una frecuencia inferior al 99%*”.

Existen polimorfismos, que se producen por variantes de centenares a millones de pares de bases de ADN (polimorfismos de longitud), debidas a deleciones, duplicaciones o triplicaciones, que se asocian o no con algún fenotipo conocido de enfermedad (Fernández *et al.*, 2002; Thompson *et al.*, 2004). Otros polimorfismos pueden deberse a cambios en una o unas pocas bases del ADN (polimorfismos de secuencia), localizado entre genes (que tienen consecuencias en el fenotipo del gen) o en los intrones, que no tienen consecuencias en el funcionamiento del gen y que sólo pueden detectarse por análisis directo del ADN, llamadas SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) (Fernández *et al.*, 2002; Thompson *et al.*, 2004).

- **Polimorfismos de longitud:** Este tipo de polimorfismo se estudia mediante el análisis de polimorfismos de restricción enzimática (“*Restriction Fragments Length Polymorphisms*” o “*RFLPs*”), aplicado generalmente en todo el genoma mitocondrial, donde las diferentes variantes mitocondriales o *haplotipos* se definen de acuerdo a la ausencia o presencia de “posiciones de restricción”, o lugares en los que se produce corte con ciertas endonucleasas o enzimas de restricción (Fernández, 2000; Álvarez, 2008; Terreros 2010).
- **Polimorfismos de secuencia:** producidos por el cambio de uno o más nucleótidos en una secuencia de ADN. A este tipo de polimorfismo se le denomina SNP (Single Nucleotide Polymorphism). Este es el tipo de variación más frecuente tanto en el ADN nuclear como en el ADN mitocondrial. La mayoría de estos polimorfismos se encuentran en regiones donde no alteran la función génica, y las transiciones son el tipo predominante de sustitución frente a las transversiones, Por otro lado, en poca frecuencia se presentan las deleciones o inserciones. Se han detectado posiciones que mutan mas frecuentemente que otras, denominadas puntos calientes de mutación o “hot spots”. En el ADN mitocondrial son 10 sitios que presentan frecuentemente mutaciones de

tipo transición: 16093, 16129, 16189, 16192, 16311, 16362, 146,150,152 y 195 (Fernández, 2000; Álvarez, 2008; Terreros 2010).

Por otro lado, en la región control del ADNmt existen trectos homopoliméricos de una o más bases nucleotídicas. Estos trectos están localizados en las posiciones 16184-16188, 16190- 16193, 303-309, 311-315 y 568-573 de la región control, donde con una frecuencia bastante elevada coexisten moléculas con diferente número de inserciones o deleciones dentro de una misma mitocondria o en mitocondrias distintas de la misma célula, situación que se conoce como **heteroplasmía de longitud**, tal como se menciona previamente (Fernández, 2000; Álvarez, 2008; Terreros 2010).

Este tipo de polimorfismo de secuencia, se lo estudia por dos métodos de secuenciación distintos: *secuenciación química* descrita por Maxam & Gilber (1977) y *secuenciación enzimática* de Sanger *et al.* (1977). Este último que es el más utilizado y está basado en el método dideoxy o enzimático, que requiere el uso de 2'-3'-dideoxynucleótido trifosfato (ddNTP), que difieren de los deoxynucleótidos, en la sustitución del grupo 3'-hidroxilo por un hidrógeno (Fig. 13).



Figura 13. Nucleótido en ausencia del grupo hidroxilo en su extremo 3' (ddNTP)

Fuente: Voet *et al.* (2007)

Esta técnica enzimática se apoya en la capacidad de la ADN polimerasa para sintetizar el ADN simple cadena con una terminación específica, generando fragmentos de ADN de todos los tamaños posibles que se puedan distinguir entre sí, realizando la síntesis de la hebra complementaria a partir de un iniciador en dirección 5' a 3'.

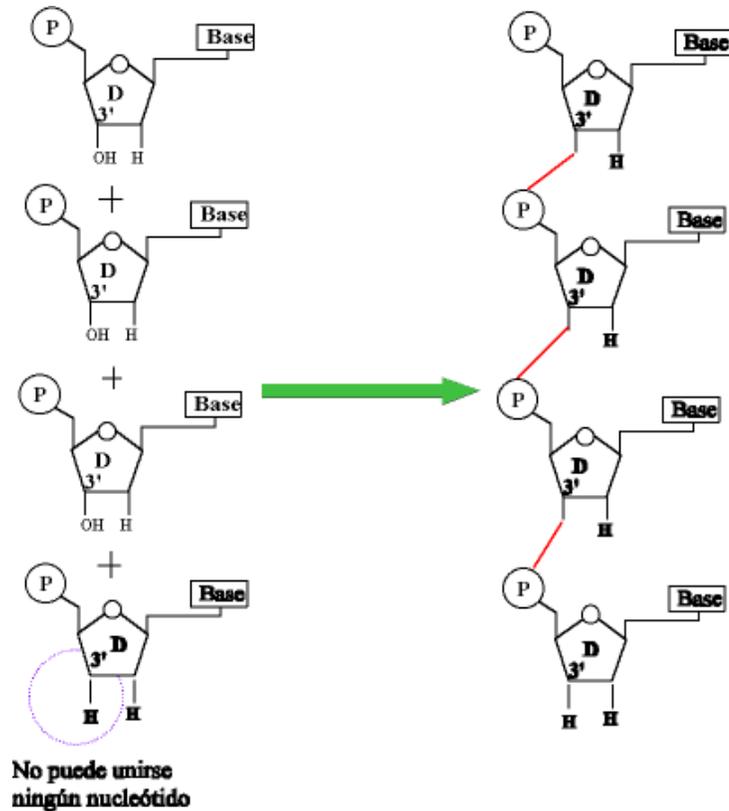


Figura 14. Técnica de terminación de cadena de Sanger

Fuente: Voet *et al.* (2007)

Así, se aísla y se amplifica la región del ADN que se desea secuenciar, este ADN se desnaturaliza y se emplea una sola hélice en la secuenciación. En cada uno de estos tubos se producirán cadenas de ADN de distintas longitudes, terminando todas en el lugar en el que se incorporó el dideoxi correspondiente (Fig. 14). Luego, los productos son revelados en geles de poliacrilamida y en la actualidad por procedimientos automatizados, donde los productos pueden combinarse con ddNTPs marcados con fluorescentes de distinto color (R6G verde: Adenina, ROX Azul: citosina, TAMRA Rojo: timina, R110 Amarillo: Guanina), el láser se dirige hacia el capilar donde se separan los nucleótidos (electroforesis capilar) que se excitan produciendo una señal fluorescente dependiente de cada nucleótido (Fig. 15). La secuencia es leída y registrada, visualizándose como picos alternantes de uno de los cuatro colores (nucleótidos) en su posición secuencial (Thompson *et al.*, 2004; Pierce, 2009).

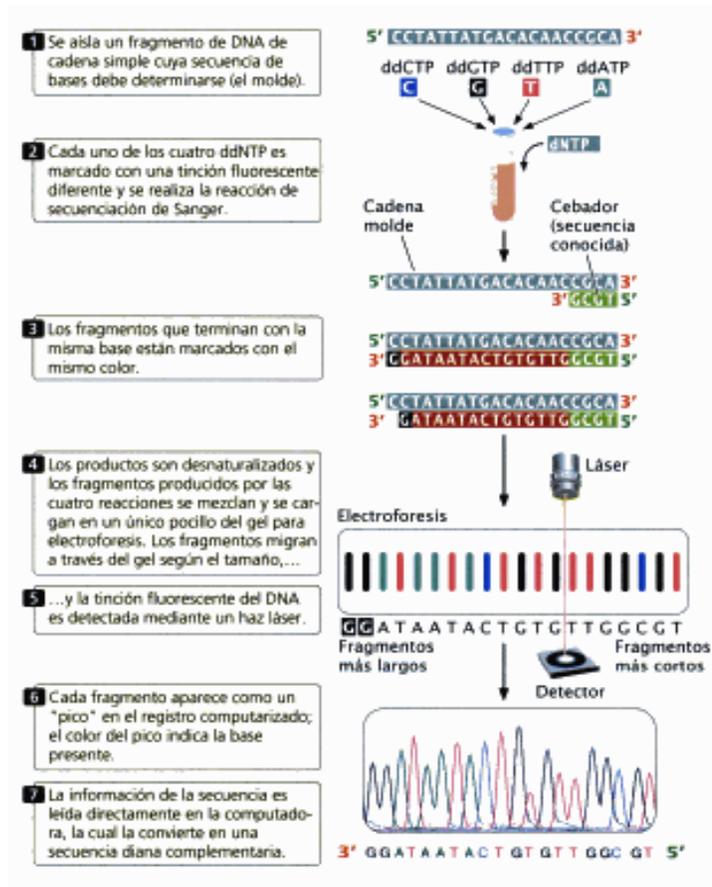


Figura 15. Detección por medio de técnicas Automatizadas.

Fuente: Thompson *et al.* (2004)

*f. Aplicaciones del estudio de la región control en poblaciones indígenas.*

Gracias a distintas investigaciones, sabemos que existe un alto grado de variación en la secuencia del ADNmt entre poblaciones geográficamente separadas (Wallace *et al.*, 1985; Schurr *et al.*, 1990; Torroni *et al.*, 1993a; Torroni *et al.*, 1993b; Dornelles *et al.*, 2004; Rothhammer & Llop, 2004 ). Muchas de estas variantes en la secuencia del ADNmt, inicialmente detectadas por polimorfismos en el tamaño de los fragmentos de restricción (RFLPs), se correlacionan con el origen étnico y geográfico de los individuos (Stoneking, *et al.*, 1990; Ward, *et al.*, 1991; Ballinger *et al.*, 1992; Torroni *et al.*, 1993a; Torroni *et al.*, 1993b; Starikovskaya *et al.*, 1998).

En diferentes estudios abarcados en distintas poblaciones indígenas de Norte, Centro y Sudamérica, se han determinado polimorfismos del ADNmt revelando la existencia de los cuatro linajes fundadores (haplogrupos A, B, C y D) en la población amerindia (Torroni *et al.*, 1993a; Horai *et al.*, 1993; Baillet *et al.*, 1994), donde la distribución de estos haplogrupos en nativos de Norte, Centro y Sur América muestran un incremento del linaje B de norte a sur, y un decremento en la frecuencia del linaje A de norte a sur. El haplogrupo A fue el linaje más común en Norte América, sin importar la población indígena. Como consecuencia de estas observaciones se plantea que la distribución de los haplogrupos es más afín con una simple oleada migratoria dentro del continente Americano.

Por otra parte, un estudio de polimorfismos del ADNmt en 83 individuos de la población de Yanomami de Venezuela, reveló la presencia de los linajes fundadores ya mencionados, afirmando que son tipos fundadores de las poblaciones indígenas de América (Easton *et al.*, 1996). Adicionalmente, Coral *et al.* (1995) describen el análisis de una población indígena de Perú, dos de Argentina y una de Chile, encontrando datos que también sugieren la presencia de otros linajes mitocondriales originales y proponen que esto puede deberse a un mayor número de oleadas migratorias o a la llegada de haplotipos fundadores en la primera.

Posteriormente, los estudios que se realizaron en la secuenciación de la región control del ADNmt, han reconocido que ésta evoluciona junto a la región codificante, iniciando trabajos en los cuales se combina la secuenciación de la región control con el análisis de RFLPs de dicha región, para así, definir mejor la filogenia en diferentes regiones y Macaulay *et al.* (1999) confirmó la relevancia para la determinación de haplogrupos (Pereira *et al.*, 2001; González *et al.*, 2003; McLean *et al.*, 2005; Picornell *et al.*, 2005).

En el año 2001, se publicó el primer trabajo con secuencias completas de 192 individuos fineses (Finnilä *et al.*, 2001), población que tiene un linaje de ADNmt claramente europeo, obteniendo dos *network* (o redes), uno de la región control y otro de la región codificante, mismos que representan la genealogía del ADNmt europeo.

Fagundes *et al.* (2008), utilizaron 86 genomas mitocondriales completos de nativos americanos, analizando los haplogrupos mitocondriales americanos, incluyendo el haplogrupo X, observando que estos formaban parte de una población fundadora única, refutando de esta forma varios modelos de migración. Una historia detallada demográfica de la secuencias de ADN mitocondrial estimada con un método de coalescencia, indica un modelo complejo para el poblamiento de las Américas y que la diferenciación inicial de las poblaciones asiáticas terminó con un moderado cuello de botella en Beringia, alrededor de ~23.000 a ~ 19.000 años atrás (Bonatto & Salzano, 1997).

En Bolivia, estudios del ADN mitocondrial realizados por Costa *et al.* (2008), sugieren que la población boliviana está compuesta por haplotipos únicos que se conservaron aún después de la colonización, observándose alta variabilidad genética en poblaciones de las regiones de Moxos y Beni que son el resultado de constantes migraciones. Además, los linajes filogenéticos del área de Beni no se reportaron en otras poblaciones amerindias de acuerdo a Bert *et al.* (2004). Por otro lado, en la zona de Piamonte en el departamento del Beni, se presentan altos niveles de variabilidad y diversidad genética en comparación con otros grupos americanos, estando más relacionadas con grupos humanos de los Andes que con poblaciones amazónicas (Corella *et al.* 2007).

En relación a las poblaciones indígenas Uru y Ayorea, Dornelles *et al.* (2004), encontró que en el grupo ayoreo de Poza Verde se presenta un único haplotipo designado por AY01, sugiriendo un efecto fundador; también se reportó la existencia de poca variabilidad genética. Por otro lado, Sandoval *et al.* (2004), señala que entre los pobladores de las islas de Los Urus existe una alta proporción del haplotipo A2, comúnmente encontrado en poblaciones amazónicas.

## **VI. NOMENCLATURA**

De acuerdo con las recomendaciones del “*European DNA profiling (EADNP) group*”

(Tully *et al.*, 2001; Tully *et al.*, 2004) la numeración que se utiliza para denominar las mutaciones puntuales, inserciones y deleciones de la región control hace referencia a la secuencia de referencia de Cambridge (Anderson *et al.*, 1981). Sin embargo, para denominar estos cambios en el resto de la molécula se recomienda utilizar como referencia la Secuencia de Cambridge revisada (rCRS) (Andrews *et al.*, 1999). Se considera siempre la secuencia de la cadena L y sólo se enumeran las bases que difieren respecto a la secuencia de referencia.

Para anotar un polimorfismo, se escribe la posición en que se encuentra seguida de la base mutada, por ejemplo la posición 16126 es una T en la secuencia de referencia, si se produce un cambio por una citosina se anotaría 16126C. Si se observa una deleción respecto a la secuencia de Anderson y colaboradores, se reporta la posición delecionada seguida de una “d”, por ejemplo 249d (Tully *et al.*, 2001; Tully *et al.*, 2004).

Las inserciones se designarán con un “.1” seguido de la base insertada, después de la posición que está inmediatamente al lado de la inserción en sentido 5’, por ejemplo en la posición 523 es frecuente la inserción de “CA” o incluso de “CACA”, en este caso se reportará 523.1C 523.2A 523.3C 523.4A. Cuando las inserciones ocurren dentro de tramos homopoliméricos se desconoce la localización exacta de la inserción, en estos casos se asume que la inserción ocurre en la posición más alta de ese tramo, por ejemplo una inserción en el tramo homopolimérico entre las posiciones 302 y 310 se anotará como 309.1C, en el caso de que ocurran dos inserciones se designarán 309.1C 309.2C (Tully *et al.*, 2001; Tully *et al.*, 2004).

Para describir una heteroplasmía puntual en la que dos bases están presentes en una intensidad aproximadamente igual se recomienda utilizar el código IUB (R=A+G, Y=C+T, K=G+T, M=A+C, S= G+C, W=A+T). Por ejemplo, si en la posición 152 aparecen una citosina y una timina se anotará como 152Y. Alternativamente, se puede designar como 152 T~C. Si una base está en una proporción substancialmente mayor que la otra se utilizará una notación del tipo C>T. Es importante señalar que siempre que se detecta una heteroplasmía es necesario confirmarla con la secuencia de la cadena

L y H, en el caso de que la heteroplasmía no pueda confirmarse con la segunda reacción de secuencia la posición se designará como ambigua “N” (Tully *et al.* 2001; Tully *et al.*, 2004).

En el caso de las heteroplasmías de longitud se utiliza un planteamiento similar al anterior para definir si la heteroplasmía está presente o no. Esto afecta particularmente a los trectos de policitosinas de HV1 (entre las posiciones 16183 y 16194) y HV2 (entre 302 y 315). Si el número de citosinas puede ser confirmado con la secuencia de las dos cadenas, la nomenclatura sería del tipo 309.1>309.2. Sin embargo, en el caso de que no sea posible la confirmación, el número de bases deberá ser reportado como ambiguo (Tully *et al.*, 2001; Tully *et al.*, 2004).

## **VII. ANÁLISIS DE DATOS**

### ***a. Haplogrupos Mitocondriales***

Los términos de haplogrupo y haplotipo, aparecen con definiciones solapadas. Peter de Knijff en Vereza (2011), define haplogrupo a los linajes definidos por regiones variables o polimórficas detectadas por SNPs, STRs o RFLPs, mientras que el término haplotipo se reserva para todos los sublinajes de haplogrupos y que se define como un conjunto de alelos localizados en una pequeña región del cromosoma, que se caracterizan porque sus alelos se transmiten juntos a través de las generaciones (Oliva *et al.*, 2004).

Por otro lado, se define haplogrupo a una agrupación de haplotipos que comparten ciertos polimorfismos (definidos por enzimas de restricción o por secuenciación directa) además presentan un origen común. Esto implica que los polimorfismos que definen cada haplogrupo se produjeron exclusivamente en las líneas antecesoras de todos los haplotipos que lo integran (Fernandez, 2000). El concepto de haplogrupo fue introducido por vez primera a inicios de los años 90 (Torrioni *et al.* 1992).

La aplicación de este tipo de estudios en muestras de diferentes continentes, por separado, reveló la existencia de localizaciones geográficas de los haplogrupos mitocondriales, de manera que podían distinguirse clusters exclusivamente africanos, europeos y asiáticos, respectivamente. Esta característica ha resultado ser de extrema utilidad para la inferencia de patrones migratorios dentro y fuera de cada continente (Fernandez, 2000; Montiel, 2000; Pereira dos Santos, 2005).



Figura 16. Distribución de los Haplogrupos por continente en base al ADN mitocondrial

Fuente: Fernandez, 2000; Montiel, 2000; Pereira dos Santos, 2005

### ***b. Median Networks (Redes de Haplotipos)***

Los *Median Networks* o *Median Joining Networks*, en español, *Redes de Haplotipos*, pueden orientar acerca de la historia demográfica de una población determinada. Por ejemplo, las filogenias en forma de estrella, con un haplotipo central del que surgen varios haplotipos separados de éste por un único paso mutacional, son signos de una expansión poblacional. Este patrón puede explicarse de la siguiente manera: una determinada variante mitocondrial experimenta condiciones reproductivas favorables durante un largo período de tiempo y aumenta la frecuencia (Saitou, & Nei, 1987;

Fernandez, 2000; Montiel, 2000; Pereira dos Santos, 2005). Tras muchas generaciones, algunos de los descendientes portadores de este haplotipo adquieren nuevas mutaciones. En algunos casos, la variante ancestral se extingue por deriva genética. Si alguno de los descendientes sufre el mismo proceso que la variante inicial, en la filogenia en forma de estrella aparecen subgrupos o sub-clusters (Forster, 2004).

### *c. Diversidad Génica*

Es el equivalente a la heterocigocidad esperada para datos diploides. Se define como la probabilidad de que dos haplotipos escogidos aleatoriamente sean diferentes en la muestra (Nei, 1987 descrito en Piñero *et al.*, 2008).

$$(h=n(1-\sum x_i^2)/n-1).$$

donde:

n= número total de la población.

X<sub>i</sub>= número de haplotipos encontrados.

### *d. Distancia Genética: Modelos de Sustitución*

Durante la traducción, cada codón corresponde a un tipo de aminoácido, en el que se encuentran tres posiciones: primera, segunda y tercera, correspondientes a las tres bases que lo integran. Cada una de estas posiciones se ve afectada por distintas tasas de mutación, por lo que ni la mutación ni la selección son uniformes en cada uno de los codones (Fernández, 2000; Eguiarte *et al.*, 2007). De esta manera, existen diferentes medidas de distancia genética entre poblaciones basadas en modelos matemáticos de sustitución de nucleótidos. Los modelos de sustitución nos sirven para interpolar adecuadamente nuestras observaciones, con el fin de poder hacer predicciones inteligentes sobre observaciones futuras. Así, existen distintos modelos de sustitución, siendo el modelo de Tamura y Nei, el más utilizado hasta fecha. Este modelo estima el número esperado de sustituciones por sitio nucleotídico, coadyuvando a la

determinación de la distancia genética y a la fiabilidad del árbol filogenético que se establece (Tamura & Nei, 1993; Posada y Crandall, 2001). Esto es, que pretende estimar el número de mutaciones que ocurren a nivel nucleotídico y que se han acumulado en las secuencias de dos linajes a partir del tiempo que ha transcurrido desde su divergencia original (Piñero *et al.*, 2008).

$$D = \frac{d_{ij} - (d_{ii} + d_{jj})/2}{2}$$

$D_{ij}$  = distancia entre las poblaciones i y j.

$D_{ii}$  = distancia de la población ii.

$D_{jj}$  = distancia de la población jj.

El modelo de Tamura & Nei (1993) toma en cuenta índices y frecuencias nucleotídicas, asumiendo igualdad en la sustitución a nivel de transversiones y transiciones, parámetros que favorecen la precisión y dan lugar a un árbol filogenético más cercano a la realidad, dando incluso, las bases para el estudio del reloj molecular (Tamura & Nei, 1993; Kumar & Nei, 2000).

#### ***e. Modelos de Agrupación: Neighbor joining***

Los modelos de inferencia se emplean a través de un algoritmo estándar de construcción de árboles, examinando diferentes topologías posibles, las cuáles resultan en un árbol que representa las mínimas divergencias posibles (es decir, se basan en la máxima parsimonia) (Saitou & Nei, 1987).

El árbol completamente resuelto se forma a partir de un árbol ‘estrella’ (completamente no resuelto) por el procedimiento de insertar ramas entre el par de vecinos más cercanos (o más aislados de los demás) y el resto de los nodos terminales del árbol (Saitou, & Nei, 1987). El par de vecinos más cercanos queda entonces consolidado, dando por resultado un nuevo árbol ‘estrella’, repitiéndose el proceso hasta obtener un árbol resuelto

(Fernández, 2000; Eguiarte *et al.*, 2007;). Así, este método minimiza la distancia entre grupos al tomar la distancia al vecino con el que presenta mayor similitud. Los algoritmos y fórmulas que emplea lo hacen útil al momento de hallar la mínima diferencia, por tanto es uno de los programas más empleados debido a su alta confiabilidad (Saitou & Nei, 1987).

La elección del modelo de agrupación es de suma importancia, ya que de estos depende la construcción de los dendogramas y, por ende, la interpretación de los resultados obtenidos.

### ***f. Evolución***

En términos simples, se define evolución a cualquier proceso de cambio en el tiempo. Por otro lado, es un cambio en el perfil genético de una población de individuos, a consecuencia de la contribución diferencial de distintos individuos de una especie a la generación siguiente, que puede llevar a la aparición de nuevas especies, a la adaptación a distintos ambientes o a la aparición de novedades evolutivas (Fernández *et al.*, 2002; Passarge, 2007; Pierce, 2009).

En el proceso de evolución, la principal fuerza de mutación genética es la selección natural, que proporciona la diversidad biológica dentro de una población y determina la viabilidad de los individuos para sobrevivir con éxito en un entorno determinado (Fernández *et al.*, 2002; Passarge, 2007; Pierce, 2009).

### ***g. Filogenética***

Es el estudio de la filogenia utilizando diagramas tipo árbol para representar los ancestros de esos organismos, donde Filogenia, es la determinación de la historia evolutiva de los organismos, basándose en datos moleculares, bien en secuencias aminoacídicas de proteínas o nucleotídicas a partir de ADN (Fernández *et al.*, 2002; Passarge, 2007; Pierce, 2009).

Las relaciones filogenéticas entre un grupo de organismos pueden representarse gráficamente mediante árboles filogenéticos que consisten en nodos (unidades taxonómicas) conectados por ramas. Para poder distinguir entre un carácter ancestral y uno derivado es necesario que este tipo de árbol tenga una raíz de la que salen las diferentes ramas o “outgroups” (grupos externos) (Fernandez, 2000; Montiel, 2000; Fernández *et al.*, 2002; Passarge, 2007; Pierce, 2009).

Existen diferentes procedimientos para la reconstrucción filogenética, pero el más utilizado es el de “máxima parsimonia” o de “evolución mínima”, mostrando que la evolución ocurre parsimoniosamente de manera que los cambios nucleotídicos en todas las posiciones son igualmente probables y que la reconstrucción filogenética asume la explicación más sencilla de esta información, eligiendo así, el árbol filogenético construido con menor número de eventos mutacionales para explicar la distribución de los caracteres entre los individuos ( (Fernandez, 2000; Montiel, 2000; Fernández *et al.*, 2002; Passarge, 2007; Álvarez, 2008; Pierce, 2009)

## **VIII. JUSTIFICACIÓN**

En el ámbito de la genética de poblaciones, el genoma mitocondrial se utiliza para investigar la evolución del hombre y de los pueblos indígenas existentes en todo el mundo, considerándose al genoma mitocondrial como el marcador por excelencia, desde hace más de dos décadas teniendo un interés especial por conocer los patrones de variabilidad que presenta, que en general, reflejan el pasado demográfico de la población.

En este sentido, la presente investigación pretende analizar los haplotipos de la región hipervariable mitocodrial de las poblaciones indígenas originarias Uru y Ayorea, por ser considerados poblaciones más antiguas del país (corroborado por la familia lingüística a la que pertenecen), además que han mantenido su aislamiento tanto poblacional como geográfico. Por otro lado, no se tiene estudios a nivel genético de la población Uru y la

Población Ayorea si bien ha participado de estudios genéticos, esto no ha sido concluyente para conocer si sus haplotipos están relacionados con otras poblaciones bolivianas o mundiales. Así la presente investigación aportará con conocimientos científicos sobre la estructura genética y ancestralidad de las poblaciones indígenas originarias Uru y Ayorea, lo que permitirá inferir sobre su llegada al continente americano, así como establecer las relaciones entre ellas y otras poblaciones del mundo, considerando sus orígenes mitológicos coincidentes, aportando de esta manera al conocimiento de la riqueza cultural de nuestro país guardada en nuestro material genético y coadyuvando a responder preguntas acerca del origen e historia (cultural y evolutiva) realizadas por los mismos pueblos.

## **IX. HIPOTESIS**

**H1o:** Existen haplotipos ADNmt únicos y diferentes entre sí en las poblaciones Indígenas Originarias Uru y Ayorea.

**H2o:** Filogenéticamente, los pueblos Indígenas Uru y Ayoreo conforman un clado emparentado con los linajes ancestrales de la humanidad.

## **X. OBJETIVOS**

### ***a. OBJETIVO GENERAL***

- Identificar la distribución y relación filogenética de haplotipos de la región hipervariable mitocondrial en las poblaciones indígenas originarias Uru y Ayorea.

### ***b. OBJETIVOS ESPECIFICOS***

- Caracterizar los haplotipos de las poblaciones Uru, Ayorea y mestizos de Bolivia en base a la región HVI y HVII del ADN mitocondrial.

- Comparar los haplotipos encontrados entre los pueblos indígenas y mestizos (aquellos que tengan ascendencia extranjera y al mismo tiempo Boliviana) de La Paz, Oruro y Santa Cruz y poblaciones indígenas a nivel mundial.
- Establecer los haplogrupos de ADNmt a los que pertenecen las poblaciones Uru, Ayorea y mestizos de La Paz, Oruro y Santa Cruz.
- Identificar la población en estudio relacionada a los linajes mitocondriales más antiguos de la humanidad.

## **XI. DISEÑO METODOLOGICO**

### ***a. Poblaciones de Estudio***

Constituido por individuos de ambos sexos mayores de edad no emparentados y pertenecientes a las Naciones Indígenas Originarias Uru del Departamento de Oruro y Ayorea del Departamento de Santa Cruz – Bolivia y habitantes mestizos de los departamentos de La Paz, Oruro y Santa Cruz.

### ***b. Sitio de estudio***

La población originaria Uru está ubicada en el Departamento de Oruro - Provincia Atahuallpa a 280 kilómetros al suroeste de la Capital, considerándose para el presente estudio la comunidad del Lago Poopó: Llapallapani (19°00'37,8"S - 66°49'12,2"O) y la Chipaya de Santa Ana de Chipaya (19°02'31.3"S – 68°05'23,6"O) (Figura 16) (MUSEF, 2009), mismas que se encuentran a aproximadamente 8 horas por vía carretera desde la ciudad de La Paz.



Figura 17. Mapa de las zonas de estudio. Las principales capitales del país están representadas con el símbolo , mientras que las zonas de muestreo presentan el símbolo , encontrándose el nombre respectivo a la comunidad encuadrado (Mapa elaborado con el programa MAP SOURCE, GARMIN).

La población indígena Ayorea está ubicada en varias comunidades en el departamento de Santa Cruz (Zapocó, Poza Verde, Puesto Paz, Guidai Ichai, Santa Teresita, Tobité, Urucú, Motacú, Rincón del Tigre, Belén en Santiago de Chiquitos). En la presente investigación se estudió la población de Zapocó donde, parte de sus habitantes se encuentran asentados en Concepción de Chiquitos ( $16^{\circ}08'12,1''S - 62^{\circ}01'47,3''O$ ), y otra parte de su población se encuentra en la comunidad que lleva el mismo nombre Zapocó, la cual se encuentra ubicada a 3 horas de viaje desde la región de Concepción de Chiquitos. El acceso a esta zona es por vía carretera desde la ciudad de La Paz, considerando que el viaje carretero desde la ciudad de Santa Cruz de la Sierra hasta Concepción de Chiquitos es de aproximadamente 6 horas. Luego la población de Poza Verde que se encuentra al Sur de la ciudad de Santa Cruz, aproximadamente a 2 horas por vía terrestre y a media hora del municipio El Pailón – Santa Cruz ( $16^{\circ}08'12,1''S - 62^{\circ}01'47,3''O$ ) (Figura 17).

### ***c. Toma de Muestra***

Antes de la obtención de la muestra se concertó una reunión con toda la comunidad, donde se procedió a explicar las finalidades de la investigación en base al Documento “Consentimiento Informado”, haciendo énfasis en la participación voluntaria de cada individuo. Este documento (Anexo 1), contenía además preguntas sobre la ascendencia del participante, de manera que pudiéramos comprobar sus relaciones de parentesco.

La muestra consistió de un hisopado bucal colectado mediante un raspado (por un lapso de 20 – 30 segundos) en la mejilla interna del participante, considerando la obtención de una réplica (una muestra por mejilla). El hisopo de algodón utilizado fue colocado en un tubo hermético conteniendo 700 uL de buffer de lisis (Nuclei Lysis Solution – kit Wizard Genomic DNA Purification - PROMEGA) y almacenado a temperatura ambiente hasta su procesamiento en laboratorio. La identificación de la muestra se realizó utilizando un código que da referencia al lugar y número del participante, asegurando la confidencialidad.

### ***d. Análisis Genéticos***

#### **i. Obtención y Cuantificación de ADN total**

Se obtuvo ADN total a partir de las muestras recolectadas, mediante el protocolo modificado de Miller *et al.* (1988), utilizando el kit Wizard Genomic DNA Purification (PROMEGA), que está basado en la utilización de Nuclei Lysis Solution y Protein Precipitation Solution con un lavado posterior de NaCl 6M y su purificación respectiva con soluciones alcohólicas (Anexo 2).

La calidad del ADN fue evaluada en electroforesis en gel de agarosa 1% a 100 voltios durante 30 minutos, comparando con un control positivo de ADN total (control de ADN con una concentración de 100ng/uL obtenido por protocolos estandarizados en el CINGEN) y un marcador de peso molecular Lambda ADN/HindIII.

La cuantificación de los ácidos nucleicos se realizó por absorción espectrofotométrica a 260nm donde la absorción de ácidos nucleicos es máxima si la muestra de ADN es pura y se realizó la lectura a 280 nm el cual es el rango de absorción máxima para proteínas, con el fin de evaluar la pureza del ADN obtenido con la relación de OD 260 / OD 280 (Mendoza *et al.*, 2010), en un espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop 2000, a partir de 1 uL del extracto, utilizando como blanco la solución de rehidratación (Tris HCL y EDTA).

## ii. Análisis por PCR y Secuenciación

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se desarrolló en las condiciones adecuadas (Fig. 18) para la obtención de un fragmento de 440 bp (HVI) y 400 bp (HVII) de la región hipervariable, utilizando los cebadores L15997 y H16391 para HVI (Costa *et al.*, 2008) y para la región HVII L48 y H 408 (Costa *et al.*, 2008). El producto de PCR se evaluó en electroforesis en gel de agarosa al 1,8% a 100 voltios durante 15 minutos.

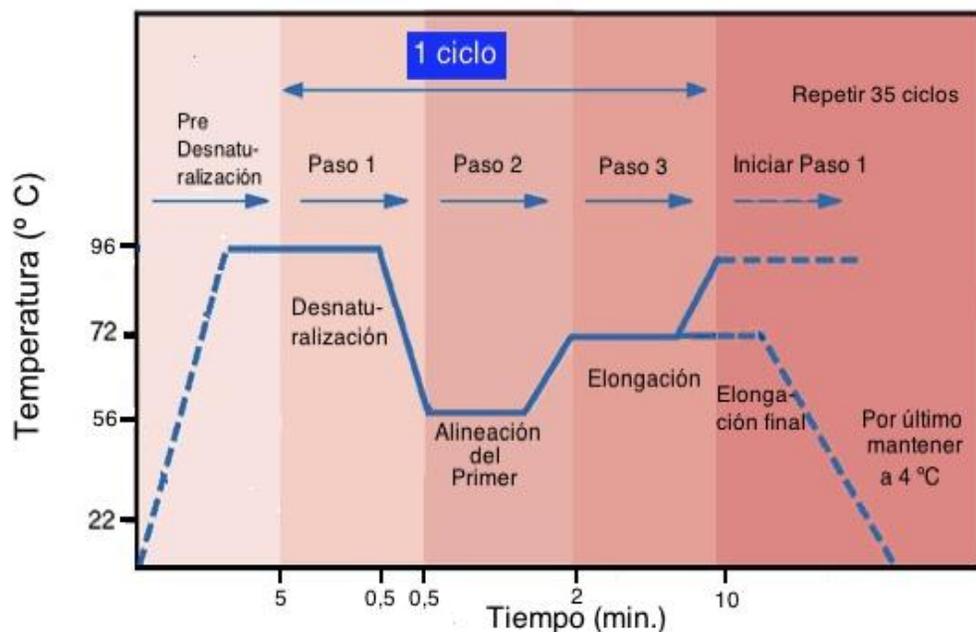


Figura 18. Condiciones de PCR.

Fuente: Elaboración Propia

El producto obtenido se purificó con soluciones alcohólicas (Etanol absoluto e Isopropanol), para luego realizar la electroforesis capilar en el Analizador Genético ABI 3130 con el kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing v. 3.1, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Anexo 3), evaluando la calidad de la secuencia obtenida con el software Sequencig Analisis versión 5.2.

*e. Análisis de Datos*

**i. Análisis Comparativo de las Regiones Polimórficas**

Posteriormente se identificó los sitios polimórficos (SNPs) utilizando el programa Biological Sequence Alignment Editor, *Bioedit v.7.0.5*

El alineamiento de secuencias se realizó en relación con la secuencia revisada de Cambridge (Anderson *et al.*, 1981; Andrews *et al.*, 1999), que se encuentra disponible *online* en la base de datos NIH Genetic Sequence Database (GenBank-<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

La identificación de los Haplotipos se realizó de acuerdo a los polimorfismos mitocondriales, al mismo tiempo, la frecuencia haplotípica se determinó por conteo directo y la designación de Haplogrupos se realizó de acuerdo con el MITOMAP.

La designación de los haplotipos se realizó de la siguiente manera:

**Tabla 2. Designación de Haplotipos para cada población en estudio.**

HAPLOTIPO	POBLACIÓN	DESIGNACIÓN
URU	URU	En el Presente Estudio
AYO	AYOREO	Dornelles <i>et al.</i> (2004)
LP	LA PAZ	En el Presente Estudio
OR	ORURO	En el Presente Estudio

**Fuente:** Elaboración propia

### **i. Análisis filogenéticos y evolución**

Los árboles filogenéticos se construyeron utilizando el programa MEGA v.4.1 (Tamura *et al.*, 2007) y las redes de haplotipos (networks) con el programa TCS v1.21 (Clement., 2000), ambos basados en el método Neighbor-joining (Bootstrap 1000) (Bandelt *et al.*, 1995) siguiendo el modelo de sustitución de Tamura & Nei (1993).

## **XII. CRITERIOS ÉTICOS**

En las visitas realizadas a las poblaciones Indígenas Originarias, se concertó una reunión con las autoridades de cada comunidad para explicar los objetivos del proyecto y luego de obtener su aprobación de forma verbal se procedió a realizar la toma de muestra respectiva.

El presente estudio se tomó en cuenta aquellos individuos de ambos sexos, mayores de edad que participaron voluntariamente, además que firmaron el documento de Consentimiento Informado (Anexo 1).

No se incluyó en el estudio aquellos individuos que no firmaron el Documento Consentimiento Informado y aquellos que eran menores de edad.

### XIII. RESULTADOS

#### a. *Tamaño de la Muestra*

Se obtuvo 53 muestras de hisopado bucal por duplicado de individuos de ambos sexos mayores de edad no emparentados en primer grado, pertenecientes a los pueblos Uru (comunidades Llapallapani y Santa Ana de Chipaya) y Ayoreo (comunidades Poza Verde y Zapocó) y 30 muestras control de individuos mayores de edad mestizos no emparentados de las ciudades de La Paz, Oruro y Santa Cruz (Tabla 3).

**Tabla 3. Cantidad de muestras analizadas en el presente estudio.**

Nº	Código	Comunidad	Cantidad de Muestra	Procedencia
1	CHPA	Uru Chipaya	8	*CINGEN
2	LLPA	Urus de Lago Poopó	6	CINGEN
3	CON	Asentamiento Ayoreo en Concepción de Chiquitos	5	**PROY. FILOGEOGRAFIA URU- AYOREO
4	ZCO	Zamoco	17	PROY. FILOGEOGRAFIA URU- AYOREO
5	PZV	Pozo Verde	17	PROY. FILOGEOGRAFIA URU- AYOREO
6	LP	La Paz	10	CINGEN
7	OR	Oruro	10	CINGEN
8	SC	Santa Cruz	10	CINGEN
TOTAL			83	

**Fuente:** Elaboración propia

\*Centro de Investigación Genética- IITCUP- Policía Boliviana

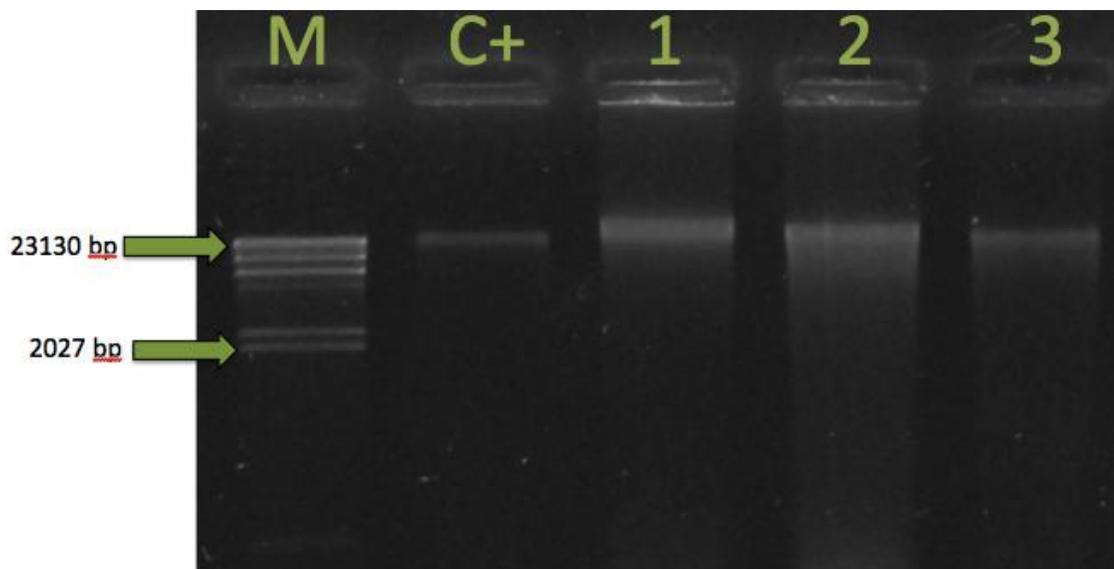
\*\* Proyecto Concursable ASDI- TB/BCR- UMSA

El cálculo de tamaño muestral no se realizó ya que la cantidad de habitantes de cada población Uru y Ayoreo es reducida, además dentro de estas poblaciones existe

consanguinidad entre sus habitantes, razón por la cual se tomó encuesta un participante voluntario por grupo familiar. En cuanto a las poblaciones de La Paz, Oruro y Santa Cruz, fueron productos de ADN que están en custodia del Centro de Investigación Genética del Instituto de Investigaciones Técnico Científicas de la Universidad Policial (IITCUP).

***b. Cuantificación y Calidad del ADN total***

El método de Miller *et al.* (1988) modificado empleando el Kit Wizard Genomic DNA Purification (PROMEGA), es eficiente y eficaz en la obtención de extractos de ADN en calidad y cantidad suficiente para los ensayos subsecuentes (Fig. 19). Los extractos de las ochenta y tres muestras presentan una concentración de ADN total entre 25 – 200 ng/ul (Tabla 4).



**Figura 19. Corrida electroforética en gel de agarosa al 1% de extractos de ADN total, pertenecientes a la Población Indígena Ayorea revelados con bromuro de etidio. M: Marcador de peso Lambda ADN/HindIII, C+: Control Positivo de ADN, 1: ZCO-1, 2: ZCO-2, 3: ZCO-3.**

**Tabla 4. Muestras colectadas y concentración de ADN (ng/ul) obtenido.**

N°	CÓDIGO*	COMUNIDAD	ADN (ng/ul)	N°	CÓDIGO*	COMUNIDAD	ADN (ng/ul)
1	CHPA-1	Santa Ana de Chipaya	106,5	43	PZV-7	Poza Verde	N.D.
2	CHPA-2	Santa Ana de Chipaya	177,6	44	PZV-8	Poza Verde	N.D.
3	CHPA-3	Santa Ana de Chipaya	158,7	45	PZV-9	Poza Verde	N.D.
4	CHPA-4	Santa Ana de Chipaya	301,1	46	PZV-11	Poza Verde	N.D.
5	CHPA-5	Santa Ana de Chipaya	48,2	47	PZV-A	Poza Verde	N.D.
6	CHPA-6	Santa Ana de Chipaya	346,3	48	PZV-B	Poza Verde	N.D.
7	CHPA-7	Santa Ana de Chipaya	37,6	49	PZV-C	Poza Verde	N.D.
8	CHPA-8	Santa Ana de Chipaya	63,9	50	PZV-D	Poza Verde	N.D.
9	LLPA-1	Llapallapani	57,28	51	PZV-E	Poza Verde	N.D.
10	LLPA2	Llapallapani	175,68	52	PZV-F	Poza Verde	N.D.
11	LLPA-3	Llapallapani	21,44	53	PZV-G	Poza Verde	N.D.
12	LLPA-4	Llapallapani	25,12	54	LP-1	La Paz	N.D.
13	LLPA-5	Llapallapani	110,72	55	LP-2	La Paz	N.D.
14	LLPA-6	Llapallapani	133,6	56	LP-3	La Paz	N.D.
15	CON-1	Zapocó	71,8	57	LP-4	La Paz	N.D.
16	CON-2	Zapocó	42,8	58	LP-5	La Paz	N.D.
17	CON-3	Zapocó	49,5	59	LP-6	La Paz	N.D.
18	CON-4	Zapocó	77,1	60	LP-7	La Paz	N.D.
19	CON-5	Zapocó	49,5	61	LP-8	La Paz	N.D.
20	ZCO-1	Zapocó	N.D.	62	LP-9	La Paz	N.D.
21	ZCO-2	Zapocó	N.D.	63	LP-10	La Paz	N.D.

22	ZCO-3	Zapocó	N.D.	64	OR-1	Oruro	N.D.
23	ZCO-4	Zapocó	N.D.	65	OR-2	Oruro	N.D.
24	ZCO-5	Zapocó	N.D.	66	OR-3	Oruro	N.D.
25	ZCO-6	Zapocó	N.D.	67	OR-4	Oruro	N.D.
26	ZCO-7	Zapocó	N.D.	68	OR-5	Oruro	N.D.
27	ZCO-8	Zapocó	N.D.	69	OR-6	Oruro	N.D.
28	ZCO-9	Zapocó	N.D.	70	OR-7	Oruro	N.D.
29	ZCO-11	Zapocó	N.D.	71	OR-8	Oruro	N.D.
30	ZCO-A	Zapocó	N.D.	72	OR-9	Oruro	N.D.
31	ZCO-B	Zapocó	N.D.	73	OR-10	Oruro	N.D.
32	ZCO-C	Zapocó	N.D.	74	SC-1	Santa Cruz	N.D.
33	ZCO-D	Zapocó	N.D.	75	SC-2	Santa Cruz	N.D.
34	ZCO-E	Zapocó	N.D.	76	SC-3	Santa Cruz	N.D.
35	ZCO-F	Zapocó	N.D.	77	SC-4	Santa Cruz	N.D.
36	ZCO-G	Zapocó	N.D.	78	SC-5	Santa Cruz	N.D.
37	PZV-1	Poza Verde	N.D.	79	SC-6	Santa Cruz	N.D.
38	PZV-2	Poza Verde	N.D.	80	SC-7	Santa Cruz	N.D.
39	PZV-3	Poza Verde	N.D.	81	SC-8	Santa Cruz	N.D.
40	PZV-4	Poza Verde	N.D.	82	SC-9	Santa Cruz	N.D.
41	PZV-5	Poza Verde	N.D.	83	SC-10	Santa Cruz	N.D.
42	PZV-6	Poza Verde	**N.D.				

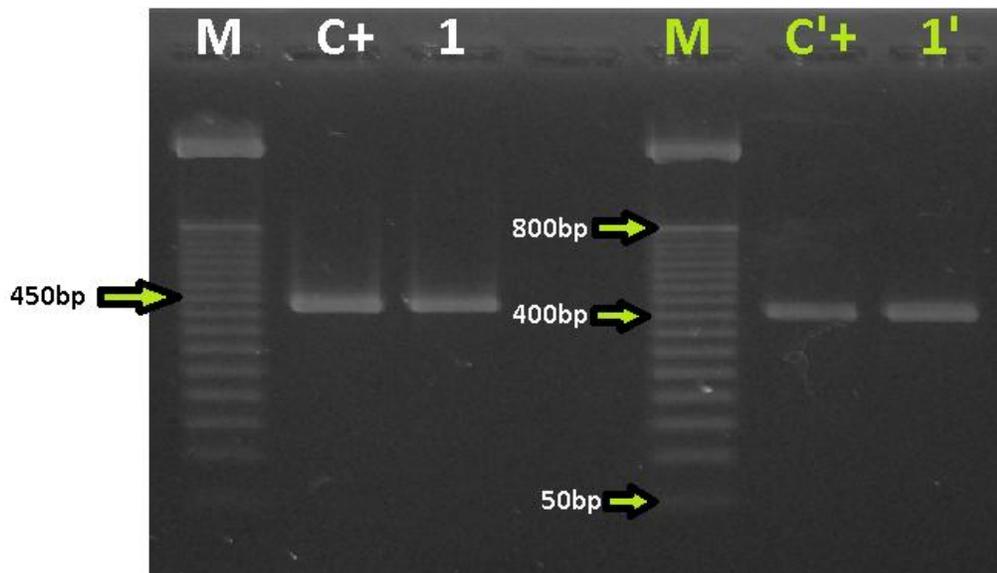
**Código\*:** Hace referencia al lugar y número de participante

**\*\* No Determinado**

**(Fuente:** Elaboración propia)

*c. Amplificación de la Región Hipervariable (HVI y HVII) del ADN mitocondrial*

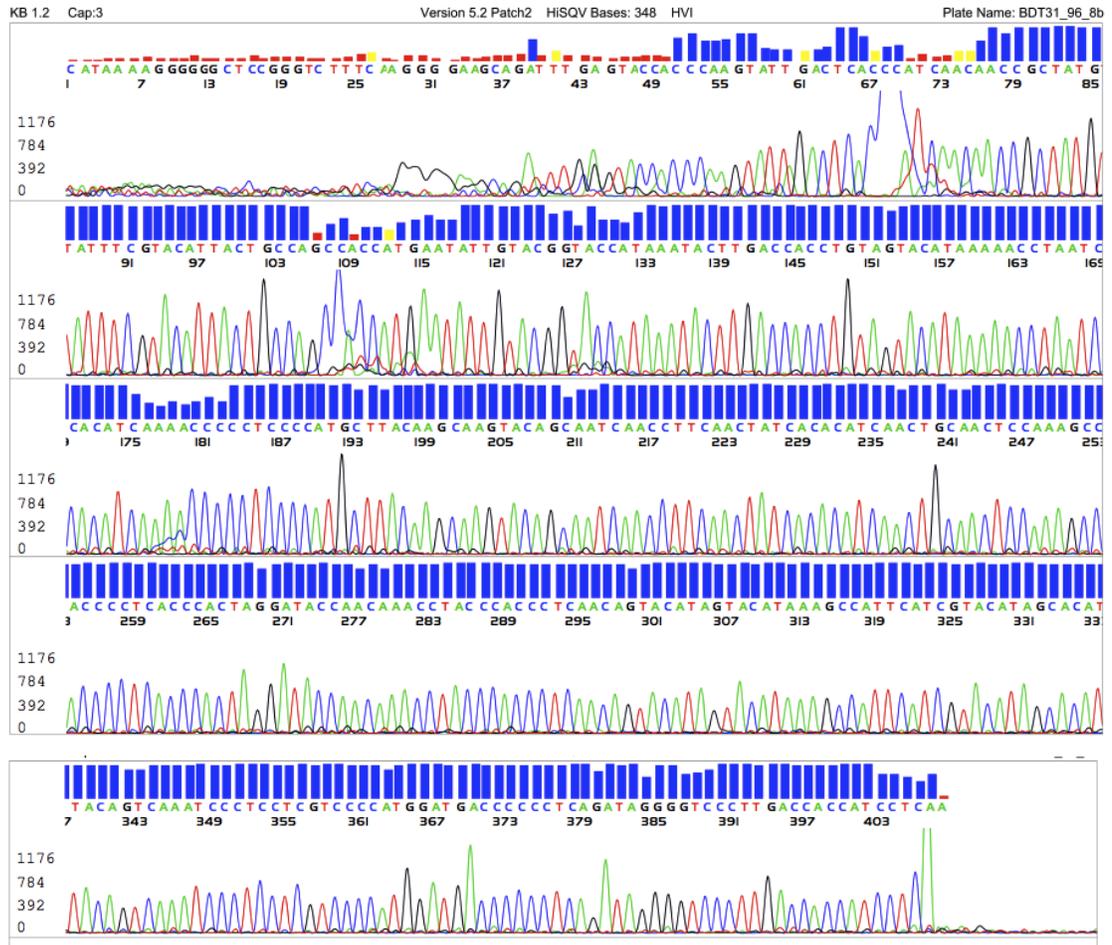
Fragmentos de 440 bp y 400 bp se identifican respectivamente para las regiones HVI y HVII, mostrando calidad y cantidad necesaria (20 ng) y suficiente para los subsecuentes análisis (Fig. 20).



**Figura 20.** Corrida electroforética en gel de agarosa al 1,2% de productos de PCR de la Región Hipervariable I y II, revelados con bromuro de etidio. M: Marcador de Peso Molecular; C+: Control Positivo de PCR HVI; 1: Muestra ZCO1; C'+: Control; Positivo de PCR HVII; 1': Muestra ZCO1.

*d. Análisis de Secuencias*

Las secuencias obtenidas (Fig. 21) presentan una longitud total de 407 bp, con un valor de calidad óptimo (las barras de color azul indican picos de óptima calidad, los amarillos calidad media y los rojos baja calidad), indicando que son susceptibles de análisis e interpretación.



**Figura 21. Electroferograma de la región hipervariable HVI de la muestra CHPY-1 obtenida por electroforesis capilar utilizando el software Sequencing Analysis v. 5.1. Las barras azules indican picos de alta calidad, los amarillos media calidad y los rojos baja calidad.**

En este sentido, las frecuencias haplotípicas de los pueblos Uru y Ayoreo se muestran en la Tabla 5, identificándose en el pueblo Ayoreo los sitios polimórficos 16027T, 16051G, 16169T, 16223T, 16298C, 16325A, 16327A, 16357C, 76C, 77C, 78T, 207A, 249G, 290C, 292C, 309.1C, 317.1C como los más frecuentes y los sitios 16028C, 16083A, 16103C, 16172G, 16183G, 16188A, 16217C, 16334C, 80T, 92A, 215G, 241G, 264T, 318C, con menor frecuencia. En el pueblo indígena Uru, los sitios polimórficos más frecuentes son: 16027T, 16183G, 16188A, 16217C, 309.1C, 315.1C, 315.2C, mientras que los menos frecuentes son: 16051G, 16114A, 16172G, 16182C, 16189A, 16223T, 16275G, 16298C, 16325A, 16327A, 16357C, 16373G, 118T, 152C, 207A, 215G, 276G, 277G, 296T, 320T, 326C.

**Tabla 5. Frecuencias haplotípicas de las muestras analizadas en los pueblos Uru y Ayoreo.**

<b>Sitio</b>	<b>Frecuencia Ayoreo</b>	<b>Frecuencia Uru</b>	<b>Sitio</b>	<b>Frecuencia Ayoreo</b>	<b>Frecuencia Uru</b>
<b>16027</b>	0,4103		<b>92</b>	0,0256	
<b>16028</b>	0,0513		<b>103</b>		0,1429
<b>16051</b>	0,9744	0,0769	<b>118</b>		0,0714
<b>16083</b>	0,0513		<b>119</b>		0,1429
<b>16085</b>	0,0256		<b>125</b>	0,0256	
<b>16090</b>	0,0256		<b>128</b>	0,0256	
<b>16103</b>	0,0769		<b>131</b>	0,0513	
<b>16108</b>	0,0256		<b>133</b>	0,1026	
<b>16114</b>		0,0769	<b>139</b>		0,1429
<b>16126</b>	0,0256		<b>146</b>		0,2143
<b>16169</b>	0,9487		<b>151</b>		0,1429
<b>16172</b>	0,0513	0,0769	<b>152</b>		0,0714
<b>16173</b>	0,0513		<b>167</b>	0,0513	
<b>16182</b>		0,0769	<b>195</b>		0,1429
<b>16183</b>	0,0769	0,9231	<b>207</b>	0,9231	0,0714
<b>16188</b>	0,0256	0,6154	<b>215</b>	0,0256	0,0714
<b>16189</b>	0,0256	0,0769	<b>216</b>	0,0256	
<b>16217</b>	0,0256	0,9231	<b>218</b>	0,0256	
<b>16223</b>	0,9744	0,0769	<b>221</b>	0,0256	
<b>16275</b>		0,0769	<b>239</b>	0,0513	
<b>16277</b>	0,0256		<b>240</b>	0,0513	
<b>16279</b>	0,0256		<b>241</b>	0,0256	
<b>16294</b>		0,1538	<b>248</b>	0,0513	
<b>16298</b>	0,9744	0,0769	<b>249</b>	0,8718	
<b>16309</b>	0,0256		<b>264</b>	0,0256	
<b>16321</b>		0,0769	<b>276</b>		0,0714
<b>16325</b>	0,9487	0,0769	<b>277</b>		0,0714
<b>16327</b>	0,9487	0,0769	<b>290</b>	0,9231	
<b>16334</b>	0,0256		<b>292</b>	0,9231	
<b>16357</b>	0,9487	0,0769	<b>296</b>		0,0714

<b>16373</b>		0,0769	<b>309,1</b>	0,9231	1
<b>73</b>	0,0256		<b>315,1</b>		1
<b>74</b>	0,1026		<b>315,2</b>		1
<b>75</b>	0,0769		<b>317,1</b>	0,9231	
<b>76</b>	0,4359		<b>318</b>	0,0256	
<b>77</b>	0,1538		<b>320</b>		0,0714
<b>78</b>	0,2564		<b>324</b>		0,1429
<b>80</b>	0,0256		<b>326</b>		0,0714
<b>81</b>	0,0256		<b>338</b>	0,0256	
<b>87</b>		0,1429			

Dentro de estos polimorfismos, la identificación de sitios característicos (Mitomap, 2011) permite la asignación de haplogrupos, donde A16183T, T16189C y T16127C, identifican al Haplogrupo B, y C16223T, T16298C, C16327T, corresponden al Haplogrupo C (Tabla 5).

El pueblo originario Uru, representado por los haplotipos URU 1, URU 2, URU3 y URU4, pertenece al Haplogrupo B y el pueblo originario Ayoreo representado por el haplotipo AYO1 (Dornelles *et al.*, 2004) pertenece al Haplogrupo C (Tabla 6), mientras que el haplotipo AYOE no corresponde a ningún haplogrupo. Dentro de las muestras obtenidas de mestizos de La Paz, Oruro y Santa Cruz, existen haplotipos que pertenecen tanto al haplogrupo B como al C.

**Tabla 6. Designación de haplogrupos en las poblaciones Uru, Ayoreo y mestizas de La Paz, Oruro y Santa Cruz.**

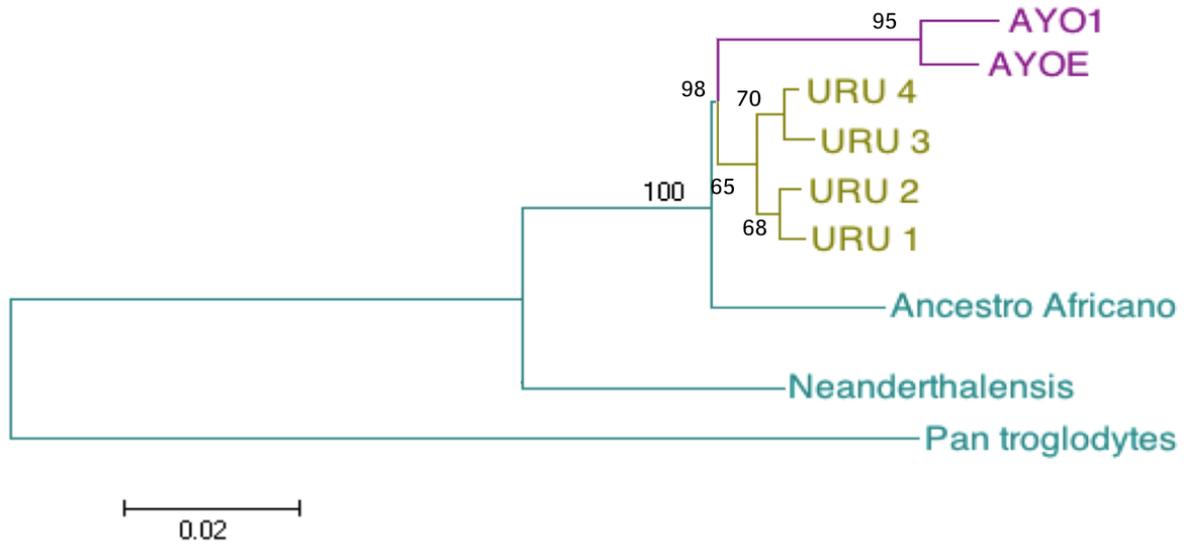
HAPLOTIPO	HAPLOGRUPO B	HAPLOGRUPO C
-----------	--------------	--------------

	16183	16189	16217	16223	16298	16327
<b>rCRS</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>C</b>
URU1	C	C	C	-	-	-
URU2	C	C	C	-	-	-
URU3	C	C	C	-	-	-
URU4	C	C	C	-	-	-
AYO 1	-	-	-	T	C	T
AYOE	C	-	C	C	T	C
LP2	C	C	C	-	-	-
LP3	C	C	C	-	-	-
LP4	-	-	-	T	C	T
LP7	C	C	C	-	-	-
OR1	-	-	-	T	C	T
OR7	C	C	C	-	-	-
SC1	C	C	C	-	-	-
SC2	-	-	-	T	C	T
SC5	C	C	C	-	-	-
SC7	C	C	C	-	-	-

**rCRS:** Secuencia de Referencia Revisada Cambridge.

### *e. Análisis Filogenético*

El análisis filogenético muestra la formación de dos clados claramente separados y definidos (Fig. 22), el clado de los Uru está estrechamente relacionado con el clado africano ancestral, mientras que el clado formado por los Ayoreo se encuentra más alejado. Por otro lado, el clado Uru presenta tres subclados, donde URU1 es el más cercano al antecesor africano, mientras que URU3 y URU4, que se encuentran emparentados (ambos haplotipos correspondientes a los Uru del Lago Poopó), son los más distantes. En el caso de la población Ayorea, los haplotipos AYO1 y AYOE se encuentran estrechamente relacionados, pero significativamente distantes del antecesor africano, mostrando linajes matrilineales distintos.



**Figura 22.** Árbol Filogenético de los pueblos indígenas Uru y Ayoreo basado en los polimorfismos de la región hipervariable mitocondrial obtenido con el método Neighbor-joining (Bootstrap 1000) (Bandelt *et al.*, 1995) siguiendo el modelo de sustitución de Tamura & Nei (1993) a través del software MEGA v. 4.0.

El grupo externo corresponde al primate *Pan troglodyts* (chimpancé).

En las poblaciones mestizas de La Paz, Oruro y Santa Cruz, se observan 10 haplotipos únicos, de los cuáles 4 corresponden a la población de La Paz, 4 a la población de Santa Cruz y 2 a Oruro. Por otro lado, existen 14 haplotipos compartidos, 2 dentro de la población de La Paz, 2 entre la población de La Paz y Santa Cruz, 4 entre La Paz y Oruro, 4 entre Santa Cruz y Oruro, y 2 dentro de la ciudad de Oruro. En el análisis filogenético los haplotipos LP4, OR1 y SC2 conjuntamente los haplotipos AYO1 y AYOE forman un cluster independiente, donde los subclados LP4 y OR1 conforman un subcluster directamente relacionado a los haplotipos Ayoreos, evidenciándose una relación matrilineal (Fig. 23).

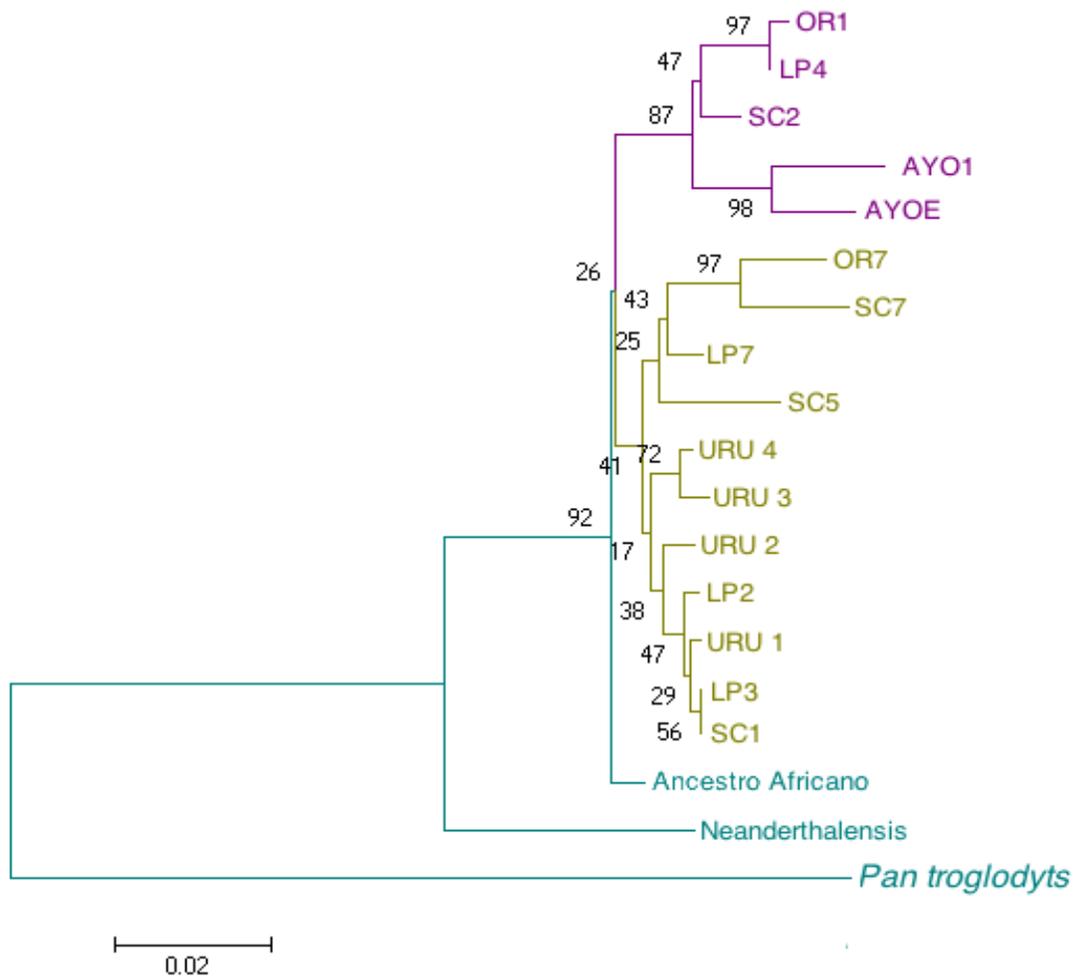


Figura 23. Árbol Filogenético de los pueblos indígenas Uru y Ayoreo, y poblaciones mestizas de La Paz, Oruro y Santa Cruz, basado en polimorfismos de la región hipervariable I y II mitocondrial con el método Neighbor-joining (Bootstrap 1000) (Bandelt *et al.*, 1995) siguiendo el modelo de sustitución de Tamura & Nei (1993) a través del software MEGA v. 4.0. El grupo externo corresponde al primate *Pan troglodyts* (chimpancé).

Por otro lado, el cluster de la población Uru presenta dos subclusters, uno formado propiamente por los haplotipos LP7, SC7 y OR7, correspondientes a la población mestiza y el otro que incluye los haplotipos Uru, donde el haplotipo URU1 está relacionado con los haplotipos LP3, LP2 y SC1, mientras que URU2 (de los Uru Chipaya) y, URU3 - URU4 (de los Uru del Lago Poopó), conforman dos subclusters independientes (Fig. 22).

El análisis filogenético de los pueblos Uru y Ayoreo con respecto a otras poblaciones indígenas del Mundo (Fig. 24), muestra la formación de dos clados, uno más distante de los antecesores africano y *Neanderthalensis* y el grupo externo *Pan troglodyts* (chimpancé). Dicho cluster está formado por los pueblos Mataco (Argentina), Guaraní (Paraguay), Warao (Venezuela), Yanomama (Venezuela), Bella cola (Colombia) y Ayoreo (Bolivia, del presente estudio) de Sudamérica, Maya (México) de Centro América, Ojibwa (Estados Unidos) de Norte América y Evenk (Siberia) de Asia, perteneciendo, por tanto, a un mismo linaje. Este cluster está compuesto por dos subclusters: uno independiente formado únicamente por el pueblo Guaraní y el otro por los restantes pueblos, incluyendo el Ayoreo, cuyos haplotipos permanecen juntos y separados. Por otro lado, el cluster más cercano a los antecesores, formado por los pueblos de Australia, India, Polinesia y el pueblo Uru (Bolivia, del presente estudio), presenta dos subclusters uno independiente representado por Australia y el otro constituido por los pueblos de India y, Polinesia - Uru, en dos subclados, respectivamente, lo que hace evidente la relación matrilineal entre los pueblos de Polinesia y el pueblo indígena Uru.

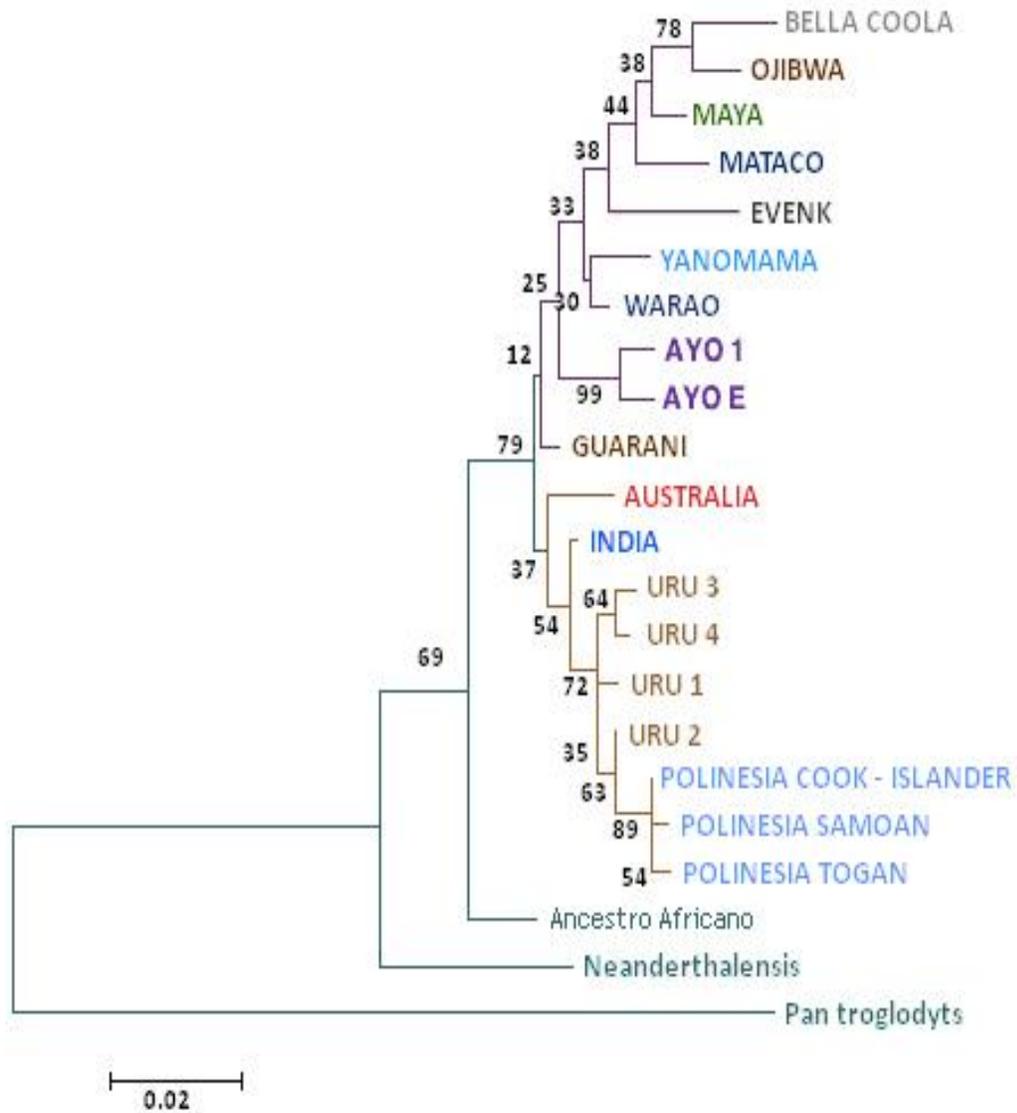


Figura 24. Árbol Filogenético de los pueblos indígenas Uru y Ayoreo, y pueblos del mundo, basado en los polimorfismos de la región hipervariable mitocondrial con el método Neighbor-joining (Bootstrap 1000) (Bandelt *et al.*, 1995) siguiendo el modelo de sustitución de Tamura & Nei (1993) a través del software MEGA v. 4.0. El grupo externo corresponde al primate *Pan troglodytes* (chimpancé). *Yanomama* (Venezuela), *Mataco* (Argentina), *Bella Coola* (Colombia), *Warao* (Venezuela), *Guaraní* (Paraguay), *Maya* (México), *Ojibwa* (Estados Unidos) y *Evenk* (Siberia), *Polinesia*, *Australia* e *India* (Datos obtenidos de Torroni *et al.*, 1993a; Torroni *et al.*, 1993b; Matallana & Cruzado, 2010).

## XIV. DISCUSIÓN

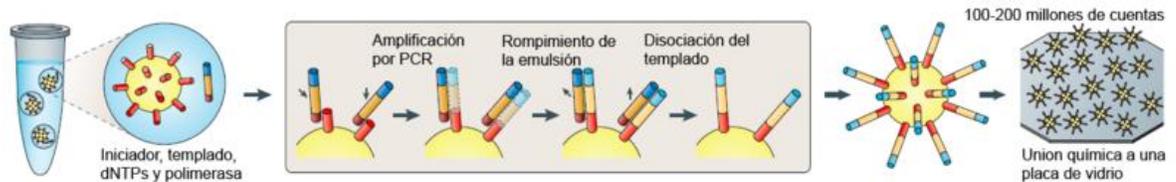
### I. *Obtención, Cuantificación de ADN y Amplificación de la Región Hipervariable Mitocondrial*

La obtención de muestras a partir de hisopado bucal, un método no invasivo para la obtención de ADN, ha sido ventajosa, pues ésta fue aceptada por los habitantes de cada pueblo estudiado, ya que ellos, debido a su cultura y al poco contacto con centros de salud, se muestran muy reservados y ligeramente temerosos a este procedimiento, especialmente cuando se trata de técnicas invasivas, como la obtención de sangre periférica. Sin embargo, obtener muestras de distintas fuentes (células de la mucosa bucal, células sanguíneas u orina), podría permitir realizar la evaluación de las heteroplasmías presentes, especialmente en muestras del pueblo indígena Uru, para determinar el tipo de heteroplasmía y realizar una más certera evaluación de la estructura genética, hecho que debe considerarse para estudios futuros.

Por otro lado, el protocolo empleado para la obtención de ADN total basado en el procedimiento de Precipitación Salina “saltin out” descrito por Miller *et al.* (1988) fue adaptado para su aplicación en muestras de hisopado bucal, en combinación con el kit Wizard Genomic DNA Purification (PROMEGA) (Fig. 19), obteniendo de esta forma una concentración de ADN en el rango de 21,44 – 346,3 ng/uL. Howe *et al.* (1997), empleó el protocolo en base a la precipitación salina con un tipo de muestra conservada en formol, obteniendo de esta manera, ADN de alta calidad (con un rango  $\geq 1,68$ ) y buena cantidad (rendimiento medio de 23 pg). Además, Vega-Pla *et al.* (1998), menciona que el protocolo basado en “saltin out” es poco peligroso, económico y seguro (en relación a los protocolos convencionales basados en Fenol: Cloroformo: Alcohol isoamílico, que son reactivos volátiles y tóxicos), especialmente al precipitar las proteínas con la concentración final de NaCl en el medio de hasta 1.5 M en relación a 6M utilizado en el presente estudio, obteniendo una pureza de ADN dentro de 1,7 y 2. Por otra parte, Cheng *et al.* (1995), alcanzó una integridad de ADN suficiente en el rango de 24,200 y 29,900 kb, que fue eficaz para el proceso de PCR.

En relación a la amplificación y secuenciación de la región hipervariable mitocondrial, Wilson *et al.* (1995) sugiere que el ADN molde debe tener una concentración mínima de 20 – 35 ng para ser utilizado en la obtención de un producto de PCR que posteriormente se empleará como molde para la secuenciación de la región hipervariable. En la presente investigación, la concentración de ADN utilizado, con un rango de 53,6 – 875,75 ng de ADN, dio resultados satisfactorios al momento de realizar el PCR y obtener los electroferogramas (Fig. 20 y Fig. 21).

Por otro lado, el método de secuenciación empleado, que corresponde al desarrollado por Sanger *et al.* (1977), que ahora es utilizado con la última tecnología fluorescente a través de la electroforesis capilar, permite la identificación precisa e inequívoca de cada nucleótido, logrando de este modo secuencias en las que es posible dilucidar, incluso, heteroplasmías. Sin embargo, esta técnica se enfrenta a limitaciones tanto en el rendimiento como en el costo, especialmente si se consideran las aplicaciones futuras.. A consecuencia de estas dificultades, se desarrollaron nuevas técnicas de secuenciación, más rápidas y eficientes, entre las que se encuentra la Pirosecuenciación, que ha tenido un éxito para la confirmación de la secuenciación y la secuenciación de *novo* (Ronaghi, 2001; Metzker, 2005). Esta técnica se basa en la detección en tiempo real del pirofosfato liberado (PPi) durante la síntesis de ADN, en una cascada de reacciones enzimáticas, mismas que generan luz visible que es proporcional al número de nucleótidos incorporados (Fig. 25). Sin embargo, esta tecnología no ha sido utilizada para la secuenciación del genoma debido a la limitación en la lectura, por que tiene un rendimiento de 200 – 300 bp, siendo generalmente empleada en genotipificación (Ronaghi, 2001; Metzker, 2005).



**Figura 25. Proceso de Pirosecuenciación.**

Fuente: Ronaghi, 2001

En los electroferogramas obtenidos por medio del analizador genético ABI 3130 (Fig. 21), se observó un fragmento amplificado para la región HVI que inicia en la base 16009, concluyendo en la 16416, y para la región HVII de la base 61 a la 430, a través de los cuáles se realizó la identificación de los polimorfismos. De acuerdo a Holland & Parsons (1999), generalmente se analiza en poblaciones humanas, incluso para comparaciones forenses, aquéllos polimorfismos presentes desde la base 16024 hasta la 16365 (HVI) y desde la base 73 a la 340 (HVII), lo que apoya el uso de estas regiones en el presente estudio y, por tanto, los cambios mutacionales descritos. Por otro lado, estos autores también mencionan que en casos en que la discriminación de linajes que no pueden diferenciarse claramente, se considera el análisis de la región HVIII, fragmento que se encuentra desde la base 440 hasta la posición 560 (Holland & Parsons, 1999). Fridman & Gonzales (2009), analizaron el poder de discriminación de la región hipervariable III, en familias distintas, donde obtuvieron una misma secuencia con las regiones HVI y HVII, logrando diferenciar ambos linajes. Así también, Sala *et al.* (2009), secuenciaron la totalidad de la región control de poblaciones Wichí, Toba y Pilagá del Chaco Argentino, analizando las tres regiones hipervariables HVI, HVII y HVIII, identificando los sitios polimórficos característicos para cada población. En el presente trabajo de investigación, el análisis de las regiones hipervariables I y II, produjo resultados óptimos y suficientes, para la identificación de los haplotipos presentes en cada población estudiada (Uru, Ayoreo, La Paz, Oruro y Santa Cruz) razón por la que no hubo la necesidad de analizar la tercera región hipervariable, ya que su análisis permitió la identificación de sitios polimórficos característicos para cada población, distinguiendo linajes maternos. Además, el análisis de la totalidad de la región control debe ser bien considerado, ya que ésta posee regiones conservadas (Fig. 12) que no ofrecen mutaciones informativas para la determinar la estructura genética de una población.

Por otro lado, analizando los electroferogramas obtenidos y su calidad, se observó la presencia de heteroplasmía (heteroplasmía de longitud) en el tracto homopolímero de las regiones HVI y HVII, presentando una transición (Timina→Citocina), en muestras pertenecientes a los Uru del Lago Poopó, en una muestra Uru Chipaya, como también en poblaciones de La Paz, Oruro y Santa Cruz. La presencia de heteroplasmía se puede explicar, a la producción de errores en su replicación o por el daño causado por radicales libres resultantes del metabolismo oxidativo, donde la mutación causada por estos fenómenos se exhibe en la siguiente generación mediante el fenómeno de cuello de botella (Fig. 9) que ocurre en el oocito o que ocurrió hace tiempo atrás, donde los descendientes manifestarán una mezcla de moléculas originales y mutantes (Calderón, 2009). Para que este polimorfismo se fije en la población, es necesario que se herede a los descendientes, estableciendo un estado homoplásmico de forma individual o que esta mutación se pierda en una o dos generaciones si esta ocurrió recientemente (Alvarés, 2008; Calderón, 2009). Costa *et al.* (2008), encontró también estos resultados en habitantes de la población de La Paz, aunque este autor no menciona el tipo de heteroplasmía. Por otro lado, no se observó esta heteroplasmía en ninguna de las muestras obtenidas de la población Ayorea, sugiriendo que esta población no está influenciada por efecto de la deriva génica, sino que está influenciada por otro tipo fenómeno evolutivo.

## ***II. Análisis de los Haplotipos***

Las poblaciones humanas, especialmente las poblaciones indígenas, son aquellas cuya formación en espacio y tiempo está sujeta a la acción de factores inherentes al proceso evolutivo y que se han adaptado, de alguna forma, a diversas condiciones ecológicas, las cuáles han determinado su sobrevivencia y permanencia hasta la actualidad (Barrantes, 1993).

En la población Ayorea, los sitios polimórficos 16051G, 16169T, 16223T, 16298C, 16325C, 16327A, 16357C, 207A, 249G, 290C, 292C, 309.1C, 317.1C, se comparten

con los mestizos de La Paz, Oruro y Santa Cruz, lo que puede ser resultado de la migración ocurrida tiempo atrás, especialmente durante la guerra del Chaco, que obligó a este pueblo a migrar hacia otros territorios; a esto debemos sumar la influencia Jesuítica, que si bien logró la instauración de colonias o “Misiones”, también causó eventos de migración, especialmente en aquéllos que no compartían la visión Jesuítica de la vida (Mansilla, 2004; Gómez, 2009). Por otro lado, Wiens & Servedio (2000), mencionan la existencia de polimorfismos compartidos entre poblaciones distintas y que a su vez se encuentran en frecuencias diferentes, lo que es considerado un criterio válido para distinguir entre especies y, en el caso de estudios humanos, entre poblaciones, pues existe diversidad genética distinta (dada por la distinta distribución de haplotipos). Además, los sitios polimórficos como 16169T, 16223T, 16325C, 207A, estuvieron presentes en todas las poblaciones analizadas, lo que puede sugerir que son propios de poblaciones americanas.

En la población Ayorea (Fig. 26 y 27), los sitios polimórficos fijados para esta población, fueron comparados con el PhyloTree.org (van Oven & Kayser, 2009), encontrándose que tres de ellos (16169, 16327, 207), son coincidentes con tres de los cinco sitios polimórficos (16169, 16327, 16354, 16368, 207) que designan al subhaplogrupo L0f del MacroHaplogrupo L0, un haplogrupo que designa poblaciones africanas ancestrales (directamente relacionadas con el origen de la humanidad), lo que indica que estos polimorfismos han tenido una larga vida y que han sido mantenidos por la selección natural, favoreciendo la diversidad (Clark, 1997), sugiriendo, al mismo tiempo, el origen africano ancestral del pueblo Ayoreo, aunque al compararlos con otros pueblos del mundo (Fig. 24). Los haplotipos de la población Ayorea se ubican en un clado más distante del ancestro común africano y del homínido *neardenthalensis*, situación que se debe a la existencia de otros polimorfismos nucleotídicos (Fig. 26 y 27), que también se han fijado (16027, 16051, 16325, 16327, 16357, 249, 290, 317.1). Wallace *et al.* (1999), mencionan que las variantes de ADN mitocondrial necesitan ser selectivamente neutrales o casi neutrales para evitar ser eliminadas por la selección y así alcanzar la fijación, lo que probablemente ocurrió con estos sitios.

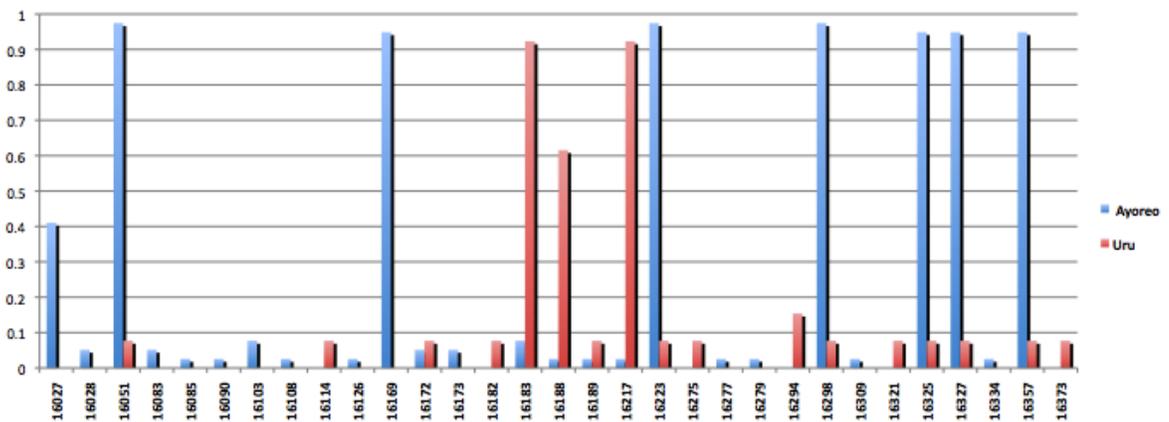


Figura 26. Frecuencias de los polimorfismos de la Región HVI en las poblaciones Uru y Ayorea

Además, la población Ayorea posee un único linaje materno, distinto de otros linajes de Sudamérica (debido a sus polimorfismos propios o privados), a pesar de estar relacionada a otras poblaciones, sugiriendo así, que en esta población se formó a consecuencia de un efecto fundador, manteniendo la presencia de polimorfismos provenientes de linajes antiguos, resultados también transmitidos por Dornelles *et al.* (2004).

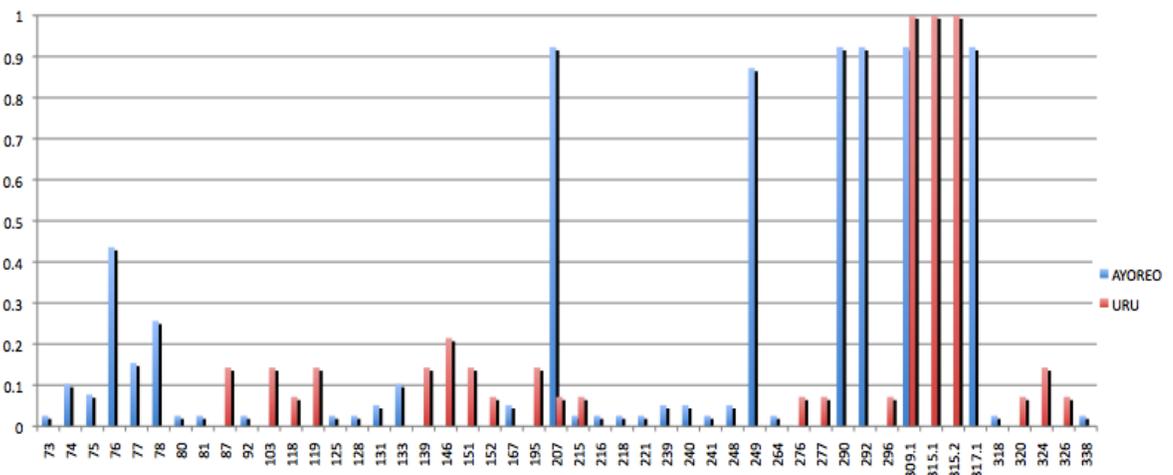


Figura 27. Frecuencias de los polimorfismos de la Región HVII en las poblaciones Uru y Ayorea

Los polimorfismos 16027T, 16183G, 16188A, 16217C, 309.1C, 315.1C, 315.2C (Fig. 26 y Fig. 27) pertenecientes a la población Uru, son compartidos con las poblaciones

mestizas de La Paz, Oruro y Santa Cruz, lo que sugiere que su presencia es producto de la migración, al igual que en el caso de la población Ayorea. Resultado de eventos de migración es también la presencia de los sitios polimórficos 16189, 16217, 315.1 y 315.2, que comparte la población Uru con poblaciones de Australia, India y Polinesia, lo que revela un origen común (Kumar *et al.*, 2009). Cabe mencionar que las diferencias entre las frecuencias de los SNPs presentes para cada población, pueden entenderse a partir del ciclo de vida propuesto por Miller & Kwok (2001): 1) aparición de un nuevo alelo variante por mutación; 2) sobrevivencia del alelo en las primeras generaciones; 3) aumento de la frecuencia del SNP considerando el conjunto de la sobrevivencia a través de las fluctuaciones en la población y 4) fijación, demostrando así que el análisis de SNPs es la herramienta principal al momento de definir la estructura genética de una población. La aparición de un SNP tiene una larga data en la población, que dependerá del poder de variación y extensión de ésta entre las especies. Si una nueva mutación sobrevive en las primeras generaciones y conforme va aumentando su frecuencia en la población, le sigue un desarrollo más largo, los procesos estocásticos, la velocidad de variación pero con serios cuellos de botella, favorecerán la sobrevivencia del alelo con alta frecuencia y la pérdida de alelos raros, lo que definirá su fijación (Miller & Kwok, 2001).

Los linajes matrilineales de las poblaciones Uru y Ayorea, con relación a las poblaciones de La Paz, Oruro y Santa Cruz (Fig. 23), indican que los mestizos analizados presentan en su ADN mitocondrial polimorfismos tanto del pueblo Uru como del Ayoreo (clado central, Fig. 23), lo que indica entremezcla genética y migración. Sin embargo, el origen de esta poblaciones mixtas puede estar dado por la entremezcla de dos o más sociedades diferentes, lo que llevó a conformar una sociedad con rasgos únicos (Cadena, 2006).

Por otro lado, si comparamos el número de sitios polimórficos entre los pueblos Uru y Ayoreo, observamos que los Uru presentan sitios polimórficos en menor número (37 SNPs) que la Población Ayorea (56 SNPs), aproximadamente un 30% menos de sitios polimórficos. Este resultado tiene más de una explicación. Primero, da una idea de que

la población Uru pudo sufrir un período de deriva genética, en que ciertos polimorfismos se fijaron y otros se perdieron (deriva genética), esto debido a que es una población con una demografía baja que llega hasta 2134 habitantes (INE, 2001), además de no permitir introgresiones en su población y que su adaptación al medio ambiente en el que habitan influye gradualmente, donde la fijación al azar de los polimorfismos se produce con suficiente lentitud, es probable que los polimorfismos se pierdan de forma independiente, traduciéndose a un período de decadencia en el número de sitios polimórficos que sigue a un aproximado de la distribución geográfica (Clark, 1997). Por otro lado, la segunda explicación a la presencia de más sitios polimórficos en la población Ayorea puede estar relacionada a la ruta migratoria que tomaron para alcanzar Sudamérica desde África, sugiriendo estos resultados que la ruta tomada por el pueblo Uru fue más corta que la escogida por el pueblo Ayoreo.

#### *a. Análisis Filogenético*

En el análisis filogenético, debemos tomar en cuenta la elección de modelos de sustitución y métodos de reconstrucción de árboles filogenéticos. Los modelos de sustitución de nucleótidos, tienen un papel primordial en el contexto de estimar las distancias genéticas, que se basan en el número esperado de sustituciones por sitio, donde los parámetros de tasas de intercambio describen las tendencias relativas de las bases (A, T, C, G) a ser sustituidas y utilizadas para describir la tasa de cambio de un nucleótido (Posada y Crandall, 2001). El modelo matemático de Tamura & Nei (1993), elegido para la presente investigación, se basa en la tasas de variación nucleotídica de Transiciones / Transversiones en diferentes sitios de la secuencia, tomando en cuenta el exceso de las transiciones y la diferencia de las frecuencias nucleotídicas. Cabe mencionar que éste modelo fue diseñado y aplicado por primera vez a la comparación de secuencias de humanos y chimpancés, donde los datos sugieren que la proporción transición / transversión de los nucleótidos para ambas especies ocurre de forma similar, estimando que el ADN mitocondrial ancestral común para los seres humanos es de 80000 – 48000 años y de 0,57 y 2,72 millones de años en los chimpancés comunes, lo

que sustenta el uso del chimpancé (*Pan troglodyts*) como grupo externo en la reconstrucción filogenética.

Por otra parte, la elección de los métodos de construcción de árboles tiene gran importancia en el análisis de la evolución biológica. Son varios métodos que se han desarrollado. Así aquéllos basados en máxima parsimonia (Fitch, 1971) o la máxima probabilidad (Felsenstein, 1982; Felsenstein, 1985) con la aplicación del bootstrap, por ejemplo, fueron los primeros. El método de Neighbor joining utilizado en la presente investigación, desarrollado en 1987 por Saitou & Nei, está basado en la distancia genética y diversos autores hasta la fecha han demostrado que el resultado es un árbol filogenético de alta fidelidad. No obstante, Zhang & Sun (2008), desarrollaron un nuevo método basado en el Neighbor joining, el “Random Local Neighbor joining”, basado en una nueva forma de selección de parejas al azar, obteniendo nuevas topologías en diferentes análisis, dando más de una topología y sus proporciones, para poder recuperar la topología correcta de manera significativa. Sin embargo, sigue a prueba su aplicación, razón por la que en el presente estudio los análisis se realizaron a través del Neighbor joining.

En este sentido, el árbol filogenético de los pueblos Uru y Ayoreo con respecto a las poblaciones mestizas de La Paz, Oruro y Santa Cruz, nos muestra que estas últimas poblaciones mestizas se distribuyen en diferentes clusters, debido a que son descendientes de diversos linajes matrilineales (Fig. 23), probablemente a consecuencia del proceso de conquista y colonización que se produjo en estas poblaciones en la historia, como también del proceso de migración actual en las ciudades de La Paz, Oruro y Santa Cruz.

El análisis filogenético de las poblaciones bolivianas (Fig. 23), podemos sugerir que los linajes matrilineales de los pueblos Uru y Ayoreo se mantienen conservados, debido a que forman clusters independientes, y que no están distribuidos con los clusters de los mestizos, esto debido al análisis de flujo genético que es un importante componente de

la estructura de las poblaciones, ya que se determina hasta qué grado cada población es una unidad evolutiva independiente (Piñero *et al.*, 2008).

Por otro lado, comparando los pueblos Uru y Ayoreo con respecto a poblaciones indígenas del mundo (Fig. 24; Fig. 28), se estableció que el pueblo indígena Ayoreo se encuentra relacionado con poblaciones sobre todo del continente americano y Asia (Guaraní, Yanomama, Maya, Ojibwa, Evenk), compartiendo entre estos pueblos amerindios el sitio polimórfico 16325C que está fijado en la población Ayorea, donde Torroni *et al.* (1993a; 1993b), menciona que esta mutación se produjo en la población de Siberia, que posteriormente fundó los pueblos amerindios, además la mutación en el sitio 16325 proviene de linajes mitocondriales asiáticos. Así, la presencia del sitio polimórfico en la población Ayorea sugiere que tiene un recorrido a través del estrecho de Bering (Fig. 24; Fig. 28), aunque esta información no define las relaciones de ancestralidad de este pueblo. Dicha ancestralidad puede analizarse a través de su posición en el árbol filogenético (Fig. 24) y en la red de haplotipos (Fig. 28) siendo un subcluster más antiguo en relación a las de más poblaciones amerindias analizadas, excepto la guaraní, que conforma otro subcluster. Esto podría explicarse a través de lo mencionado anteriormente, la presencia de mutaciones que identifican al subhaplogrupo L0f (africano), sugiriendo una ancestralidad que solo se ha mantenido en estos pueblos, pues en los restantes pueblos de América analizados e incluso en el pueblo Evenk de Siberia, de las 5 mutaciones necesarias para identificar este subhaplogrupo solo ha quedado una (16327) (Torroni *et al.*, 1993b). Así, una hipótesis para que la población Ayorea se encuentre en una posición más alejada al ancestro Africano podría ser la presencia de un número significativo de sitios polimórficos que se han fijado durante su recorrido a América hasta alcanzar su desarrollo y adaptación. Es así, que muchos de estos sitios polimórficos no se pueden clasificar dentro de un determinado haplogrupo (Torroni *et al.*, 1993a; Torroni *et al.*, 1993b; Mantallana & Cruzado, 2010). Estos resultados sugieren que el linaje mitocondrial del pueblo Ayoreo está relacionado a un proceso evolutivo más reciente.

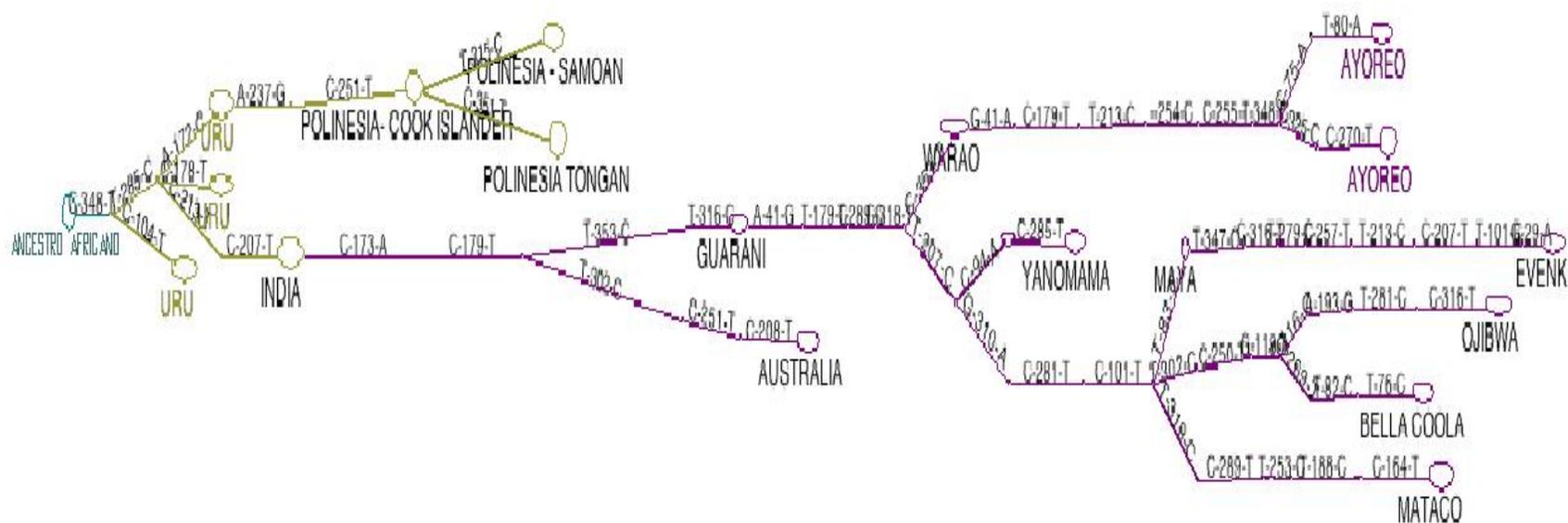


Figura 28. Red de haplotipos de la región hipervariable I de los pueblos indígenas Uru y Ayoreo y otros pueblos del mundo de acuerdo al modelo de Templeton & Posada (1998) y Clement y colaboradores (2000) obtenido a través del software TCS v.1.21. *Mataco* (Argentina), *Bella Coola* (Colombia), *Warao* (Venezuela), *Yanomama* (Venezuela), *Maya* (México), *Ojibwa* (Estados Unidos) y *Evenk* (Siberia), *Polinesia*, *Australia* e *India* (Datos obtenidos de Torroni et al., 1993a; Torroni et al., 1993b; Matallana & Cruzado, 2010).

Los Uru, por otro lado, no se ven relacionados con los pueblos americanos analizados en el presente estudio, como fue el caso de los Ayoreo. Este pueblo indígena está directamente relacionado con pueblos provenientes de Polinesia en el norte de Australia, y estos a su vez con la población de la India, esto debido a que comparten sitios polimórficos específicos. Se ha determinado que la migración de los pueblos de Polinesia se realizó cerca de 3000 -4000 años antes de nuestra era, dispersándose por todo el pacífico dando lugar a 3 linajes mitocondriales distintos, los que su vez comparten un ancestro maternal común de 85.000 años atrás, donde el linaje predominante se encuentra en Papúa Melanesia, con su irradiación a las Islas Cook (Lum *et al.*, 1994; Oppenheimer & Richards, 2001). Estos datos permiten dilucidar la posible ruta que tomó el pueblo Uru antes de su llegada al continente americano (Fig. 29) que es la segunda ruta migratoria postulada por Rivet, la cual atraviesa el océano pacífico. Además en la red de haplotipos, el pueblo Uru presenta pocos eventos de mutación (Fig. 28), lo que se puede explicar por presencia de la deriva genética debido a su confinamiento histórico al agua, evidenciándose sitios polimórficos compartidos con poblaciones del sudeste de Asia (Ballinger *et al.*, 1992; Lum *et al.*, 1994; Oppenheimer & Richards, 2001; Kumar, 2009). Esta explicación es también coincidente con el bajo número poblacional de los Uru (INE, 2001), hecho que influye en el nacimiento o muerte de un SNP descrito por Miller & Kwok (2001). Por otro lado, la cercanía de la población Uru, en el árbol filogenético, al ancestro africano *Homo sapiens*, y al homínido *Neanderthalensis*, apoya la posibilidad de que el pueblo Uru sea resultado de un proceso evolutivo anterior al evidenciado en los otros pueblos de América analizados (incluyendo el pueblo Ayoreo), habiéndose mantenido este linaje debido a que su recorrido hacia el continente sudamericano fue corto y rápido (Fig. 29), hecho que está apoyado por la presencia de pocos eventos de mutación (Fig. 28).

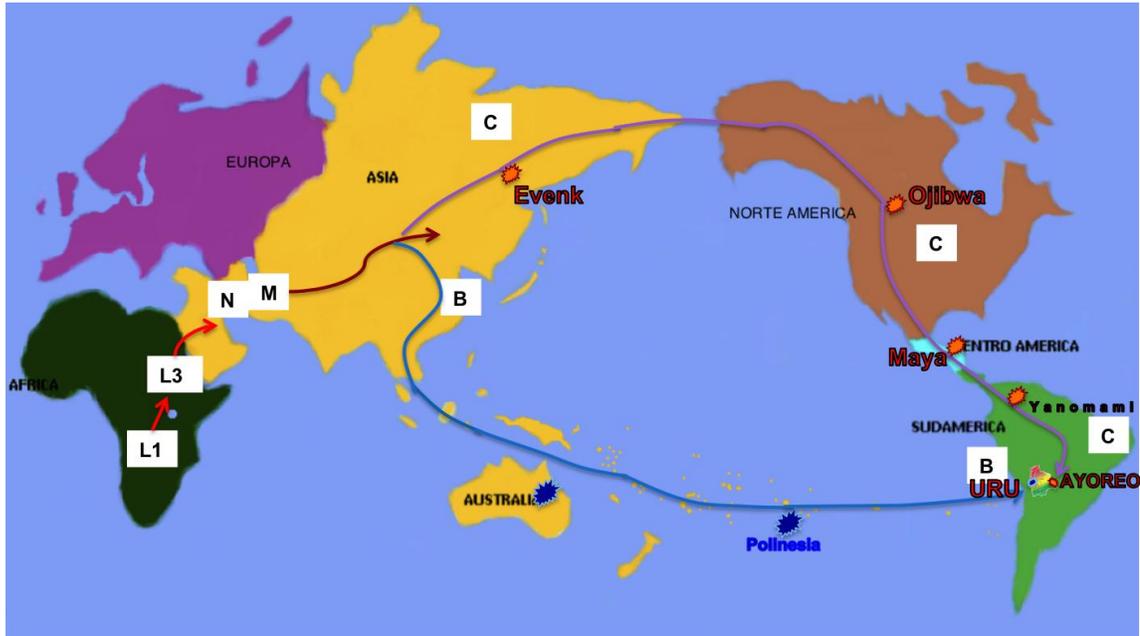


Figura 29. Posibles rutas migratorias de los pueblos indígenas originarios Uru y Ayoreo.

Con respecto a los haplogrupos identificados, la población Ayoreo pertenece al Haplogrupo C (Tabla. 6), como lo demostró también Dornelles *et al.*, (2004). Sin embargo estos autores identificaron dentro de la población Ayoreo haplotipos pertenecientes al haplogrupo D, aunque cabe mencionar que lo hicieron a través de RFLPs, técnica de menor precisión a la utilizada en la presente investigación. Así mismo, es posible que este haplogrupo esté presente en otro grupo muestral no considerado aquí. En el caso del pueblo Uru, Sandoval *et al.* (2004), menciona que el pueblo Uru de Perú (Uru Chulluni) pertenece al haplogrupo A2, sugiriendo de esta forma el origen amazónico peruano de esta población. Estos resultados difieren completamente de los encontrados en el pueblo Uru de Bolivia, perteneciente al Haplogrupo B, evidenciándose su origen en la polinesia. Esto podría explicarse, de acuerdo a la misma teoría expresada por Sandoval *et al.*, (2004): el pueblo Uru del Perú fue asimilado por el sistema colonial y republicano, lo que los llevó a su desaparición años atrás, hecho que resalta aún más los datos mostrados para las poblaciones de Bolivia.

La distribución geográfica de los haplogrupos ayuda a deducir las antiguas rutas humanas que sucedieron durante la migración de los pueblos hacia tierras desconocidas, el linaje más antiguo es el haplogrupo L1 (122000 a 132000 años antes de nuestra era), que fue expandiendo por el continente asiático por dos rutas: una a través de Asia Central y la otra a través del sur de Asia originando al haplogrupo C entre otros, que se expandió por el estrecho de Bering al continente americano llegando hasta Sudamérica, hecho que sustenta la migración del pueblo Ayoreo en base al haplogrupo C identificado (Bonatto & Salzano, 1997; Maca-Meyer *et al.*, 2001; Stanyon *et al.*, 2009).

Por otro lado, en África se sucedieron varias migraciones en distintos tiempos, dando lugar a los haplogrupos caucásicos, donde la última migración de estos ancestros africanos se realizó el Asia Oriental hace 39000 – 52000 años antes de nuestra era, originando a los Haplogrupos ancestrales, de donde se originó el Haplogrupo B, alcanzando Japón, los archipiélagos del Pacífico sudeste. Este último Haplogrupo está presente en la Población Uru, apoyando de esta forma la ruta migratoria que sugerimos que este pueblo tomó hasta donde viven en la actualidad (Torrioni *et al.*, 1993a; Torrioni *et al.*, 1993b; Baillet *et al.*, 1994; Cavalli *et al.*, 1995; Maca-Meyer *et al.*, 2001; Stanyon *et al.*, 2009). Esto apoyado por los datos históricos que sustentan que los Uru tienen amplios conocimientos de navegación, siendo hábiles navegantes, denominándose así mismos *Jas-shoni* “Hombres del Agua”. Así, este pueblo transmitió de generación a generación el conocimiento del manejo de la totora para actividades lacustres. Si bien podemos encontrar a orillas del lago Titicaca poblaciones aymaras que tienen también manejo de la totora, estudios antropológicos mencionan que estos conocimientos fueron adquiridos de los Uru y que estos pueblos aymaras al principio eran originalmente hábiles con el manejo de la agricultura y no así de la navegación (Portugal, 2002; Choque, 2003 Escobar, 2004; Badani, 2006; Fisher *et al.*, 2008; Cáceres, 2009; Kopp, & Díez, 2009).

Es así, que varios investigadores antropólogos, étnicos, mencionan que el pueblo Uru es uno de los pocos pueblos que ha mantenido su antigüedad a lo largo de varios años hasta

nuestros días (Portugal, 2002; Choque, 2003 Escobar, 2004; Fisher *et al.*, 2008; Cáceres, 2009; Kopp, & Díez, 2009). Esta antigüedad está comprobada por la familia lingüística a la pertenecen el Puquina, que según investigadores lingüísticos tiene su relación con poblaciones de la Polinesia, hecho que también se ha demostrado en esta investigación a través del ADN mitocondrial (Portugal, 2002; Choque, 2003 Escobar, 2004; Fisher *et al.*, 2008; Cáceres, 2009; Kopp, & Díez, 2009). Sin embargo, debe considerarse que el ADN mitocondrial proporciona información sobre el linaje exclusivamente materno e una población, aunque esto no es una limitante y existen diversas investigaciones que han corroborado, que el ADN mitocondrial proporciona información sobre la evolución humana (Shurr *et al.*, 1990; Rothhammer & Llop, 2004), estos resultados deben contrastarse con los que arroja el Cromosoma Y, el cual da información acerca del linaje paterno (Verea, 2011)

## **XV. CONCLUSIONES**

Los pueblos indígenas originarios Uru y Ayoreo poseen polimorfismos distintos y únicos que dan lugar a 6 haplotipos únicos: URU1, URU2, URU3, URU4, AYO1 y AYO2, distribuidos en dos linajes mitocondriales distintos. Los haplotipos encontrados en la población Ayoreo están estrechamente relacionados, mientras que la población Uru presenta dos subclados distintivos a las poblaciones Uru Chipaya y Uru del Lago Poopó, indicando una divergencia entre estas poblaciones. Además se estableció, que el pueblo Uru pertenece al Haplogrupo B, mientras que el pueblo Ayoreo al Haplogrupo C.

Las poblaciones mestizas están caracterizadas por presentar 20 haplotipos compartidos y 10 haplotipos únicos y distintos para las ciudades de La Paz, Oruro y Santa Cruz: LP2, LP3, LP4, LP7, OR1, OR7, SC1, SC2, SC5 Y SC7, respectivamente, no compartiendo ningún haplotipo con los pueblos Uru y Ayoreo, identificándose que son resultado de una mezcla de sitios polimórficos efecto de la migración, entre los que se incluyen aquéllos propios de los pueblos indígenas en estudio. Estas poblaciones pertenecen indistintamente tanto al haplogrupo B como al C.

Las relaciones filogenéticas del pueblo indígena originario Uru con otras poblaciones del mundo permiten rastrear el origen de su linaje hasta la Polinesia y Australia, mientras que en la población indígena Ayorea dicho linaje nos traslada hasta el norte de Asia (Siberia), lo que sugiere rutas migratorias de poblamiento distintas.

El pueblo indígena Ayoreo presenta una relación estrecha con pueblos indígenas de norte, centro y Sudamérica, mientras que el pueblo Uru no presenta relación con ninguno de los pueblos indígenas del continente americano incluidos en esta investigación, indicando distintas rutas migratorias, distintos linajes y conservación en la estructura genética de las poblaciones Uru a través del tiempo

La población indígena Uru presenta haplotipos menos distantes al antecesor homínido africano y al antecesor neandertal, lo que permite establecer su antigüedad previa a la del pueblo Ayoreo, aunque este último presenta una estrecha relación con el Haplogrupo L0f africano.

## **XV. RECOMENDACIONES**

Para obtener una mejor distribución de los linajes maternos en base al ADN mitocondrial de las poblaciones bolivianas, se recomienda un estudio exhaustivo y comparación de los haplotipos que posee cada población, que no están implicadas en el presente estudio.

Por otra parte, se sugiere expandir este estudio al linaje paterno, para conocer si existe rastros de linajes antiguos masculinos presentes en la población boliviana o si estos fueron extinguidos debido a la colonización que atravesó nuestro país.

Por otro lado, recomendamos extender y profundizar los estudios lingüísticos, antropológicos y linaje paterno hacia la población Ayorea, pues como se muestra en el presente estudio es un pueblo amazónico que vino desde el estrecho de Bering, además de mantener intacto su linaje materno, para así revalorizar este pueblo originario que en

la actualidad está siendo descuidado por distintas autoridades gubernamentales y que lamentablemente se está dedicando a actividades que no son propias de su cultura.

Con respecto a la población Uru, se recomienda profundizar los estudios en base lingüística, antropológica y linaje paterno para poder coadyuvar con los resultados propuestos en la presente investigación, donde sugerimos que la llegada de la población Uru fue desde la ruta del Océano Pacífico, y que la relación genética matrilineal proviene de pueblos de la Polinesia del Sureste Asiático, así poder conocer más acerca de esta población que según otros investigadores mencionan, se está extinguiendo.

Por último, para conocer nuestras raíces culturales, sugerimos extender estos estudios genéticos en base al ADN mitocondrial, a restos humanos arqueológicos de pueblos antiguos como ser Tihuanacu, o Chullpas antiguos de otras culturas que fueron las primeras en ocupar nuestro territorio y, así poder coadyuvar a diferentes disciplinas en la reconstrucción de la historia de nuestro país.

## **XVI. REFERENCIAS**

- Álvarez, V. 2008. **Estudio multidisciplinar de la variabilidad del ADN mitocondrial en poblaciones humanas.** Univ Santiago de Compostela. p 23.
- Álvarez, V., Jaime, J.C., Carracedo, Á., & Salas, A. 2007. **Coding region mitochondrial ADN SNPs: Targeting East Asian and Native American haplogroups.** Forensic Science International: Genetics, 1: 44–55
- Alvear, C. 2004. **Manual de historia de la cultura.** 3ra Edición. Editorial Limusa S.A. Mexico D.F. p. 627.
- Anderson, S., Bankier, A., Barrell, B., De Bruijn, M., Coulson, A., Drouin, J, Eperon, C., Nierlich, D., Roe, B., Sanger, F, Schreier, P., Smith, A., Staden, R., & Young, I. 1981. **Sequence and organization of the human mitochondrial genome.** Nature, 290: 457-65.

- Andrews, M., Kubacka, I., Chinnery, F., Lightowlers, N., Turnbull, M., & Howell, N. 1999. **Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial ADN**. *Natural Genetics* 23 (2):147.
- Araya C. 1995. **Historia de América en perspectiva Latinoamericana**. 2da. Edición. Editorial EUNED. San José – Costa Rica. p 26- 34.
- Badani, J. 2006 . **Los Urus reviven de la mano de sus niños**. *La Razon*. Consultado 2009 – 02-18. [http://www.la-razon.com/versiones/20061224\\_005765/nota\\_277\\_371572.htm](http://www.la-razon.com/versiones/20061224_005765/nota_277_371572.htm)
- Bailliet, G., Rothhammer, F., Carnese, F., Bravi, C., & Bianchi, N. 1994. **Founder Mitochondrial Haplogroups in Amerindian Populations**. *American Journal of Human Genetics* 55: 27-33.
- Ballinger, S., Shurr, T., Torroni, A., Gan, Y-Y., Hodge, J., Hassa, K., Chen, K., & Wallace, D. 1992. **Southeast Asian Mitochondrial ADN Analysis Reveals Genetic Continuity of Ancient Mongoloid Migrations**. *Genetics* 130:139-152
- Bandelt H., Macaulay V., & Richards M. 2006. **Human mitochondrial ADN and the evolution of Homo sapiens**. Springer- Verlag Berlin Hiedelberg. p 271.
- Berdichewsky, B. 2002. **Antropología Social: Introducción Una visión global de la humanidad**. 1ra edición. Editorial LOM. Santiago de Chile. p. 342.
- Benitez, A. 2002. **Biología molecular, genética de poblaciones y diversidad lingüística**. *Resla*, 15: 7-24
- Bert, F., Corella, A., Gené, M., Pérez, A., & Turbón, D. 2004. **Mitochondrial ADN Diversity in the Llanos de Moxos: Moxo, Movima and Yuracare Amerindian populations from Bolivia Lowlands**. *Annals of human Biology*. 1: 9-28.
- Bert, F. 2011. **Aspectos biodemográficos de grupos étnicos Macro-Pano de Bolivia y caracterización genética de las poblaciones Aymará, Quechua, Chimane y Mosestén**. Memoria para optar el grado de Doctor. Unidad de Antropología del Departamento de Biología Animal. Universidad de Barcelona. p. 369.

- Bianchi N., Martínez-Marignac V., Guanuco R., 2003. **Identificación de Amerindios por Medio del análisis de ADN. Su aplicación en los litigios por posesión de Tierras, y otros temas Legales y Éticos.** *Interciencia* 28 : 8 -14
- Bohannon, P. 1996. **Para raros, nosotros: introducción a la antropología cultural.** Ediciones AKAL. Madrid – España. p. 349
- Bonatto, S., & Salzano, F. 1997. **Diversity and Age of the Four Major mtADN Haplogroups, and Their Implications for the Peopling of the New World.** *American Journal Genetics* 61: 1413-1423.
- Cáceres, X. 2009. **Los Urus y un proyecto común de Pueblo. Memoria de los Encuentros educativos, culturales y deportivos de la Niñez de la Nación Uru.** Editorial Catacora. La Paz- Bolivia. p 72.
- Calderón, R. 2009. **Análisis genético para la conservación y manejo de Subespecies de *Odocoileus virginianus* (Zimmermann, 1780) en México.** Tesis de maestría. Centro de Biotecnología Genómica- Instituto Politécnico Nacional. p. 102.
- Cavalli L., Menozzi P., & Piazza A., 1994. **The history and geography of human genes.** Princeton University Press. United States of America. p 1059.
- Cheng, S., Chen, Y., Monforte, J., Higuchi, R., Van Houten, B. 1995. **Template integrity is essential for PCR amplification of 20 – 30 kb sequences from genomic DNA.** *Genome Research* 4: 294-298.
- Choque R. **Archivos Sonoros y Visuales de Pueblos Indígenas y Originarios de Bolivia.** Actualizado en 2008-04-11. Consultado el 2010-03-08. [http://multidoc.rediris.es/cuadernos/num13/ponencias/viernes/01sesion\\_pdf/Rub% E9nChoque.pdf](http://multidoc.rediris.es/cuadernos/num13/ponencias/viernes/01sesion_pdf/Rub% E9nChoque.pdf)
- CINU. Centro de Información de las Naciones Unidas. Poblaciones indígenas. Actualizado en: 2008-09-02. Consultado: 2010-02-26. <http://www.cinu.org.mx>
- Clark, A. 1997. **Neutral behavior of charged polymorphism.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 94: 7730-7734.

- Colomer, J. 2004. **Estudios para la Antropología**. Volumen 6. Editorial de la Universidad Politécnica de Valencia. Valencia – España. p. 301
- Coral, V. R., Salamanca, G. F. Y, & Buentello, M. L. 1995. **Aportación del ADN mitocondrial en el estudio filogenético de las poblaciones indígenas de América**. Anales de Antropología 32: 73-82.
- Corella A., Bert F., Pérez-Pérez A., Gené M., & Turbón D. 2007. **Mitochondrial ADN diversity of the Amerindian populations living in the Andean Piedmont of Bolivia: Chimane, Mosesten, Aymara and Quechua**. Annals of Human Biology 34: 34-55
- Costa, H., Lopes, V., Balsa, F., Bento, A., Pantoja, S., Anjos, M., Carvalho, M., Vide M.,Vieira, D., & Corte- Real, F. 2008. **Mitochondrial sequence analysis of native Bolivians population. Forensic Science international**. Genetics Supplement 1: 250- 261.
- Crawford, M. 2007. **Anthropological genetics: theory, methods and applications**. Cambridge University Press. United States. p. 476.
- Danielson, P., Sun, H., Melton, T., & Kristinsson, R. 2007. **Resolving mtADN mixtures by denaturing High-performance Liquid Chromatography and linkage phase determination**. Forensic Science International Genetics 1: 148-153.
- Dornelles, C., Battilana, J, Fagundes, N. J., Freitas, L., Bonatto, S., & Salzano, F. 2004. **Mitochondrial ADN and Alu insertions in a genetically peculiar population: The Ayoreo Indians of Bolivia and Paraguay**. American Journal of Human Biology 16:479–488.
- Eguiarte,L., Souza, V., Aguirre, X. 2007. **Ecología Molecular**. Primera edición. México D.F. p. 608.
- Easton, D., Merriwether, D., Crews, D., y Ferrel, F. 1996 **mtADN variation in the Yanomani: evidence for additional New World founding lineages**. American Journal of Human Genetics, 59: 213-225.
- Fabre A. **Diccionario etnolingüístico y guía bibliográfica de los pueblos indígenas sudamericanos**. Actualizado 2005-04-16. Consultado 2010-08-03. [butler.cc.tut.fi/~fabre/BookInternetVersio/Dic=UruChipaya.pdf](http://butler.cc.tut.fi/~fabre/BookInternetVersio/Dic=UruChipaya.pdf).

- Fabre A. **Los pueblos del Gran Chaco y sus lenguas, cuarta parte: Los zamuco.** Actualizado. 2007-03-11. Consultado. 2009-07-04. [butler.cc.tut.fi/~fabre/BookInternetVersio/Dic=Zamuco.pdf](http://butler.cc.tut.fi/~fabre/BookInternetVersio/Dic=Zamuco.pdf)
- Fagundes, N., Kanitz, R., Eckert, R., Valls, A., Bogó, M., Salzano, F., Smith, D., Silva, M., Zago, M., Ribeiro-dos-Santos, A., Santos, S., Petzl-Erler, M., & Bonatto, S. 2008. **Mitochondrial Population Genomics Supports a Single Pre-Clovis Origin with a Coastal Route for the Peopling of the Americas.** *The American Journal of Human Genetics.* 82, 583-592.
- Fariñas, M. **Diversidad Étnica e Inclusión Social en Bolivia.** Actualizado 2008-11-01. Consultado 2010-02-02. <http://www.fundacioncarolina.es/es-ES/nombresproprios/Documents/NP%20MJFari%C3%B1as%201108.pdf>
- Fernández, A., Fernández, J., Hernández, J., & González, J. 2002. **Genética.** 1ra. Edición. Editorial Ariel. Barcelona – España. p. 474
- Fernández, E. 2000. **Polimorfismos de ADN mitocondrial en Poblaciones Antiguas de la Cuenca Mediterránea.** Departamento de Biología Animal de la Universidad de Barcelona, p.643
- Filosto, M., Mancuso, M., Vives-Bauza, C., Vila, M.R., Shanske, S., Hirano, M., Andreu, A. L. & DiMauro, S. 2003. **Lack of paternal inheritance of muscle mitochondrial ADN in sporadic mitochondrial myopathies.** *Annal of Neurology,* 54: 524-526.
- Finnilä, S., Lehtonen, M.S. & Majamaa, K. 2001. **Phylogenetic network for European mtADN.** *American Journal of Human Genetics.* 68:1475-1484.
- Fisher, J., Patrick, D., & Tovías, B. 2008. **De la etnohistoria a la historia en los Andes: 51o Congreso Internacional de Americanistas.** 1ra. Edición. Editorial Abya Yala. Quito Ecuador p. 309
- Fitch, W. 1971. **Toward Refining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology.** *Systematic Biology* 49: 652-670.
- Forster, P. 2004. **Ice Ages and the mitochondrial ADN chronology of human dispersals: a review.** *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences.* 359(1442): 255-64.

- Frank S., 2008. **Pueblos originarios de América**. 1ra Edición. Ediciones del Sol S.R.L. Buenos Aires - Argentina. p 96.
- Freed S., & Freed R., 1967. **El Hombre desde su Comienzo**. C.I. – Jhon W. Clute, S.A.. Mexico, D.F. p 144.
- Fridman, C., & Gonzales, R. 2009. **HVIII discrimination power to distinguish HVI and HVII common sequences**. Forensic Science International: Genetics Supplement Series 2 : 320-321.
- Gisbert J., & Gisbert C. 1998. **Historia de Bolivia**. Segunda Edición. Editorial Gisbert y Cia. La Paz – Bolivia. p 731.
- Generase Systems Inc. 2008. **Genebase mitochondrial haplogroup reference guide**. Consultado 2010 – 07 - 25. [www.genebase.com](http://www.genebase.com)
- González, M., Brehm, A., Perez, A., Maca-Meyer, N., Flores, C. & Cabrera, M. 2003. **Mitochondrial ADN affinities at the Atlantic fringe of Europe**. American Journal of Physical Anthropology, 120: 391-404.
- Gómez, M. 2009. **Historia de lucha , Territorio y organización**. Actualizado 2009-11 – 15. Consultado 2009 – 12 – 05. <http://www.laprensa.com.bo/domingo/26-04-09/edicion.php>
- Gómez S., & Méndez S. 2003. **Atlas de historia de América**. 1ra Edición. Editorial Limusa. Mexico D.F. p. 198
- González-Sastre, F. 2003. **ADN mitocondrial humano y enfermedades genéticas** p303.En: González-Sastre F. PATOLOGÍA MOLECULAR, Masson. Madrid – España. p. 701
- Grasso D., 1997. **Cosmología y Mitología Indígena Americana**. 1ra Edición. Editorial Kier S.A. Buenos Aires –Argentina. p. 385
- Green, R., Malaspinas, A., Krause, J., Briggs, A., Johnson, P., Uhler, C., Meyer, M., Good, J., Maricic, T., Stenzel, U., Prüfer, K., Siebauer, M., Brubano, H., Ronan, M., Rothberg, J., Egholm, M., Rudan, P., Brajkovic, D., Kucan, Z., Gusic, I., Wikström, M., Laakkonen, L., Kelso, J., Slatkin, M., & Pääbo, S. 2009. **A complete Neandertal mitochondrial genome sequence determined by high- throughput sequencig**. Cell 134(3): 416-426.

- Gregor C. 2003. **Pueblos Indígenas y Derechos constitucionales en América Latina: un panorama**. 2da Edición. Génesis. La Paz - Bolivia. p. 37
- Holland, M., & Parsons, T. 1999. **Mitochondrial ADN sequence analysis – Validation and use for forensic casework**. Forensic Science Review 11: 22 -50 .
- Horai, S., Kondo, R., Nakagawa – Hattori, Y., Hayashi, S., Sonoda, S., & Tajima, K. 1993. **Peopling of the Americas, Founded by four Major Linajes of Mitochondrial ADN**. Molecular Biology and Evolution. 10 (1):23-47.
- Howe, J., Klimstra, D., Cordon – Cardo, C. 1997. **DNA extracción from paraffin-embedded tissues using a salting- out procedure: a realizable method for PCR amplification of archival material**. Histologia and Histopathology. 12: 595-601.
- Ibarra D., 2000. **Pueblos Idígenas en Bolivia**. Librería Editorial “G.UM” La Paz – Bolivia . p 451
- INE, 2001. **Características sociodemográficas de la población indígena**. Actualizado: 20 julio de 2011. Consultado: 27 de septiembre de 2011. <http://www.ine.gob.bo/indice/EstadisticaSocial.aspx?codigo=30801>
- Izaguirre N., & De La Rúa C., 2000. **Aportación de la biología molecular al estudio antropológico de las poblaciones humanas del pasado: análisis del ADN mitocondrial**. Revista Española de Antropología Biológica 21: 1-10
- Klein H., & Shiffner D. 2003. **El Origen de los Amerindios: Debates Actuales**. Revista de Indias 63(227):19-30,
- Kopp A., & Díez A., 2009. **Uru Chipaya y Chullpa. Soberanía Alimentaria y Gestión Teritorial en dos culturas andinas**. Primera Edición. Bolivia. p 150.
- Koehler C., & Bauer M. 2004. **Mitochondrial function and biogenesis, the Topics in current genetics**. Volumen 8. Springer.- Verlag Berlin Heidelberg. Germany. p 333.
- Kumar, S., Reddy, R., Koneru, P., Urade, B., Sarkar, B., Chandrasekar, A., & Rao, V. 2009. **Reconstructing Indian- Australian phylogenetic link**. BMC Evolutionary biology 9: 173-178.

- López L., 2005. **De resquicios a boquerones: La educación intercultural bilingüe en Bolivia**. Plural Editores. La Paz – Bolivia. p. 34
- Lumbreras, L. 1999. **Historia de América. Las Sociedades Aborígenes**. Volumen 1. 1ra. Edición. LIBRESA. Quito – Ecuador. p. 607.
- Lum, J., Rickards, O., Ching, C., Cann, R. 1994. **Polynesian mitochondrial DNAs reveal three deep maternal lineage clusters**. Human Biology. 66:567-590.
- Lutz-Bonengel, S., Sanger, T., Pollak, S., & Szibor, R., 2004. **Different methods to determine length heteroplasmy within the mitochondrial control region**. International Journal of Legal Medicine. 118(5):274-281.
- Lutz, S., Weisser, H.J., Heizmann, J. y Pollak, S. 2000. **Mitochondrial heteroplasmy among maternally related individuals**. International Journal of Legal Medicine. 113, 155-161.
- Macaulay, V., Richards, M., Hickey, E., Vega, E., Cruciani, F., Guida, V., Scozzari, R., Bonne-Tamir, B., Sykes, B. y Torroni, A. 1999. **The emerging tree of West Eurasian mtADNs: a synthesis of control-region sequences and RFLPs**. American Journal of Human Genetics, 64, 232-249.
- Maca-Meyer, N., González, A., Larruga, J., Flores, C., Cabrera, V. 2001. **Major genomic mitochondrial lineages delineate early human expansions**. BMC Genetics. 2:13.
- Mansilla, A. 2004. **El Derecho Indígena y Las Pautas Para La Conformación De Una Línea Jurisprudencial Constitucional En Bolivia**. Universidad Gabriel René Moreno, Santa Cruz- Bolivia. p 200.
- Marrero, R., Silva-Junior, A., Bravi, C., Hutz, M., Petzl-Erler, M., Ruiz, A., Salzano, M., & Bortolini, M. 2007. **Demographic and evolutionary trajectories of the Guarani and Kaingang natives of Brazil**. American Journal of Physical Anthropology. 132(2):301-10
- Matallana M., & Cruzado J. 2010. **Estudios sobre ADN mitocondrial sugieren un linaje predominante en la cordillera Oriental de Colombia y un vínculo suramericano para los arcaicos de Puerto Rico. Artículo Original**. Universidad Médica Bogotá-Colombia. 51 (3): 241-272.

- Maxam, M., & Gilbert, W. 1977. **New method for sequencing ADN**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 74:560-564.
- McLean, D., Spruill, I., Argyropoulos, G., Page, G., Shriver, M., & Gravey M. 2005. **Mitochondrial ADN (mtADN) Haplotypes Reveal Maternal Population Genetic Affinities of Sea Island Gullah-Speaking African Americans**. American Journal of Physical Anthropology 127: 427 – 438.
- Metzker, M. 2005. **Emerging technologies in DNA sequencing**. Genome Research. 15: 1767- 1776.
- Miller, S., Dykes, D., & Polesky, F. 1988 **A simple salting out procedure for extracting ADN from human nucleated cells**. Nucleic Acids Research 16: 3.
- Miller, R., & Kwok, P. 2001. **The birth and death of human single- nucleotide polymorphisms: new experimental evidence and implicatios for human history and medicine**. Human Molecular Genetics. 10: 2195- 219.
- MINISTERIO DE EDUCACIÓN. 2008. **Saberes y conocimientos del pueblo ayoreo**. Viceministerio de Educación Escolarizada Alternativa y Alfabetización. Programa de Educación Intercultural Bilingüe de Tierras Bajas. Santa Cruz.
- MITOMAP: A Human Mitochondrial Genome Database. <http://www.mitomap.org>, 2011.
- Molina, R., & Albó X. 2007 **GAMA ÉTNICA Y LINGÜÍSTICA DE LA POBLACIÓN BOLIVIANA**. La Paz, PNUD, pág. 70.
- Montiel, R. 2000. **Estudio Diacrónico de la Variabilidad del DNA Mitochondrial en Población Catalana**. Tesis Doctoral. Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología. Universidad Autónoma de Barcelona. p. 488
- Morales, P. 2001. **Pueblos indígenas, derechos humanos e interdependencia global**. Editores Siglo XXI. p 282
- Moreno, O. 2011 . **Genoma Humano Y Derecho. Resultados de la investigación y su impacto en la argumentación jurídica**. Editor Palibrio. Estados Unidos de América. p 354
- Morovvati, S. Modarresi, M., Habibi G., Kiarudi Y. Karami, A., Asghar, A. 2007. **A. Sequence Analysis of Mitochondrial ADN Hypervariable Regions: An**

- Approach to personal identification.** Archives of Medical Research 38: 3445 – 349
- MUSEF 2009. **Sala Cultura Uru-Chipaya.** Actualizado 2009 – 02-03. Consultado. 2009-02-18. <http://www.musef.org.bo/cgi-bin/koha/musef/musef-sucre.pl?op=3>.
- National Geographic Society. 2010. Genographic Project. Actualizado 2010-06-10. Consultado 2010- 06- 12. <http://www.genographic.nationalgeographic.com>
- Oliva, R. Ballesta, F., Oriola, Josep. & Clària, J., 2004. **Genética Médica.** 3a ed. Edicions Universitat Barcelona. Barcelona – España. p. 346
- Oliva, R. & Vidal, J. 2006. **Genoma humano: nuevos avances en investigación, diagnóstico y tratamiento.** Volumen 2 de UBe: Medicina. Edicions Universitat Barcelona. p 215.
- Oppenheimer, S., & Richards, M. 2001. **Fast trains, slow boats, and the ancestry of the Polynesian islanders.** Science Progress 84: 157-181.
- Ortiz, A. & Orozpe, M. 1998. **Introducción a Mesoamérica.** 2da. Edición. UNAM. México D.F. p 94
- Paneto, G., Martins, J., Longo, L., Pereira, G., Freschi, A., Alvarenga, V., Chen, B., Oliveira, R., Hirata, M., & Cicarelli., 2007. **Heteroplasmy in hair: Differences among hair and Blood From the same individuals are still a matter of debate.** Forensic Science International 173: 117-121.
- Parellada, A. 2006. **Pueblos indígenas en aislamiento voluntario y contacto inicial en la Amazonía y el Gran Chaco: actas del seminario regional de Santa Cruz de la Sierra.** IWGIA. Lima- Perú. 386 páginas
- Passarge, E. 2007. **Genética: Texto y Atlas.** 3ra Edición, Revisada y Ampliada. Editorial Médica Panamericana, S. A. España. p. 545.
- Pereira, L., Macaulay, V., Torroni, A., Scozzari, R., Prata, M.J. & Amorim, A. 2001. **Prehistoric and historic traces in the mtADN of Mozambique: insights into the Bantu expansions and the slave trade.** Annal of Human Genetics, 65, 439-458.
- Pereira dos Santos, C. 2005. **Estudio Genético y Biográfico del Archipiélago de las Azores (Portugal).** Tesis Doctoral. Departamento de Biología Animal,

Biología Vegetal y Ecología de la Universidad Autónoma de Barcelona.  
Universitat Autònoma de Barcelona. p. 286.

- Pierce, B. 2009. **Genética. Un enfoque conceptual.** 3ra Edición. Editorial Médica Panamericana. p. 806
- Picornell, A., Gómez-Barbeito, L., Tomàs, C., Castro, J., & Ramon, M. 2005. **Mitochondrial ADN HVRI Variation in Balearic Populations.** American Journal of Physical Anthropology 128:119 –130
- Piñero, D., Barahona, A., Eguiarte, L., Olivares, A., & Lizana, R. 2008. **La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México,** en Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. Conabio, México, pp. 435.
- Posada, D., Crandall, K. 2001. **Selecting the Best- Fit modelo f nucleotide substitution.** Systematic Biology 50: 580-601.
- Rivero, W. 2010 **Pueblos Indígenas de Bolivia. Ayoreo.** Actualizado. 2010- 02-05. Consultado.2010-02-09  
[http://www.amazonia.bo/mas\\_detalle\\_proi.php?id\\_contenido=3](http://www.amazonia.bo/mas_detalle_proi.php?id_contenido=3)
- Ronaghi, M. 2003. **Pyrosequencing for SNP genotyping.** Methods Molecular Biology. 212: 189-195.
- Rondón, F., Osorio, J., Peña, A., Garcés, A., & Barreto, G.. 2008. **Diversidad genética en poblaciones humanas de dos regiones colombianas.** Colombia Médica Vol. 39 (2): 52-60
- Rothhammer, F. & Llop, E. 2004. **Poblaciones chilenas: cuatro décadas de investigaciones bioantropológicas.** Editorial Universitaria. Santiago, Chile. p 99
- Sala, A., Alechinea, E., Bobilloa, C., Merinib, L., Ayalac, C., Acosta, J., & Corach, D. 2009. **Mitochondrial ADN control region sequence analysis of Mataco–Guaicurú speaking tribes from Argentina.** Forensic Science International: Genetics Supplement Series. 2 (1): 331-333
- Saitou, N. & Nei, M. 1987. **The Neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees.** Molecular Biology Evolution, 4(4): 406 – 425.

- Sandoval, J., Delgado, B., Rivas, L., Bonilla, B., & Fujita, R. 2004. **Variantes del ADNmt en isleños del lago Titicaca: máxima frecuencia del haplotipo B1 y evidencia de efecto fundador.** *Revista Peruana de Biología*. 11: 2
- Sanger, F, Nicklen, S, & Coulson, R. 1977. **ADN sequencing with chain-terminating inhibitors.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América*. 74: 5463-5468.
- Schurr, T., Ballinger, S., Gan, Y-Y., Hodge, J., Merriwether, D., Lawrence, D., Knowler, W., Weiss, K., & Wallace, D. 1990. **Amerindian mitochondrial ADNs have rare Asian mutations at high frequencies suggesting they derived from four primary maternal lineages.** *American Journal of Human Genetics*, 46: 613-623.
- Schurr, T., Ballinger, S., Gan, Y-Y., Hodge, J., Merriwether, D., Lawrence, D., Knowler, W., Weiss, K., & Wallace, D. 1990. **Amerindian mitochondrial DNAs have rare Asian mutations at high frequencies suggesting they derived from four primary maternal lineages.** *American Journal of Human Genetics*, 46: 613-623.
- Schwartz, M., & Vissing J., 2003. **New patterns of inheritance in mitochondrial disease.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 310: pp. 247-251.
- Schwartz, M. & Vissing, J. 2004. **No evidence for paternal inheritance of mtADN in patients with sporadic mtADN mutations.** *J Neurol Sci*, 218, 99-101
- Sheffler, I. 2008. **Mitochondria.** 2da Edición. Wiley – Liss. California. p107.
- Sikes, B., Leibold, A., Low-Beer, J., Tetzner, S., Richards, M. 1995. **The origins of the Polynesians: an interpretation from mitochondrial lineage analysis.** *American Journal Genetics* 57: 1463- 1475
- Silva, O. 2006. **Civilizaciones prehispánicas de América. El Saber y la cultura.** 8va. Edición. Editorial Universitaria. Santiago de Chile. p 195.
- Singh, A., Charma Ch., Kumar S., & Singh N. 2005. **Las mutaciones en el ADN mitocondrial D-loop Región son frecuentes en el cáncer cervical.** *Cancer Cell International* 5:34.

- Sodi, D. 1992. **Las grandes culturas de Mesoamérica desde la llegada del hombre al continente americano hasta la última de las culturas prehispánicas.** 1ra Edición. Panorama Editorial. México D.F. p199.
- Solórzano, E. 2006. **De la Mesoamérica Prehispánica a la Colonial: La huella del ADN antiguo.** Tesis Doctoral. Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología, Universidad Autónoma de Barcelona. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona –España. p. 225.
- Stanyon, R., Sazzini, M., Luiselli, D. 2009. **Timing the first human migration into eastern Asia.** *Journal of Biology* 8:2-4.
- Starikovskaya, Y., Sukernik, R., Shurr, T., Kogelnik, A., & Wallace, D.1998. **mtADN Diversity in Chukchi and Siberian Eskimos: Implications for the Genetic History of Ancient Beringia and The Peopling of the New World.** *The American Journal of Human Genetics.* 63:1473-1491.
- Stoneking, M., Jorde, L., Bhatia, K., & Wilson, A., 1990. **Geographic Variation in Human Mitochondrial ADN from Papua New Guinea.** *Genetics* 124: 717-733
- Sutcliffe, Bob 1998. **NACIDO EN OTRA PARTE: UN ENSAYO SOBRE LA MIGRACION INTERNACIONAL, EL DESARROLLO Y LA EQUIDAD.** Volumen 1. Hegoa. Bilbao – España. p 186.
- Sutovsky, P., Moreno, D., Ramalho-Santos, J., Dominko, T., Simerly, C. & Schatten, G. 2000. **Ubiquitinated sperm mitochondria, selective proteolysis, and the regulation of mitochondrial inheritance in mammalian embryos.** *Biology Reproduction* 63: 582-590.
- Szathamary, E. 1993. **mtADN and the peopling of the Americas.** *American Journal of Human Genetics,* 53: 793-799.
- Tamura, K., & Nei, M.1993. **Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees.** *Molecular Biology and Evolution* 10:512-526.
- Taylor, W., McDonnell, T., Blakely, L., Chinnery, F., Taylor, A., Howell, N., Zeviani, M., Briem, E., Carrara, F. & Turnbull, M. 2003. **Genotypes from patients**

**indicate no paternal mitochondrial ADN contribution.** *Annal of Neurology.* 54, 521-524

- Terrerros, G. 2010. **Determinación de la Variación de las secuencias de las regiones HVI y HVII de la región control del DNA mitocondrial en una muestra de la población Caribe Colombiana.** Tesis de Maestría. Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses. Pontifica Universidad Javeriana. p. 115.
- Thompson, M., Nussbaum, R., Thompson, J., McInnes, R., & Williard, H. 2004. **Genética en medicina.** 7a Edición. Elsevier Masson. Barcelona - España.p. 470.
- Torrioni, A., Shurr, G., Yang, C –C., Szathmary, E., Williams, C., Shanfield, S., Troup, A., Knowler, C., Lawrence, N., Weiss, M., & Wallace, C.1992. **Native American mitochondrial ADN analysis indicates that the Amerind and NaDene populations were founded by two independent migrations.** *Genetics* 130: 153-162.
- Torrioni, A., Schurr T., Cabell M., Brown M., Neel J., Larsen M., Smith D., Vullo C., & Wallace D. 1993a. **Asian Affinities and Continental Radiation of the Four Founding Native American mtADNs.** *The American Journal of Human Genetics.* 53:563-590.
- Torrioni, A., Sukernik R., Schurr T., Sarikovskaya Y., Cabell M., Crawford M., Comuzzie A., & Wallace D. 1993b. **mtADN Variation of Aboriginal Siberians Reveals Distinct Genetic Affinities with Native Americans.** *The American Journal of Human Genetics.* 53:591-608.
- Tully, G., Bar, W., Brinkmann, B., Carracedo, A., Gill, P., Morling, N., Parson, W., & Schneider, P. 2001. **Considerations by the European ADN profiling (EADNP) group on the working practices, nomenclature and interpretation of mitochondrial ADN profiles.** *Forensic Science Internatinal.* 124: 83-91.
- Tully, G., Barritt, M., Bender, K., Brignon, E., Capelli, C., Dima-Simonin, N., Eichmann, C., Ernst, M., Lambert, C., Lareu, V., Ludes, B., Mevag, B., Parson, W., Pfeiffer, H., Salas, A., Schneider, M., & Staalstrom, E. 2004.

**Results of a collaborative study of the EADNP group regarding mitochondrial ADN heteroplasmy and segregation in hair shafts.**  
Forensic Science International. 10;140(1):1-11.

- Van Oven M, Kayser M. 2009. **Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation.** Hum Mutat 30(2):E386-E394.  
doi:10.1002/humu.20921
- Vega-Pla, J., De Andrés Cara, D., Garrido, J., Dorado, G. 1998. **Propuesta de metodología para la localización de microsatélites en el genoma equino.** Archivos de Zootecología 48: 189-194.
- Verea, A. 2011, **Linajes del Cromosoma Y humano: Aplicaciones genético – Poblacionales y Forenses.** Tesis de Doctorado. Facultad de Medicina e Odontología. Universidad Santiago de Compostela. p 400
- Wallace, D., Garrinson K. & Knowler W. 1985. **Dramatic founder effects in Amerindian mitochondrial DNAs.** American Journal of Physical Anthropology, 68: 149-155.
- Wallace, D. 1994. **Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 8739-8746.
- Wallace, D., Brown, M. & Lott, M. 1999. **Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease.** Gene 238: 211 - 230
- Ward, R., Frazier, B., Dew –Jager, K., & Pääbo, S. 1991. **Extensive mitochondrial Diversity within a single Amerindian tribe.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 88: 8720-8724
- Wiens, J., Servedio, M. 2000. **Species delimitation in systematics: inferring diagnostic differences between species.** Proceeding of the Royal Society of London B 267: 631- 636.
- Wilson, M. R., Polanskey, D., Butler, J. M., DiZinno, J. A., Replogle, J., Budowle, B. 1995. **Extraction, PCR amplification, and sequencing of mitochondrial DNA from human hair shafts.** Biotechniques 18: 662–669.
- Zhang, W., & Sun, Z. 2008. **Random local neighbor joining: a new method for reconstructing phylogenetic trees.** Molecular Phylogenetics and Evolution 47: 117-128.

## XVII. GLOSARIO

**Alelo:** Cada una de las formas alternativas de un gen que ocupa la misma posición en cada par de cromosomas homólogos.

**Animadversión:** Enemistad, ojeriza u odio.

**Codón:** Es un triplete de nucleótidos. Es la unidad básica de información en el proceso de traducción. Cada codón codifica un aminoácido y esta correspondencia es la base del código genético.

**Cuello de Botella:** En biología se dice que una población o especie ha sufrido una situación de Cuello de Botella cuando ha experimentado un drástico descenso en el número de miembros en algún momento del pasado, llegando en algunos casos a estar al borde de la extinción. Como consecuencia, los ejemplares de las generaciones posteriores al cuello de botella presentan una escasa variabilidad genética y la antigua proporción de alelos en el conjunto de la población ha cambiado considerablemente.

**Deriva genética:** es una fuerza evolutiva que actúa junto con la selección natural cambiando las características de las especies en el tiempo. Se trata de un cambio aleatorio en la frecuencia de alelos de una generación a otra. Normalmente se da una pérdida de los alelos menos frecuentes y una fijación (frecuencia próxima al 100%) de los más frecuentes, resultando una disminución en la diversidad genética de la población.

**Divergencia:** Alejamiento progresivo entre sí de dos o más líneas o superficies.

**Diversidad genética:** Variación en la composición de la información genética o unidades hereditarias (genes) contenida en todas las especies vivientes, encontradas en una área específica y que pueden reproducirse entre sí a través del tiempo.

**Gen:** Un gen es un segmento corto de ADN, que le dice al cuerpo cómo producir una proteína específica. Hay aproximadamente 30,000 genes en cada célula del cuerpo humano y la combinación de todos los genes constituye el material hereditario para el cuerpo humano y sus funciones. La composición genética de una persona se llama genotipo.

**Efecto fundador:** Se conoce como Efecto Fundador a las consecuencias derivadas de la formación de una nueva población de individuos a partir de un número muy reducido de éstos. Para los miembros de esta nueva población y sus descendientes es como si el resto de los individuos de su especie hubiesen desaparecido.

**Electroferograma:** La representación de los alelos en forma de picos después de la separación por electroforesis y detección electrónica.

**Evolución:** Desarrollo de las cosas o de los organismos, por medio del cual pasan gradualmente de un estado a otro. La evolución biológica es el proceso continuo de transformación de las especies a través de cambios producidos en sucesivas generaciones, que se ve reflejado en el cambio de las frecuencias alélicas de una población.

**Fenotipo:** En un organismo, manifestación externa de un conjunto de caracteres hereditarios que dependen tanto de los genes como del ambiente.

**Haplotipo:** Grupo de Alelos en acoplamiento en loci estrechamente ligados que generalmente se heredan como una unidad. Conjunto de SNPs de un gen que al estar muy cercanos tienden a heredarse juntos.

**Linaje:** Línea de ascendencia o descendencia de una familia o clan. En términos genealógicos, es la serie de ascendientes y/o descendientes, en cualquier familia, de una persona considerada como el primero de un tronco o rama común.

**Locus:** Lugar en un mapa genético en el que reside una mutación o un gen particular; a menudo se usa en lugar de mutación o gen. Región del cromosoma. Sitio específico del ADN.

**Marcador Genético:** Alelo cuya herencia está en observación en un cruzamiento. Secuencias conocidas de ADN que se usan para señalar el genoma. Cualquier característica que sirva para identificar una región particular del ADN.

**Migración:** Movimiento de individuos de una población a otra, que resulta en la transferencia de material genético que puede cambiar las frecuencias génicas en la población receptora.

**Mutación:** Proceso mediante el cual un gen sufre un cambio en su estructura, a menudo originados durante la replicación del mismo.

**Paleoindio:** Es la era más larga de la prehistoria americana. Parte desde el advenimiento de los primeros pueblos asiáticos al cruzar el Puente de Beringia desde hace aproximadamente 40 000 años hasta hace 10 000 años, con el descubrimiento de la agricultura en Mesoamérica.

**Pleistoceno:** Una división de la escala temporal geológica, es una época geológica que comienza hace 2,59 millones de años y finaliza aproximadamente 12.000 años AP (antes del presente), precedida por el Plioceno y seguida por el Holoceno.

**Polimorfismo:** La presencia de varias formas (de un rasgo o de un gen) en una población; la proporción de loci génicos polimórficos en una población. Es la existencia de dos o más elementos genéticos contrastantes en una población a frecuencias mayores que las que pueden ser debidas a mutaciones recurrentes. El polimorfismo se debe a mutaciones, deleciones e inserciones de ATCG.

**Secuenciación:** Método que permite determinar el ordenamiento lineal de los nucleótidos en un ácido nucleico o de los aminoácidos en una proteína.

**Selección natural:** Reproducción diferencial de genotipos alternativos debida a una eficacia biológica variable. Mecanismo evolutivo que comprende la selección de individuos con adaptabilidad superior, en términos de fertilidad y fecundidad en relación con otros individuos de la misma población.

**SNP:** Un SNP o polimorfismo en un sólo nucleótido es una variación de un sólo nucleótido entre genomas de individuos de la misma especie.

**Transición:** Mutación por sustitución en un par de bases que resulta de la sustitución de una purina por otra purina o una pirimidina por otra pirimidina.

**Transversión:** Mutación por sustitución de un par de bases que da como resultado la sustitución de una purina por una pirimidina y viceversa.

**Variabilidad Genética:** Es la variación en el material genético de una población o especie, e incluye los genomas nuclear, mitocondrial y ribosomal, además de los genomas de otros orgánulos. La variabilidad genética nueva puede estar causada por mutaciones, recombinaciones y alteraciones en el cariotipo. Los procesos que afectan la variabilidad genética son la selección natural y la deriva genética

## **XVIII. ANEXOS**

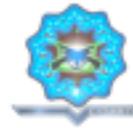
### ***a. ANEXO 1: CONSENTIMIENTO INFORMADO***



## CONSENTIMIENTO INFORMADO

(Página 1 de 2)

Documento de conformidad para participar en el proyecto "Filogeografía de los pueblos indígenas Uru y Ayoreo basada en el estudio del ADN mitocondrial"



NOMBRES Y APELLIDOS DEL PARTICIPANTE : \_\_\_\_\_

SEXO: M F EDAD: \_\_\_\_\_ GRUPO ÉTNICO: \_\_\_\_\_ LENGUA: \_\_\_\_\_

LUGAR DE NACIMIENTO: \_\_\_\_\_

LENGUA MATERNA: \_\_\_\_\_ GRUPO ÉTNICO DE LA MADRE: \_\_\_\_\_

LENGUA DE LOS ABUELOS MATERNOS: \_\_\_\_\_ OTROS: \_\_\_\_\_

GRUPO ÉTNICO DEL ABUELOS MATERNOS: \_\_\_\_\_

LENGUA PATERNA: \_\_\_\_\_ GRUPO ÉTNICO DEL PADRE: \_\_\_\_\_

LENGUA DE LOS ABUELOS PATERNOS: \_\_\_\_\_ OTROS: \_\_\_\_\_

GRUPO ÉTNICO DEL ABUELOS PATERNOS: \_\_\_\_\_

### FUNDAMENTO

El Proyecto pretende obtener información histórica a partir de datos genéticos de dos poblaciones indígenas de Bolivia: Uru y Ayoreo que están geográficamente distantes y son tradicional y culturalmente diferentes. Estas poblaciones, mencionan en su historia ser los primeros habitantes de esta zona geográfica, indicando que a partir de ellos se desarrollaron el resto de naciones indígenas del país. Para obtener esta información, se estudiará el material genético, ya que en este está conservada la información hereditaria que recibimos de nuestros padres y éstos, a su vez, de sus padres y así desde nuestros primeros ancestros.

El material genético, que conocemos comúnmente como ADN, es un compuesto muy pequeño e importante, pues gracias a él se controlan todas las funciones de nuestro cuerpo. Cada persona recibe el material genético por herencia de su padre y madre. Mientras más emparentados están los grupos humanos, habrá menos diferencias entre las personas y mientras menos emparentados, habrán más diferencias. Por eso, estudiando las cercanías y diferencias que encontramos del ADN entre distintas personas de distintos sitios, podemos tratar de encontrar su parentesco.

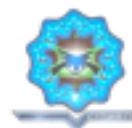
El estudio comprende dos partes, la primera en explicarle el objetivo del proyecto y la segunda en caso de que usted elija participar, se le realizará preguntas como por ejemplo: su nombre, edad, dónde nació, su lengua materna y paterna. Luego, el investigador realizará la toma de muestra de hisopado bucal para el análisis genético, y las muestras respectivas para los análisis de sangre y orina, los cuáles se realizarán en centros de salud de la comunidad apoyados por el programa nacional de Salud Renal (PNSR) del Ministerio de Salud y Deportes. La obtención del material genético se realizará luego en el Centro de Investigación Genética de la Policía Boliviana y en laboratorios de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés, teniendo el cuidado estricto de conservación de su muestra y su confidencialidad.



## CONSENTIMIENTO INFORMADO

(Página 2 de 2)

Documento de conformidad para participar en el "Proyecto Filogeografía de los pueblos indígenas Uru y Ayoreo basada en el estudio del ADN mitocondrial"



Este estudio nos permitirán obtener datos acerca de la variabilidad genética de su población así como su antigüedad y las relaciones con otros pueblos, haciendo énfasis en las relaciones entre los pueblos indígenas Uru y Ayoreo.

Si usted decide primero participar en este proyecto y en un futuro próximo prefiere dejar de participar del proyecto puede contactarse con los investigadores responsables e indicarles que destruyan su información personal en el proyecto, o también, puede permitirnos conservarla en el Centro de Investigación Genética de la Policía Boliviana, de manera que pueda ser utilizada para futuros estudios. Solamente habrá conexión entre la información de su ADN y su código secreto.

Legalmente, cada participante es dueño de su muestra. Esto significa que: **Usted puede indicarnos en cualquier momento destruir su muestra y la información relacionada a su persona.**

### DECLARACIÓN DE CONFORMIDAD

"Yo....., he sido informado de manera verbal, he leído y comprendido la información escrita en el consentimiento informado y he tenido la oportunidad de hacer preguntas y resolver dudas. Por esto, **ACEPTO VOLUNTARIAMENTE** participar en este estudio"

Asimismo deseo que mi muestra sea (indique una de las dos opciones):

- Conservada, para futuros estudios después de finalizado el presente proyecto  
 Destruída, cuando finalice este proyecto

Firma del Participante \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

Carné de identidad \_\_\_\_\_

Firma del Padre de Familia, Tutor o Apoderado \_\_\_\_\_

Nombres, Apellidos y Firma del Investigador Responsable \_\_\_\_\_

***b. ANEXO 2: PROTOCOLO DE OBTENCIÓN DE ADN. MODIFICADO DE MILLER et al., (1988) y KIT WIZARD GENOMIC DNA PURIFICATION (PROMEGA).***

1. Al hisopo colocado en un buffer de Lisis (Sol. de Lysis Nuclei – kit WIZARD GENOMIC DNA PURIFICATION -PROMEGA), se le añadió 7uL de Proteínasa K (20mg/dL).
2. Incubar a 65°C por 30 min.
3. Añadir 66ul de NaCl 6M a -20°C por 5 min.
4. Centrifugar a 18000g a 4°C por 5min.
5. Recuperar el sobrenadante y añadir 700 uL de Isopropanol, agitar e incubar a -20°C por 5 min.
6. Centrifugar a 18000g a 4°C por 5min.
7. Desechar sobrenadante y añadir 1 mL de Etanol al 70%, agitar.
8. Centrifugar a 18000g a 4°C por 5 min. Desechar el sobrenadante.
9. Dejar secar a 65°C por 15 min.
10. Rehidratar con 50 uL de TE (Tris HCL y EDTA).

c. **ANEXO 2: INSTRUCCIONES KIT BIG DYE TERMINATOR CYCLE SEQUENCING V. 3.1.**

**Cycle Sequencing Single- and Double-Stranded DNA**

**Overview** This section describes how to prepare reactions and perform cycle sequencing on a variety of templates, including M13, plasmids, and PCR products.

**Preparing the Reactions for 96-Well Reaction Plates or Microcentrifuge Tubes** The type of tube required depends on the thermal cycler that you are using. Refer to "Materials for Cycle Sequencing" on page 1-12.

To prepare the reaction mixtures:

Step	Action	
1	For each reaction add the following reagents to a separate tube:	
	<b>Reagent</b>	<b>Quantity</b>
	Terminator Ready Reaction Mix	8.0 $\mu$ L
	Template	See the table in "Template Quantity" on page 2-6.
	Primer	3.2 pmol
	Deionized water	<i>q.s.</i>
	Total Volume	20 $\mu$ L
2	Mix well and spin briefly.	
3	<b>If using the DNA Thermal Cycler (TC1) or DNA Thermal Cycler 480:</b>	
	Overlay reaction mixture with 40 $\mu$ L of light mineral oil.	

**Cycle Sequencing on the System 9700, 9600, or 2400** To sequence single- and double-stranded DNA on the GeneAmp® PCR System 9700 (in 9600 emulation mode), 9600, or 2400:

Step	Action
1	Place the tubes in a thermal cycler and set the volume to 20 $\mu$ L.
2	Repeat the following for 25 cycles:
	• Rapid thermal ramp <sup>a</sup> to 96 °C
	• 96 °C for 10 seconds.
	• Rapid thermal ramp to 50 °C
	• 50 °C for 5 seconds.
	• Rapid thermal ramp to 60 °C
• 60 °C for 4 minutes	
3	Rapid thermal ramp to 4 °C and hold until ready to purify.
4	Spin down the contents of the tubes in a microcentrifuge.
5	Proceed to Chapter 4, "Purifying Extension Products."

a. Rapid thermal ramp is 1 °C/second.