

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
SISTEMA DE ESTUDIO DE POSGRADO**

**VARIACIÓN EN EL ADN MITOCONDRIAL DE LA POBLACIÓN TERIBE DE  
PANAMÁ**

**Tesis sometida a la consideración del Programa de Estudios de Posgrado en  
Biología para optar al grado y título de Maestría Académica en Biología con  
énfasis en Genética y Biología Molecular**

**MÉLIDA INÉS NÚÑEZ CASTILLO**

**Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica**

**2012**

## **DEDICATORIA**

Este trabajo es dedicado a la memoria del doctor Tomás Domingo Arias de Para, quien fue en vida mi mentor.

Al pueblo teribe que hizo posible este trabajo.

## AGRADECIMIENTOS

Primeramente quiero agradecer al Servicio de Intercambio Alemán (DAAD), por haber financiado mis estudios de maestría.

Al Dr. Ramiro Barrantes por su apoyo y guía durante todo el tiempo que duro la maestría, y a los lectores: Dr. Jorge Azofeifa y la Dra. Silvia Salgado por su tiempo y asesoría en la revisión de este documento.

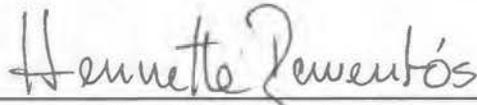
Al posgrado en Biología de la Universidad de Costa Rica y a sus profesores por contribuir en mi formación académica.

La Dra. Oris Sanjur y al Dr. Mattew Miller del Instituto Smithsonian, por el apoyo y consejos ofrecidos.

A las MSc Sherezada Umanzör y Ana Morales por toda la ayuda logística y metodológica que hizo posible la realización de este trabajo.

A mis padres por los genes y el ambiente.

“Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Biología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar por el grado y título de Maestría Académica en Biología con énfasis en Genética y Biología Molecular.”



---

Dra. Henriette Raventós Vorst  
**Representante de la Decana  
Sistema de Estudios de Posgrado**



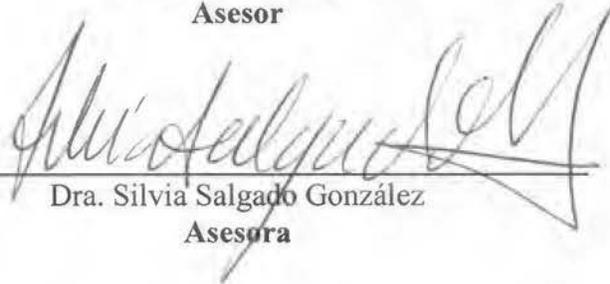
---

Dr. Ramiro Barrantes Mesén  
**Director de tesis**



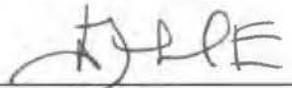
---

Dr. Jorge Azofeifa Navas  
**Asesor**



---

Dra. Silvia Salgado González  
**Asesora**



---

Dr. Alejandro Leal Esquivel  
**Representante del Director  
Programa de Posgrado en Biología**



---

Mérida Inés Núñez Castillo  
**Candidata**

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Página</b>
<b>DEDICATORIA</b>	ii
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	iii
<b>HOJA DE APROBACIÓN</b>	iv
<b>TABLA DE CONTENIDO</b>	v
<b>RESUMEN</b>	vii
<b>LISTA DE CUADROS</b>	viii
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	ix
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	xi
<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
A. Las poblaciones chibchas de Baja Centroamérica	1
B. Estudios sobre el ADN mitocondrial en las poblaciones chibchas de Baja Centro América	3
B.1. Etnohistoria del grupo amerindio teribe	8
C. Análisis genéticos sobre el origen de las poblaciones amerindias de la Baja América Central utilizando ADN mitocondrial	14
D Justificación	23
<b>OBJETIVOS</b>	24
<b>METODOLOGÍA</b>	25
A. Población estudiada	25
B. Trabajo de laboratorio	26
B.1. Extracción de ácidos nucleicos	27
B.2. Amplificación mediante PCR	28

	<b>Página</b>
B.3. Análisis y alineamiento de secuencias	31
C. Análisis poblacionales	31
C.1.    Porcentaje de sitios polimórficos	31
C.2.    Diversidad haplotípica y nucleotídica	32
C.3.    Pruebas de neutralidad	32
C.4.    Distribución de las diferencias por parejas	33
D. Análisis filogenéticos	34
<b>RESULTADOS</b>	<b>35</b>
A. Caracterización de la variación genética en el ADNmt de los teribes a nivel de secuencias.	35
B. Medidas de diversidad genética y neutralidad	43
C. Distribución de diferencias por parejas	47
D. Análisis filogenéticos	52
D.1. Relaciones filogenéticas	52
D.2. Redes medias vecinas	55
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>57</b>
A. Variación genética	57
B. Análisis filogenéticos	61
C. Patrones demográficos históricos inferidos	65
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>69</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>71</b>

## RESUMEN

La variación genética a nivel mitocondrial de los teribes de Panamá, fue estudiada mediante la evaluación de los tres segmentos hipervariables de la región control de su ADNmt. En esta etnia se identificaron 24 eventos de sustitución nucleotídica, los mismos mostraban una mayor tendencia hacia las transiciones que hacia las transversiones. Los teribes presentaron heteroplasma por posición registrada en las posiciones 312 y 16526 y heteroplasma por longitud de unidades de repetición en las posiciones 513-529, esta etnia también presentó una reducida diversidad genética, al igual que otras tribus amerindias del continente.

La información censal y la evidencia histórica corroboraron los valores del estadístico D de Tajima el cual sugiere que los teribes posiblemente pasaron por un cuello de botella reciente. Por otra parte las distribuciones de diferencias entre parejas y la datación de las redes medias vecinas para un conjunto de nueve poblaciones chibchas indicaron un tiempo de expansión estimado entre 8,783 – 13,333 años, este intervalo de tiempo abarca el periodo en que ocurrió la divergencia del protochibcha, el tiempo máximo de expansión estimado también podría estar vinculado con la entrada de los primeros humanos al continente, hace aproximadamente entre 14,000 – 27,000 años.

La reconstrucción de las relaciones filogenética se realizó mediante el método estadístico de distancias del vecino más cercano sin raíz para ilustrar las relaciones entre las poblaciones chibchas de la región de Talamanca, este de Panamá y la parte norte de Colombia. De acuerdo con la filogenia los teribes presentaron una mayor afinidad genética con los grupos talamanqueños del oeste de Panamá y sur de Costa Rica, mientras que con los grupos chibchas del este y norte de Colombia los mismos mostraban una menor afinidad genética, este patrón de agrupamiento corrobora las divisiones de los grupos indígenas de Panamá que había establecido Torres-Arauz en 1980, en donde había agrupado a los kunas en una división que incluía las tribus del archipiélago de las mulatas o San Blas y a las de Darién, mientras que la agrupación Talamanca incluía a algunas tribus del oeste de Panamá y sur de Costa Rica, por lo que dadas las evidencias arqueológicas y antropológicas, las interacciones comerciales y sociales de estas poblaciones en el pasado pudieron haber generado algún tipo de contacto biológico en algunos grupos, lo que pudo haber generado el patrón de afinidad que se observó en el análisis filogenético de estas poblaciones.

## LISTA DE CUADROS

	<b>Página</b>
Cuadro 1. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados	29
Cuadro 2. Parámetros de amplificación	30
Cuadro 3. Condiciones por reacción de la mezcla maestra para la PCR	30
Cuadro 4. Frecuencias relativas de eventos de sustitución en la región control del ADNmt de los teribes	38
Cuadro 5. Secuencias observadas en la región control del ADNmt de lo teribes	43
Cuadro 6. Diversidad genética del HVS-I del ADNmt en poblaciones chibchas de Baja Centroamérica y Sur América	44
Cuadro 7. Diversidad genética en la región control del ADNmt de los teribes y valores de los estadísticos D de Tajima y Fs de Fu	45
Cuadro 8. Valores de probabilidad de los estadísticos D de Tajima, F de Ewens-Watterson y Fs de Fu para los tres segmentos hipervariables de la región control del ADNmt de los teribes	47

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Figura 1. Representación esquemática del genoma del ADNmt Humano	5
Figura 2. Antiguo territorio teribe	9
Figura 3. Filogenia generada a partir de marcadores microsatelíticos del cromosoma Y	21
Figura 4. Relaciones filolingüísticas entre amerindios de Norte, Centro y Sur América	22
Figura 5 Actual territorio teribe	26
Figura 6. Posiciones variables en el asa D del ADNmt de amerindios teribes de Panamá	36
Figura 7. Transiciones y transversiones presentes en las regiones estudiadas	37
Figura 8. Distribución de la variabilidad genética por posición en base a los niveles de entropía	40
Figura 9. Variabilidad genética por región de acuerdo con los niveles de entropía	41
Figura 10. Distribuciones de las diferencias entre pares de secuencias del HVS-I del ADNmt de los teribes	49
Figura 11 Distribución de diferencias entre pares de secuencias del HVS-I del ADNmt de poblaciones chibchas de la Baja Centroamérica y norte de Colombia	50

	<b>Página</b>
Figura 12. Reconstrucción de las relaciones filogenéticas utilizando el método de distancias del vecino más cercano sin raíz	51
Figura 13. Reconstrucción del estado ancestral para la posición 16111 del HVS-I de la región control del ADNmt de amerindios chibchas de Costa Rica, Panamá y Colombia	54
Figura 14. Red filogenética de medias vecinas	56

## LISTA DE ABREVIATURAS

### MAYÚCULAS

ADNmt	ADN mitocondrial
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
CO	Citocromo oxidadaasa
HVS	Segmento hipervariable
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina en estado reducido
OXPHOS	Sistema de fosforilación oxidativa mitocondrial
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RFLPs	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
NaCl	Cloruro de Sodio
ACD	Citrato de ácido cítrico y desxtrosa
SE	Sodio y ácido etilendiaminotetraacético
SDS	Sulfato duodecil de sodio
TE	Tris-Cl y EDTA
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
DNTP	Dinucleótidos tri- fosfatados
TBE	Tris Base EDTA
GPL	General public license
MIA	Modelo infinito de alelos

### MINÚSCULAS

bp	Pares de bases
a. C.	Antes de Cristo
d.C.	Después de Cristo

## INTRODUCCIÓN

### **A. Las poblaciones chibchas de Baja Centroamérica**

La evidencia arqueológica sugiere que el continente americano fue colonizado por los primeros humanos modernos en el pleistoceno tardío después del último periodo glacial, hace unos 14,000 años (Fagundes *et al.* 2008). Los datos arqueológicos proponen que los paleoindios estaban conformados por grupos de cazadores y recolectores, cuya dispersión ocurrió aproximadamente entre 11,500-10,000 años atrás (Cooke 2005). Debido a cambios climáticos y ecológicos que se dieron en la región hace 8.500 años el modo de subsistencia de estas agrupaciones humanas cambio a un estilo de vida agrícola; esto dio como resultado la formación paulatina de pequeños asentamientos agrarios, y alrededor del año 7,000 antes del presente se da la producción de alimentos a gran escala en cuatro regiones de América que incluían a las costas de la región andina de Ecuador, Perú, Bolivia y norte de Chile; la región mesoamericana desde México al norte de Colombia; el suroeste de Estados Unidos y los bosques de Norte América (Sonneborn 2007). El desarrollo de la agricultura promovió la domesticación especializada que contribuyo a que se diera la formación de sociedades tribales con una organización jerárquica compleja y con especialización cultural, durante este periodo se dio una gran interacción entre las poblaciones chibchas de América Central y Sur América (Cooke 2005, Melton 2008).

El término chibcha hace referencia a una familia de lenguajes amerindios que en la actualidad son hablados desde las costas de Nicaragua y el este de Honduras hasta las montañas de Sierra Nevada de Santa Marta en Colombia (Quesada 2001, Hoopes &

Fonseca 2003). Las lenguas chibchas están genealógicamente relacionadas con las lenguas lencas, misumalpas, payas y chibchas (Constenla Umaña 2002). El microfilo lenmichí es el ancestro que comparten estas tres lenguas, el mismo debió hablarse hace aproximadamente 8.000 años en el istmo Centroamericano; sin embargo, la fragmentación del lenmichí se originó probablemente durante el periodo de cazadores y recolectores a principios del octavo milenio antes de Cristo (Constenla Umaña 2005). Cerca del año 5.000 a. C. las lenguas lencas y misumalpas se habrían separado, mientras que para el año 4.500 a. C. el paya se escindió del tronco de las demás lenguas chibchas (Constenla Umaña 2005). La evidencia lingüística confirma el parentesco entre las lenguas chibchenses y las misumalpas lo que demuestra que el istmo Centroamericano fue un área en la que se dio desarrollo endógeno a nivel cultural y lingüístico, lo que permitió que este territorio se convirtiera en el área de mayor complejidad y diversidad en América Central (Constenla Umaña 2008).

Las poblaciones chibchas que habitaban América Central antes del contacto europeo estaban conformadas por pequeños cacicazgos, estos formaban parte de un territorio densamente poblado y culturalmente heterogéneo (Cooke & Herrera 2004, Cooke 2005). Sin embargo, después del contacto europeo estas poblaciones fueron diezmadas por enfermedades o sometidas a la esclavitud y violencia por parte de los españoles. Actualmente los remanentes de estas poblaciones están distribuidos en pequeños enclaves a través de la región que actualmente es conocida como Baja Centroamérica, la cual incluye gran parte de El Salvador y Honduras, Nicaragua, Costa Rica y Panamá (Lange & Stone 1984, Barrantes *et al.* 1990, Cooke 2005).

## **B. Estudios sobre el ADN mitocondrial en las poblaciones chibchas de Baja Centro América**

Debido a la interacción que se produjo entre los colonos, que provenían de poblaciones Ibéricas, y los grupos amerindios que habitaban la región durante el periodo de conquista española se desencadenaron una serie de eventos que condujeron a una drástica reducción en el número de individuos de las poblaciones locales. Desde el punto de vista biológico se produjeron cuellos de botella, esto dio como resultado alteraciones en las frecuencias alélicas y por consiguiente estas poblaciones fueron más susceptibles a los efectos de la deriva génica; lo que pudo haber generado una mayor diferenciación entre las poblaciones locales. Estos sucesos han generado gran interés en áreas como la genética antropológica y la genética de poblaciones, ya que uno de sus enfoques es indagar el origen, tiempo de divergencia y patrones de migración de las poblaciones humanas, esto lleva a una mejor comprensión de las relaciones biológicas que existían entre las poblaciones de América Central antes y después del contacto español, lo que ha brindado una mejor visión de cómo se ha dado la evolución en las poblaciones amerindias en América Central (Barrantes *et al.* 1990, Batista 1995, Melton 2005, Achilli *et al.* 2008). Las regiones genómicas que han sido empleadas con mayor frecuencia en los últimos años como instrumento para llevar a cabo estos estudios son el ADN mitocondrial y el cromosoma Y, pues ambas regiones son muy informativas, además de ser genomas haploides que se heredan ya sea por vía materna (ADNmt) o por vía paterna (cromosoma Y). Esta particularidad ha sido de utilidad para inferir la

historia evolutiva de un grupo de poblaciones o de varias poblaciones históricamente relacionadas (Melton 2008).

El genoma mitocondrial se localiza en el interior de las mitocondrias celulares. Es un material genético circular cerrado de doble cadena, consta de aproximadamente 16,569 pb contiene una región codificante con 37 exones los cuales están distribuidos en 22 ARN de transferencia, 13 genes estructurales, que codifican para los complejos enzimáticos del sistema de fosforilación oxidativa y 2 ARN ribosomales, también contiene una región no codificante conocida como región control o asa D la cual posee aproximadamente 1200 pb ( Fig. 1), esta región se sitúa entre el gen que codifica para el ARN de transferencia de la prolina y el de la fenilalanina (Fernández 2000, Pakendorf & Stoneking 2005).

La región control destaca por su elevada tasa de mutación, aproximadamente 10 veces mayor que en las regiones codificantes, esto corresponde a  $0.075-0.167 \times 10^{-6}$  sustituciones/sitio/año, y por su elevada variabilidad intrapoblacional (Stoneking *et al.* 1992, Hasegawa *et al.* 1993, Pakendorf & Stoneking 2005). Esta variabilidad se centraliza en tres regiones o segmentos hipervariables: HVS-I que ocupa la posición 16024-16365, HVS-II se encuentra en la posición 73-340 y la HVS-III en la posición 73-340 (Fernández 2000). Además de las características antes mencionas el ADNmt posee otras propiedades como poliplasmia, herencia materna y elevada tasa de mutación lo hacen especialmente útil en la reconstrucción del pasado reciente de las poblaciones humanas (Pakendorf & Stoneking 2005).



La poliplasmia hace referencia al elevado número de copias de ADNmt que existen en cada mitocondria y, por ende en la célula. Una mitocondria puede tener aproximadamente entre 1.000 y 10.000 copias de ADNmt, estas múltiples copias no necesariamente son todas idénticas. La existencia de diferentes tipos de ADNmt en un individuo se conoce como heteroplasmia; se estima que en las poblaciones existe aproximadamente un 14% de heteroplasmia. No obstante la homogeneidad del ADNmt en los individuos indica que ocurrió un severo cuello de botella durante las primeras etapas de la oogenesis lo que redujo el número de mitocondrias (Pakendorf & Stoneking 2005).

El ADNmt carece de recombinación ya que se transmite por línea materna. Esto se debe a que las mitocondrias espermáticas son marcadas por ubiquitinación y selectivamente destruidas en el oocito (Shitara *et al.* 1998, Pakendorf & Stoneking 2005). Este modo de herencia uniparental permite a los investigadores trazar la relación entre los linajes a través del tiempo, destacando la ancestría materna de una población, sin confundirse con los efectos de la recombinación del ADN nuclear en la herencia biparental (Fernández 2000, Pakendorf & Stoneking 2005).

Los primeros estudios que se realizaron para determinar la variación del ADNmt humano estaban basados en polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs); estos fueron utilizados para identificar linajes mitocondriales o haplogrupos, los mismos han sido utilizados para caracterizar y estudiar la historia evolutiva de distintas poblaciones alrededor del mundo (Schurr & Sherry 2004, Pakendorf & Stoneking 2005, Gilbert *et al.* 2008). En las poblaciones amerindias se han

caracterizado cuatro haplogrupos mitocondriales principales (A2, B2, C1 y D1) y se han identificado cinco como potenciales fundadores (C4c, D2a, D3, D4c y X2a) (Torrioni *et al.* 2006, Gilbert *et al.* 2008). Las frecuencias de estos haplogrupos varían entre las poblaciones de Norte, Centro y Sur América; en las poblaciones amerindias estos haplogrupos constituyen el 95-100% de los polimorfismos de ADNmt definidos en estas poblaciones (Schurr & Sherry 2004). Sin embargo en las poblaciones indígenas del Centro y Noreste de Asia los linajes de ADNmt antes mencionados se encuentran en bajas frecuencias, lo que sugiere que esta área es una potencial fuente de linajes maternos en las poblaciones amerindias (Schurr & Sherry 2004, O'rourke & Raff 2010).

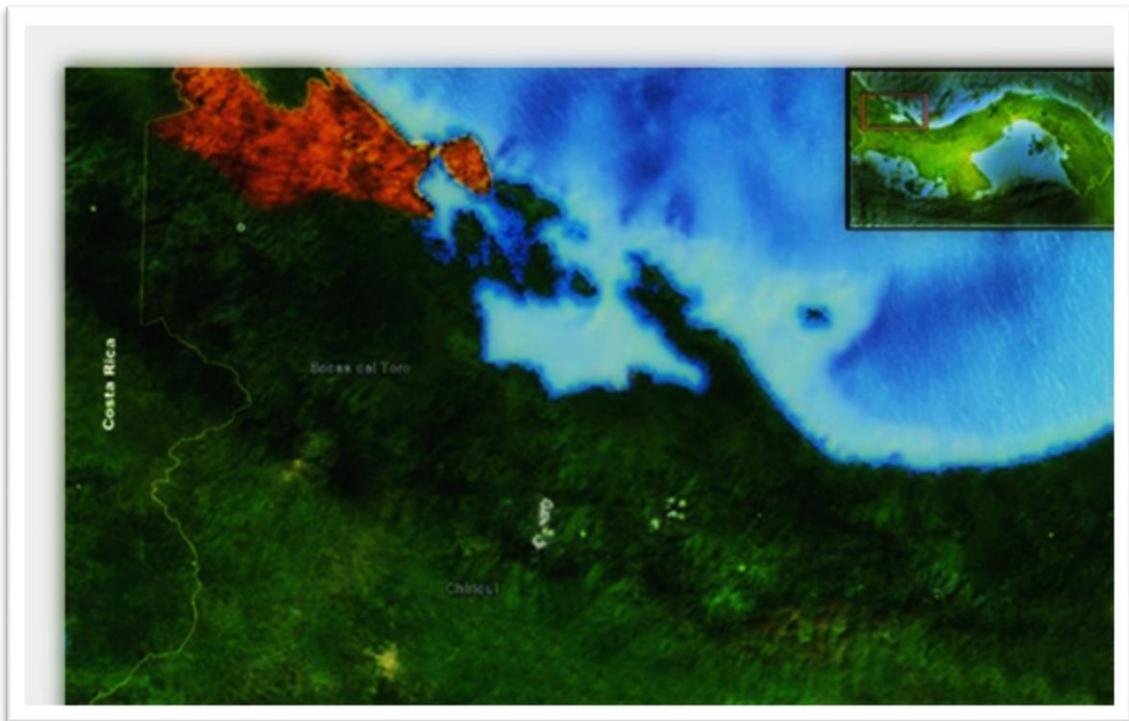
El refinamiento en los métodos moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el advenimiento de la secuenciación automática han permitido una mejor caracterización de los polimorfismos en el genoma humano, lo que ha generado arboles filogenéticos con mayor resolución, basados en secuencias genómicas del ADNmt, esto ha permitido una comprensión más profunda acerca de la diferenciación poblacional a nivel microevolutivo (Pakendorf & Stoneking 2005).

### **B.1. Etnohistoria del grupo amerindio teribe**

A lo largo de su historia, al pueblo teribe se le ha conocido bajo diversos nombres tales como: nasos, nasoga, térrabas, texibi, tojar, tirribi, quequexque y norteños (Von Chong & Ortiz 1982). Geográficamente están ubicados en la provincia de Bocas del Toro a orillas del río Teribe, afluente del río Changuinola y en el área de San San. Es una de las poblaciones indígenas minoritarias de la República de Panamá, con una población de 4,046 individuos, asentados en 11 comunidades, de acuerdo con el censo del 2010 (<http://www.censos2010.gob.pa/Resultados/>).

Durante los siglos XVI y XVII, los teribes se encontraban dispersos en ciertas regiones de Talamanca y la isla Tójar (actual isla Colón en Bocas del Toro) (Fig. 2). La primera mención documentada sobre los teribes data del año 1564, cuando Juan Vázquez de Coronado llegó a esta región en busca de oro, sin embargo los teribes mostraban actitudes hostiles hacia los españoles, pues se negaban a prestar obediencia y sumisión al rey de España. Por tal motivo Vázquez de Coronado envió al sargento mayor Juan de Turcios, al capitán Diego Caro de Meza, junto con un grupo de soldados con el fin de ganar a los teribes para el rey y la cruz (Von Chong & Ortiz 1982, Instituto de Estudios de las Tradiciones Sagradas de Abia Yala 2001). Después de que Vázquez de Coronado logro someter a los teribes, estos a principios del siglo XVII se disgregaron en el valle de Duy (Instituto de Estudios de las Tradiciones Sagradas de Abia Yala 2001). A finales del siglo XVII, los teribes sufrieron severos ataques por parte de los misquitos de Nicaragua, los changuenas y los bribris talamanqueños. Las constantes agresiones hacia los teribes por parte de los grupos antes mencionados

incentivo a un grupo de misioneros franciscanos a trasladar a algunos teribes desde la vertiente pacífica de Bocas del Toro hacia las planicies de Hato Viejo (hoy Buenos Aires en Costa Rica) (Gordon 1982, Instituto de Estudios de las Tradiciones Sagradas de Abia Yala 2001). Se cree que los habitantes del valle del río Teribe son descendientes de terrabas que no se unieron al movimiento migratorio que promovieron los franciscanos (Gordon 1982).



**Fig. 2.** Antiguo territorio teribe. Los teribes habitaban originalmente a lo largo del río Teribe hasta su desembocadura en la bahía Almirante, incluyendo la isla Colón (antiguamente llamada Tojar), las áreas rojas en el mapa inferior representan el territorio que ocuparon los teribes durante los siglos XVI y XVII (Quesada 2001).

En el siglo XIX los amerindios teribe aun estaban en conflicto con los misquitos que querían apoderarse del litoral caribeño de Costa Rica. Hasta 1840 los misquitos continuaron extrayendo tributos de sus vecinos los talamanca, los teribes y los colonos. En 1820 hubo una guerra entre los teribes y los bribris, el conflicto término en 1830 con la victoria de los bribris. Este conflicto trajo como consecuencia una disminución apreciable de la población teribe. Por otro lado en 1837 Colombia ocupa militarmente Bocas del Toro desposeyendo a las autoridades costarricenses de las tierras talamanqueñas y en 1870 Colombia despojó a Costa Rica de otra parte del territorio de Talamanca. A principios del siglo XX los teribes abandonan su lugar de origen (Shönu) debido a enfermedades y a otros problemas y se ubican en el valle y riberas del río Teribe, donde se les encuentra actualmente (Instituto de Estudios de las Tradiciones Sagradas de Abia Yala 2001).

Actualmente los teribes han asimilado algunos elementos de la cultura panameña en su organización familiar y en su estructura social. De acuerdo con el estudio realizado por Von Chong y Ortiz en 1982, la familia teribe tiene como núcleo el matrimonio de tipo monogámico, en este grupo no existen las uniones arregladas y existe completa libertad de escogencia de pareja; el cortejo es iniciado por los muchachos, estos toman en cuenta la opinión de la muchacha objeto de su interés una vez esta lo acepta, los chicos comunican sus intenciones a los padres de esta (Torres 1980, Von Chong & Ortiz 1982). Este tipo de comportamiento social es lo que diferencia a los teribes de otros grupos indígenas de Panamá en donde se practica la poligamia común o con sororato; sin embargo, este tipo de uniones genera una

disminución en la variación genética en las poblaciones que la practican (Barrantes 1993).

En cuanto al mestizaje los teribes no escapan a este proceso, pues documentos del siglo XVI hacen referencia a un asentamiento en Bocas del toro de amerindios de habla Nahuatl, conocidos como los *sigua*. En tiempos de la colonia Europea se dieron incursiones lentas de personas de Norte hacia Sur América; algunos nahuatl que sobrevivieron a los tiempos de la colonia probablemente se casaron con *térrabas*, aunque no existan evidencia de ellos hoy en día salvo por la palabra *sigua* la cual es usada tanto por *térrabas* y *bribris* en sus respectivos idiomas para referirse a los mestizos (Gordon 1982). Von Chong y Ortiz (1982) en el estudio etnográfico que realizaron sobre el grupo teribe encuestaron a 1027 individuos para conocer el estado actual de mestizaje en esta población, la encuesta considero el parentesco hasta el tercer grado de consanguinidad, los resultados de la misma revelaron que el 56.28% de las personas encuestadas se consideraban teribes, 1.65% manifestaron ser *guaymies*, 1.65% declararon ser latinos, 0.88% eran *talamanqueños* y el 39.54% eran mestizos. De acuerdo con estos resultados las cifras más altas de “teribes puros” se registraron en las áreas que se encontraban más alejadas de las zonas de contacto con otros grupos étnicos (Von Chong & Ortiz 1982).

La evidencia genética de mezcla interétnica entre las poblaciones amerindias en la Baja Centroamérica se presenta en la década de los noventa con los trabajos de Barrantes *et al.* (1990), cuando estudiaron a nueve grupos amerindios de Panamá y Costa Rica (*boruca*, *bribri*, *cabecar*, *guatuso*, *guaymí*, *huetar*, *bokota*, *kuna* y *teribe*) en

estas poblaciones se analizaron los productos de 48 loci que dan origen a los sistemas que codifican antígenos de los eritrocitos; los relacionados con las enzimas de los eritrocitos; los que codifican las proteínas del plasma y el locus de la hemoglobina (Barrantes *et al.* 1990, Barrantes 1993). Estos estudios revelaron que en los grupos amerindios mencionados anteriormente se distinguían loci monomórficos comunes a todos ellos, y que al mismo tiempo estas tribus exhibían algunos loci polimórficos que se distribuían en una o pocas poblaciones, las diferencias en las frecuencias alélicas de estos loci refleja probablemente diferentes historias de mezcla. (Barrantes *et al.* 1990). La TF\*DGUA se encontró por primera vez en dos individuos guaymíes de Panamá, sin embargo esta variantes se encuentran en frecuencias apreciables dentro de los grupos boruca, bribri y cabecar de Costa Rica, la posible explicación de esta distribución de frecuencias para esta variante es que la misma se haya originado entre grupos talamanqueños, con una penetración reciente del gen entre los guaymíes (Barrantes 1993). Por otro lado el alelo Di-a se encuentra únicamente en las tribus sumo, ica, boruca y kuna, esta variante es de origen mongoloide y de amplia distribución entre los amerindios, no obstante, su presencia entre las poblaciones de habla chibcha se restringe a los cuatro grupos mencionados anteriormente, esto probablemente se podría explicar en términos flujo o intercambio de genes con grupos vecinos portadores de Diego, y un claro indicio de esto se observa en las frecuencias en que mantienen este antígeno las tribus boruca, kuna y sumo, las cuales son inferiores al 5%; sin embargo para el grupo ica, esto podría tener otra posible explicación, la cual consiste en un caso extremo y antiguo de flujo genético entre grupos caribes y ecuatoriales (Barrantes 1993). La

mayoría de los grupos con ausencia de Diego esta ubicados periféricamente con respecto a los grupos que presentan el alelo Diego; en cuanto a los kunas que se originaron en el norte de Colombia y los sumos ( quienes no son considerados como chibchas), la presencia de este alelo en ambas tribus se podría deber a que estos grupos están en contacto con poblaciones mesoamericanas portadoras del antígeno, sin embargo, en el caso de los boruca, que se encuentran en el área intermedia, la presencia de Di-a se debe posiblemente a una migración temprana de Sur América o una mezcla con grupos que ocasionalmente visitaron el área (Barrantes 1993). La ausencia del antígeno Diego en la mayoría de los grupos chibchas se debe probablemente a cierto grado de aislamiento, lo que es indicativo de poco flujo génico, o en su defecto, aunque menos probable, la distribución de este alelo podría ser efecto de la deriva génica debido a la disminución del tamaño poblacional a causa ya sea de guerras intertribales o por los efectos de la colonización (Barrantes *et al.* 1990). La ausencia del alelo Di-a en la mayoría de las poblaciones con filiación lingüística chibcha y su distribución en otros grupos amerindios se correlaciona con factores ambientales como clima y latitud, lo que sugiere una asociación con la presencia de clinas y, por lo tanto con la presencia de selección natural; este alelo es más frecuente en zonas cálidas y húmedas que en zonas frías y secas, mas no así en Sur América (Wilson & Franklin 1968, O'Rourke *et al.* 1985, O'Rourke & Suarez 1985, Barrantes *et al.* 1990, Barrantes 1993). Barrantes *et al.* (1990), estudiaron a 141 grupos amerindios distribuidos por todo el continente, el análisis evidencio la ausencia del antígeno Di-a en el 18% de las tribus y entre estas el 77% correspondían a los grupos chibchas, por otro lado el alelo Di-a también se

encuentra ausente en los esquimales y los Na- dene, los cuales no son amerindios sino que ingresaron al continente posteriormente, lo que conduce a la ausencia de Diego en la mayoría de los chibchas (Barrantes *et al.* 1990).

Debido al tipo de gobierno existente entre los teribes, el cual es una combinación entre el gobierno central de Panamá y el tradicional basado en una monarquía, ha evitado que este grupo se mezcle con otras poblaciones del área, una muestra de ello es la autoridad que desplegó el rey Francisco Santana, el cual ejerció una autoridad efectiva sobre la población, pues los mantuvo aislados de otras culturas de la región ya que prohibía las uniones exogámicas, esta medida provocó un relativo aislamiento entre los teribes y el resto de las comunidades de Bocas del Toro debido a que solo bajaban al pueblo a comerciar sus productos (Torres 1980). La función rectora y de liderazgo del rey o jefe ha cambiado de acuerdo con las circunstancias políticas y económicas que ha vivido la cultura a través de su historia. El papel fundamental del rey, cacique o jefe es el de lograr el entronque con los mecanismos administrativos y políticos de la nación panameña a la cual pertenecen.

### **C. Análisis genéticos sobre el origen de las poblaciones amerindias de la Baja América Central utilizando ADN mitocondrial**

Los primeros análisis genéticos que se realizaron sobre las poblaciones indígenas de América Central consistieron en el uso de marcadores genéticos clásicos como: polimorfismos de grupos sanguíneos (ABO, MNS, P, Kell, Diego, Rhesus y Duffy); también se usaron proteínas de suero sanguíneo (haptoglobinas, transferrinas y hemoglobina). Estos estudios eran descriptivos y consistían en generar tablas de

frecuencias de genes a las que se le realizaba la prueba estadística de Chi-cuadrado (Melton 2008). Con este tipo de trabajos se identificaron polimorfismos que solo estaban presentes en las poblaciones chibchas de la parte baja del istmo centroamericano, estos polimorfismos genéticos estaban presentes en la mayoría de las poblaciones chibchas, las variantes genéticas encontradas fueron las siguientes: ausencia del alelo Diego A, altas frecuencias de la transferrinas D-CHI y del alelo 6PGD\*C, presencia de cinco polimorfismos privados (TPI\*3-Bribri, TF\*D-Guatuso, ACP\*Guatuso, LDBH\*Guatusol, PEPA\*2-Kuna) (Barrantes *et al.* 1982, Barrantes 1993, Batista 1995), estos estudios concluyeron que un elevado número de polimorfismos privados indicaban desarrollo endógeno de las poblaciones chibchas, el cual había ocurrido hace aproximadamente 10,000 años (Barrantes *et al.* 1990).

En la década del noventa continuaron los estudios sobre las poblaciones chibchas en la baja América Central con el objetivo de comprender las relaciones biológicas y filogenéticas entre estas poblaciones. En seis poblaciones chibchas de Costa Rica (guaymi, bribri, cabecar, huetarse, teribe y maléku) se evaluaron cuatro polimorfismos proteicos (transferrinas, alfa-1-antitripsinas,  $\alpha$ 2-HS-glicoproteína y el factor de coagulación humano), los resultados que se obtuvieron en el estudio demostraron que entre estos grupos no había subestructura poblacional. Para generar arboles filogenéticos se utilizó la distancia genética de Nei y el método estadístico del vecino más cercano, el árbol generado agrupó a las seis poblaciones en tres grupos: bribri/cabecar, huetar/maléku y guaymi/teribe (Bieber *et al.* 1996). En el 2001 Azofeifa y colaboradores estudian 39 marcadores clásicos (sistemas de grupos sanguíneos y

proteínas de células rojas y de plasma) en dos poblaciones chibchas (cabecar y huetar) con lo que determinaron las relaciones entre una población aislada (cabecar) y un grupo altamente mezclado (huetar). Ellos detectaron dos polimorfismos privados (TF\*DGUA y PEPA\*F) encontrados solamente en grupos chibchas de Panamá y Costa Rica (Azofeifa *et al.* 2001).

Estudios sucesivos sobre la historia genética de las poblaciones chibchas de baja América Central, demandaban métodos de análisis que permitieran una mayor resolución al momento de evaluar la variación genética de los grupos indígenas de la parte baja del istmo centroamericano. Los RFLPs fueron unos de los primeros métodos de alta resolución utilizados para estudiar dicha variación, estos análisis se enfocaron en el genoma completo del ADNmt (Torrioni *et al.* 1992, Melton 2008). En un principio estos estudios se enfocaron en regiones codificantes conservadas, las mismas sugerían que las mutaciones que ocurrían en estas regiones eran selectivamente neutrales y que habían ocurrido una sola vez en la historia evolutiva humana; estos eventos mutacionales permitieron agrupar a ciertos polimorfismos del ADNmt dentro de linajes llamados haplogrupos, los cuales fueron definidos por RFLPs (Torrioni *et al.* 1992, Torrioni *et al.* 1994, Melton 2008). De los cuatro linajes de ADNmt definidos en las poblaciones amerindias, el haplogrupo A2 es el que presenta mayor diversidad ya que se encuentra dividido en 13 subclados (A2c, A2d, A2d1, A2d2, A2e, A2f, A2g, A2h, A2i, A2j, A2j1, A2k y A2k1) (Achilli *et al.* 2008, Perego *et al.* 2009). En la baja América Central y en el norte de Sur América este haplogrupo se presenta con frecuencias superiores al 50% (Kolman *et al.* 1995). El haplogrupo B2 presenta al menos cuatro

sub-haplogrupos (B2a-B2d), este se encuentra en bajas frecuencias en baja América Central y en el norte de Sur América, las dos poblaciones que presentan este haplogrupo son los ngöbe de Panamá y los wayuu de Colombia (Achilli *et al.* 2008). El haplogrupo C1 esta dividido en tres subclados (C1b, C1c y C1d) este haplogrupo se distribuye a través de todo el continente americano pero está ausente en las poblaciones de América central (Melton *et al.* 2007, Achilli *et al.* 2008, Melton 2008). El haplogrupo D2 está conformado por dos subclados (D2a y D2b), la población amerindia huetar exhibe este haplogrupo con una frecuencia moderada del 26%, esta población es la única en América Central que presenta este haplogrupo, sin embargo son las poblaciones de Sur América las que presentan este haplogrupo en altas frecuencias (Santos *et al.* 1994). Al igual que el haplogrupo A2 el haplogrupo D2 se ha encontrado en poblaciones de Siberia y poblaciones árticas y sub árticas (Pakendorf & Stoneking 2005, Tamm *et al.* 2007), con lo que se indica que las poblaciones ancestrales de indígenas americanos se originaron a partir de un grupo de migrantes provenientes de Asia que cruzaron el estrecho de Bering durante el pleistoceno (Tamm *et al.* 2007).

A mediados de la década del noventa Torroni y colaboradores utilizaron RFLPs de alta resolución para estudiar a ocho grupos indígenas de Panamá y Costa Rica (teribe, maléku, boruca, cuna, guaymi, bribri, cabecar), estas poblaciones fueron usadas como referencia para realizar un estudio más amplio acerca del origen de las poblaciones amerindias y establecer un reloj molecular coalescente basado en ADNmt. Con el uso de estos marcadores encontraron un sitio de corte conocido como MspI y quince haplotipos de los cuales once eran exclusivos para las poblaciones chibchas de América

Central. Al calcular los tiempos de divergencia para los cuatro haplogrupos, encontraron que el porcentaje de secuencias divergentes para los haplogrupos A, B, C y D fueron de 0.075, 0.034, 0.096 y 0.053% respectivamente. La tasa de evolución del ADNmt para las poblaciones chibchas fue estimada entre 0.029-0.022% cada 10000 años, esta tasa de evolución junto con el porcentaje de secuencias divergentes fueron utilizados para calcular el tiempo de llegada de cada haplogrupo; basados en el tiempo de diversificación de la poblaciones chibchas el cual se inicio hace 8,000 - 10,000 años, estimaron la llegada los amerindios entre 22,414-29,454 años aproximadamente (Torrioni *et al.* 1994).

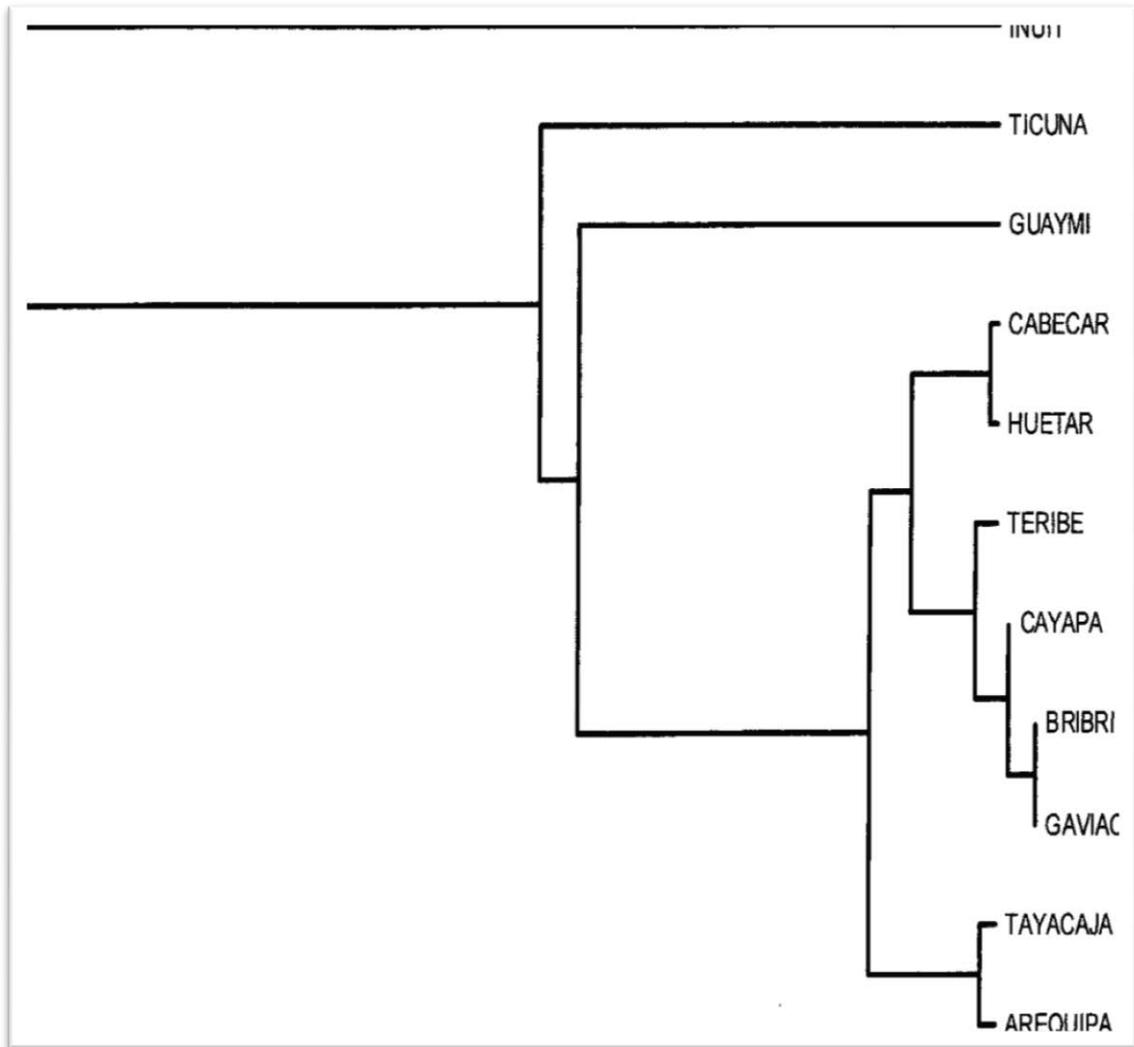
Los estudios realizados sobre la variación secuencias del ADNmt en la HVS-I en las poblaciones huetar, guaymi y cuna han demostrado que en estas poblaciones existe baja diversidad en haplogrupos y haplotipos y aislamiento reproductivo. Los huetar presentan una delección de 6pb que abarca las posiciones 106-111 de la región control del ADNmt, esta delección es considerada como un marcador chibcha el cual es utilizado en estudios taxonómicos sobre poblaciones amerindias (Santos 1992). En las poblaciones chocos ha observado una diversidad nucleotídica y haplotípica más elevada que en sus vecinos chibchas (Santos *et al.* 1994, Batista 1995, Kolman & Bermingham 1997), esto indica una pérdida de diversidad genética en las poblaciones chibchas de Panamá y en general en las tribus de la Baja Centroamérica y por lo tanto indica una gran diferenciación entre estas poblaciones. La baja diversidad genética en las poblaciones chibchas se atribuye a la deriva génica, a la drástica disminución de las poblaciones en distintos momentos de su historia genética y a las prácticas

matrimoniales asociadas con factores culturales (Barrantes *et al.* 1990, Kolman & Bermingham 1997).

Wang *et al.* (2007) estudiaron 24 poblaciones amerindias en donde se analizaron a 422 individuos con 678 marcadores microsateliticos autosómicos; las poblaciones fueron muestreadas desde Norte, Centro y Sur América; las mismas exhibían un gradiente de diversidad genética que disminuía en función de la distancia geográfica desde el estrecho de Bering (Wang *et al.* 2007). Este estudio también demostró que la disminución en la similitud genética con siberianos era señal de que la dispersión de las poblaciones humanas ocurrió hacia el sur desde el extremo norte de las Américas, y que la carencia de diferenciación genética entre las poblaciones andinas y mesoamericanas se debe posiblemente a un flujo génico reciente a lo largo de la costa (Wang *et al.* 2007).

Ruíz *et al.* (2005) analizaron las relaciones filogenéticas entre poblaciones amerindias Chibchas de Baja Centroamérica (bribri, cabecar, guaymi, huetar y teribe) Sur América (cayapa de Ecuador, tayacaja y arequipa de los andes peruanos, gaviao y ticuna del Amazona brasileño) a partir de marcadores genéticos en el cromosoma Y. El árbol generado exhibía a algunas poblaciones amerindias de Sur América (cayapa y gaviao) agrupadas con las poblaciones chibchas de Baja Centroamérica (Ruíz-Narvaez *et al.* 2005). Este patrón de agrupación volvió a presentarse en el estudio de Wang *et al.* (2007) cuando evaluaron las relaciones filo lingüísticas entre las poblaciones de nativos americanos, ellos observaron que las etnias que hablan chibcha-paezano se agrupaban con las etnias ecuatoriano-tucanoano (Fig. 4). Una de las explicaciones para este patrón

de agrupamiento es que, las poblaciones de la Baja Centroamérica podrían ser de origen Sur Americano ya que el agrupamiento ancestral podría haber estado en una población sur Americana, cuyos descendientes en su mayoría permanecen en el sur. Otra explicación alternativa es que las poblaciones chibchas-paezano y ecuatoriano-tucanoano podrían ser el resultado de una colonización de Sur América separada de la colonización de las poblaciones andinas, con poblaciones fundadoras que posiblemente hablaban un lenguaje del cual han descendido las modernas lenguas chibcha-paezano. Los guaymi (ngöbe) y cabecares son las únicas muestras poblacionales centroamericanas que descienden de ancestros de esta segunda migración (Wang *et al.* 2007).



**Fig. 3.** El árbol fue generado a partir de las distancias genéticas entre las tribus obtenidas de las diferencias en el número de repeticiones entre los marcadores microsateliticos del cromosoma Y (Ruíz-Narvaez *et al.* 2005).



#### **D. Justificación**

Los estudios sobre las poblaciones amerindias de América Central han jugado un papel importante en la comprensión de la dinámica poblacional y desarrollo cultural de las Américas, debido a su localización geográfica que abarca la región norte y sur del continente americano (Melton 2008). El presente trabajo se realizó con el propósito de estudiar las relaciones biológicas que existen entre los teribes con respecto a otros grupos chibchas que habitan la parte baja del istmo Centroamericano. Este estudio aporta información que podrá ser utilizada para complementar los estudios que se han hecho hasta el momento sobre grupos amerindios en la Baja América Central, esto ayudara a tener una mejor comprensión de la dinámica poblacional en las poblaciones de la llamada área intermedia y una perspectiva más amplia de cómo han actuado las fuerzas evolutivas sobre estas poblaciones. Para Panamá este trabajo complementaria a los estudios antropológicos que se han realizado sobre los teribes, además de brindar una perspectiva un poco más amplia acerca de la historia evolutiva de esta población y de cierta manera también podría justificar los derechos que los grupos indígenas del país tienen sobre sus tierras, en especial aquellos como los teribes que aun no tienen una comarca delimitada y legalmente reconocida por el gobierno central de Panamá.

## **OBJETIVOS**

Este trabajo se realizó de acuerdo con los siguientes objetivos

### **GENERAL**

Analizar la variación genética del ADNmt de la población teribe de Panamá y sus relaciones filogenéticas con respecto a otros grupos chibchas de la Baja Centro América.

### **ESPECÍFICOS**

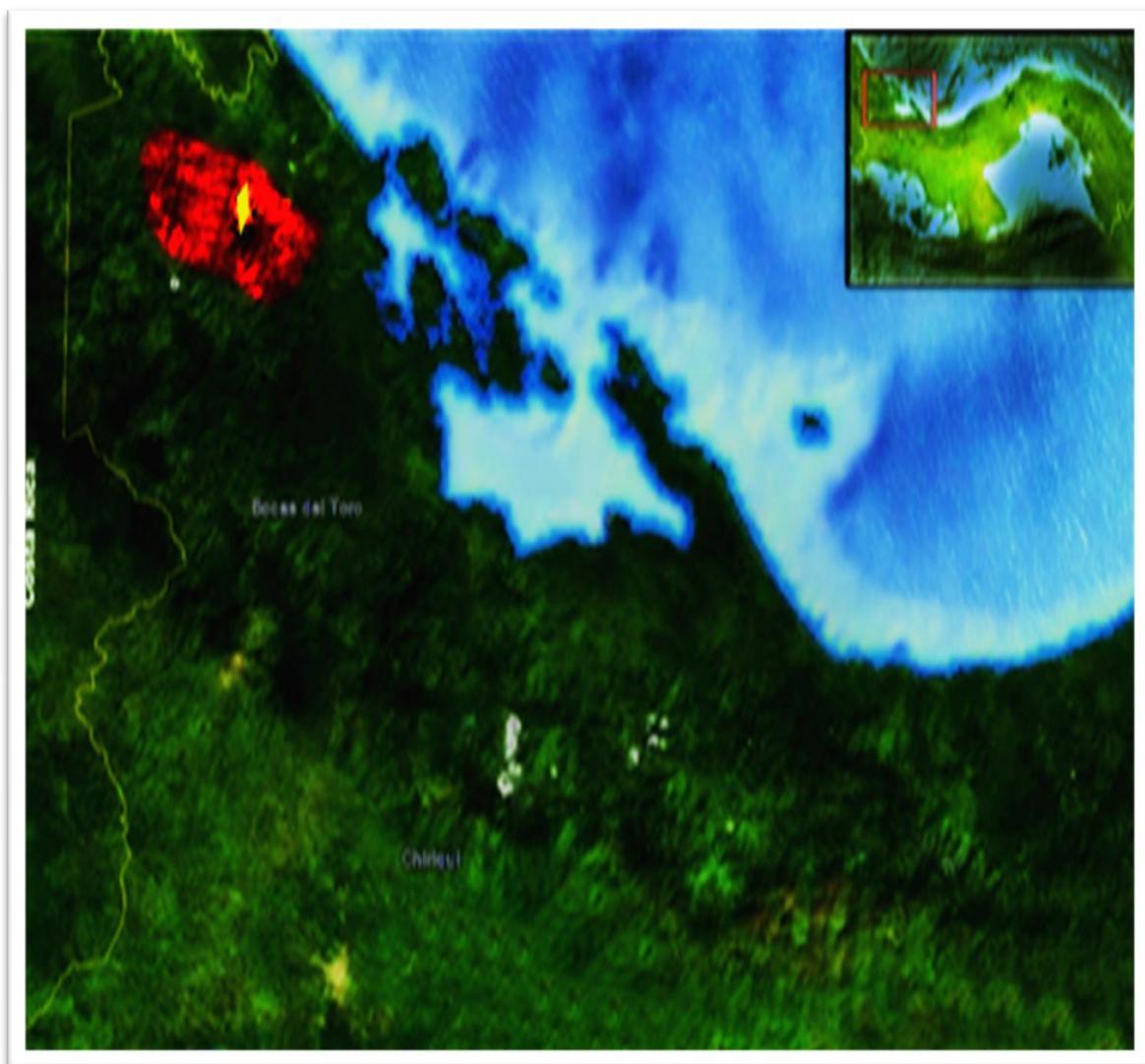
1. Estimar el grado de variación genética de la región control del ADNmt de la población teribe de Panamá.
2. Determinar y evaluar la presencia de la delección huetar en los teribes
3. Evaluar las similitudes y diferencias del grupo teribe de Panamá con respecto a otros grupos chibchas de la región mediante la comparación de sus secuencias de ADNmt.

## METODOLOGÍA

### A. Población estudiada

El territorio teribe se localiza en la provincia de Bocas del Toro, región Noroccidental de la República de Panamá entre los 9° 18' y 9° 32' N y 82° 34' y 82° 50' O. Su extensión es de aproximadamente 129,950.796 hectáreas, la cual abarca gran parte de las cuencas hidrográficas de los ríos Teribe, Sieyik, Yorkín además de una parte de la cuenca del río San San (Von Chong & Ortiz 1982); representando así el 14.9% de la superficie de la provincia de Bocas del Toro.

Las muestras del grupo teribe analizadas fueron colectadas en la comunidad Sieyik (9°20'N y 82°38'O. Figura 3), formada alrededor del año 1860, constituyendo así la comunidad más antigua de las 11 que existen de este grupo amerindio. Dichas muestras fueron colectadas entre los años de 1979 a 1980 mientras se realizaban muestreos poblacionales para realizar estudios comparativos sobre la estructura genética de poblaciones amerindias de Baja Centroamérica en grupos amerindios de Costa Rica y Panamá (Barrantes et al. 1990).



**Fig. 5** La comunidad Sieyik se localiza dentro del distrito de Changuinola en la provincia de Bocas del toro. El marcador muestra la ubicación geográfica de esta comunidad Sieyik, mientras que el área roja indica la extensión del actual territorio teribe. Los mapas se obtuvieron mediante el uso del software Google Earth ([www.google.es/intl/es/earth/index.html](http://www.google.es/intl/es/earth/index.html)).

## **B. Trabajo de laboratorio**

La parte experimental de este estudio se realizó en los laboratorios de genética de la Escuela de Biología de la Universidad de Costa Rica (UCR), donde se analizaron 48 muestras. El criterio de muestreo utilizado al momento de la recolección de muestra fue el de seleccionar unidades familiares, pues en aquel momento esta representaba la forma más conveniente, informativa y significativa de proceder. Los individuos fueron seleccionados para estudiar patrones de migración e infraestructura genética de grupos tribales en América Central y para estudios de microevolución en la Baja Centroamérica.

### **B.1. Extracción de ácidos nucleicos**

La extracción de los ácidos nucleicos fue realizada con el método de precipitación con NaCl (Miller *et al.* 1988). Después de la separación de los leucocitos, por centrifugación, a partir de 10ml de sangre total heparinizada, los mismos fueron congelados para la posterior extracción de ácidos nucleicos (comunicación personal). La extracción consistió en resuspender el botón de glóbulos blancos en buffer SE, proteinasa K y SDS al 20%. Luego fueron incubados toda la noche a 37°, a la solución que se obtuvo se le agregó NaCl 6M y se centrifugó por una hora a 2500 g. Al sobrenadante obtenido se le agregó etanol absoluto para precipitar y resuspender el ADN, finalmente los ácidos nucleicos extraídos fueron almacenados en amortiguador TE y refrigerados a 4° (Ruíz-Narvaéz 1998).

## B.2. Amplificación mediante PCR

Se estudió el asa-D o región control del genoma mitocondrial del grupo amerindio teribe de Panamá. La región antes mencionada está compuesta por tres segmentos hipervariables donde se concentra la mayor variabilidad de dicho genoma, estos segmentos son conocidos como: HVS-I (posición 16024-16365), HVS-II (posición 73-340) y HVS-III (posición 438-574) (Vigilant *et al.* 1991, Lutz *et al.* 1998, Fernández 2000). Estas regiones fueron amplificadas mediante PCR, para ello se utilizaron enzimas taq polimerasa de la corporación Fermentas y el kit TaqPCR Core de la corporación Qiagen, que incluye: taq polimerasa, amortiguador (Buffer) 10X, amortiguador CoralLoad 10X, solución Q 5X, MgCl<sub>2</sub> 25mM y DNTP. El termociclador utilizado para llevar a cabo la PCR fue un Thermal Cycler 2720 de la corporación Applied Biosystems.

El HVS-I fue amplificado utilizando los pares de oligonucleótidos L15997/H16401 (Wilson *et al.* 1995, Gerlo *et al.* 1999), mientras que para amplificar el HVS-II se utilizaron los siguientes oligonucleótidos L29/H408 (Stoneking *et al.* 1991), La amplificación del HVS-III se llevo a cabo mediante el diseño de los cebadores L32/H221 (Cuadro 1), para ello se utilizo el programa primer 3, el cual se encuentra bajo términos de licencia general pública de libre acceso (Untergasser *et al.* 2007 ). Estos oligonucleótidos fueron sintetizados por Intergrated DNA Technologies. Para establecer las mejores condiciones de amplificación para los cebadores se realizaron ensayos de gradientes de temperatura con los siguientes parámetros: gradiente de 7°C con temperatura inicial de 52.9°C y final de 67.5°C y temperatura media de 60°C. Este procedimiento se realizo en un

termociclador eppendorf mastercycler gradient, los parámetros de amplificación se describen en la Cuadro 2 y 3. Los productos de la PCR de los segmentos hipervariables fueron visualizados en geles de poliacrilamida al 10%. Para realizar las corridas de los geles se utilizaron cámaras de electroforesis Bio-Rad con dimensiones de 15.5cm de largo por 12cm de ancho por 13cm de alto con un volumen de almacenamiento de 750ml, el tamaño de los geles producidos fue de 82mm de ancho por 85mm de largo; esta cámara se conecto a una fuente de poder de EPS 600 de la compañía Pharmacia Biotech; las muestras en los geles corrieron a 125 voltios, 400 miliamperios y 100 watts por 45 minutos con TBE 1X como amortiguador de corrida. Al finalizar de la etapa de amplificación las muestras fueron enviadas a la corporación Macrogen en Corea para ser secuenciadas.

**Cuadro 1.** Secuencias de los oligonucleótidos utilizados

<b>Oligonucleótido</b>	<b>Secuencia (5'→ 3')</b>	<b>Región</b>
<b>L15997</b>	CAC CAT TAG CAC CCA AAG CT	HVS-I
<b>H16401</b>	TGA TTT CAC GGA GGA TGG TG	
<b>L29</b>	GGT CTA CAC CCT ATT AAG CAC	HVS-II
<b>H408</b>	CAT TTA AAA GTG CAT ACC GCC A	
<b>L32</b>	TTA TTT TCC CCT CCC ACT CC	HVS-III
<b>H221</b>	GGT GAT GTG AGC CCG TCT AA	

**Cuadro 2.** Parámetros de amplificación. Para llevar a cabo la ejecución de la PCR se utilizaron 33 ciclos por región

<b>Regiones</b>	<b>Desnaturalización Inicial</b>	<b>Desnaturalización</b>	<b>Annealling</b>	<b>Extensión</b>	<b>Extensión Final</b>
HVS-I	94°C→5:00 min	94°C →0:40 seg	55°C→0:30 seg	72°C→0:45 seg	72°C→5:00 min
HVS-II	94°C→5:00 min	94°C →0:40 seg	60°C→1:00 min	72°C→0:45 seg	72°C→5:00 min
HVS-III	94°C→5:00 min	94°C →0:40 seg	56.8°C→1:00 min	72°C→0:45 seg	72°C→5:00 min

**Cuadro 3.** Condiciones por reacción de la mezcla maestra para la PCR. El volumen esta dado en microlitros (μl)

<b>Región</b>	<b>COMPONENTES</b>									<b>Volumen final</b>
	<b>Agua</b>	<b>Solucion Q</b>	<b>Buffer</b>	<b>DNTPs</b>	<b>MgCl<sub>2</sub></b>	<b>Cebador 1</b>	<b>Cebador 2</b>	<b>Taq polimerasa</b>	<b>ADN</b>	
HVS-I	9.8	–	2.5	0.5	4.0	2.5	2.5	0.2	3.0	25.0
HVS-II	9.1	–	2.5	0.2	4.0	2.5	2.5	0.2	1.0	25.0
HVS-III	6.2	5.0	2.5	5.0	0.2	1.0	1.0	0.1	2.5	23.5

### **B.3. Análisis y alineamiento de secuencias**

Las secuencias fueron editadas con el programa DNABaser 2.7 ([www.dnabaser.com/order/index.html](http://www.dnabaser.com/order/index.html)) y el alineamiento se realizó por medio de Clustal W en el programa MEGA 5.05 (Tamura *et al.* 1993). Posteriormente las secuencias fueron analizadas utilizando los programas MEGA 5.05 y BioEdit 7.0.5.1. La descripción a nivel nucleotídico de los segmentos hipervariables del genoma mitocondrial estudiado se hizo mediante el cálculo de las proporciones de transiciones y transversiones, estas tendencias mutacionales fueron analizadas en el programa MacClade ver. 4.10 (<http://macclade.org/download.html>.) El programa BioEdit fue utilizado para calcular el nivel de entropía en las regiones hipervariables estudiadas, estos valores fueron graficados a través de una columna de alineamiento para tener una idea de la cantidad y posición de la variabilidad. El cálculo de los niveles de entropía en un alineamiento puede ser utilizado para evaluar los efectos de las transiciones y transversiones sobre las regiones estudiadas.

### **C. Análisis poblacionales**

Se utilizaron secuencias de nueve poblaciones amerindias de filiación chibcha: bribri, boruca, huetar, ngöbe, teribe, kuna, arsario, ijkca, y kogi. Los índices de diversidad para las tres regiones hipervariables estudiadas en los teribes fueron calculados con Arlequín ver. 3.5.1.2 (Excoffier & Lischer 2010).

#### **C.1. Porcentaje de sitios polimórficos**

La cantidad de sitios polimórficos fue calculada con el programa DnaSP versión 5.10.1 (Librado & Rozas 2009). El número de sitios polimórficos en las secuencias

refleja la cantidad de sitios que varían entre un conjunto de secuencias; este valor se ve afectado por el tamaño de las secuencias estudiadas, sin embargo puede ser corregido dividiendo el número de posiciones variables entre la cantidad de nucleótidos en la secuencia (Fernández 2000).

## **C.2 Diversidad haplotípica y nucleotídica**

La diversidad haplotípica y nucleotídica de los tres segmentos hipervariables de la región control del ADNmt de los teribes se calculó mediante el uso del programa DnaSP. Cuando se trabaja con secuencias cada variante o haplotipo equivale a un alelo por lo que para realizar el cálculo de la diversidad haplotípica se utiliza el concepto de diversidad genética de Nei el cual se define como la probabilidad de que dos alelos de una muestra tomados al azar sean diferentes (Nei & Tajima 1981, Nei 1987).

La diversidad nucleotídica se define como el promedio de nucleótidos diferentes en un par de secuencias de ADN escogidas al azar en una muestra poblacional (Nei 1979). Esta medida de variación genética fue calculada para las tres regiones mitocondriales estudiadas en el grupo amerindio teribe de Panamá, los valores obtenidos de este parámetro en el HVS-I fueron comparados con los valores obtenidos de la misma región para los grupos amerindios bribri, boruca, huetar, ngöbe, kuna, arsario, ijkca, y kogi.

## **C.3 Pruebas de neutralidad**

Para determinar si la región control del ADNmt de los teribes cumplía con el modelo de neutralidad propuesto Kimura en 1970, se evaluaron los siguientes

estadísticos:  $D$  de Tajima,  $F_s$  de Fu, las cuales se basan en el modelo de alelos infinitos sin recombinación  $F$  de Ewens-Watterson que considera la frecuencia de los alelos observados y no las diferencias entre ellos, esta prueba puede ser usada tanto para datos diploides como haploides (Hedrick 2005, Melton 2008).

#### **C.4. Distribución de las diferencias por parejas**

La representación gráfica de las diferencias por parejas puede mostrar de manera resumida la diversidad genética de una población, pero también es una herramienta que puede ser usada para inferir la historia de la población de donde fue tomada la muestra; también puede ser usado para inferir cambios pasados en el tamaño efectivo de la población, para lo cual se requiere que las secuencias de ADN de la población seleccionada cumplan con los supuestos de neutralidad. (Hamilton 2009). El índice de desigualdad de Harpending (Rogers & Harpending 1992) se utilizó para determinar si las poblaciones eran compatibles con el modelo de expansión demográfica súbita, el cual se basa en el modelo de alelos infinitos propuesto por Kimura en 1971 (Librado & Rozas 2009).

Las diferencias por parejas fueron evaluadas tanto para los teribes de manera individual como a nivel general en un conjunto de nueve poblaciones chibchas. En el grupo teribe este parámetro fue comparado con datos censales obtenidos de registros históricos, estudios demográficos y de la contraloría general de la República de Panamá.

#### **D. Análisis filogenéticos**

Las filogenias fueron evaluadas a partir de los datos generados por las secuencias. La construcción de los arboles se hizo utilizando el método de distancia del vecino más cercano ya que no asume reloj molecular junto con el modelo evolutivo F84 en donde se toman las tasas de transición y transversión junto con las frecuencias de equilibrio de las bases para diferenciarlas unas de otras (Felsenstein 1984). Estos cálculos fueron realizados utilizando el programa DNADist en PHYLIP ver. 3.6.6 (Felsenstein 1995). Los arboles fueron visualizados Tree-View ver. 1.6 (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk>). Para evitar distorsiones o sesgos en la filogenia. (Wakeley 1993, Fernández 2000) se utilizó la corrección de la distribución gamma de la tasa de mutación mediante el parámetro  $\alpha=0.47$  estimada por Wakeley 1993 para el HVS-I.

Las secuencias de las poblaciones chibchas estudiadas fueron utilizadas para hacer una simulación evolutiva de un estado ancestral al azar, para ello se hizo uso del programa Mesquite ver. 2.74 (Maddison & Maddison 2010), con los resultados obtenidos de las simulaciones se genero un árbol con topografía rectangular, el cual mostro las diferencias mas predominantes entre las poblaciones evaluadas. Para generar las redes medias vecinas se utilizo el programa Network ver. 4.6 (<http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm>), para analizar los agrupamientos y generar los network joinings a partir de árboles filogenéticos no enraizados se utilizo el programa SplitsTree ver 4.6 (Huson & Bryant 2006).

## RESULTADOS

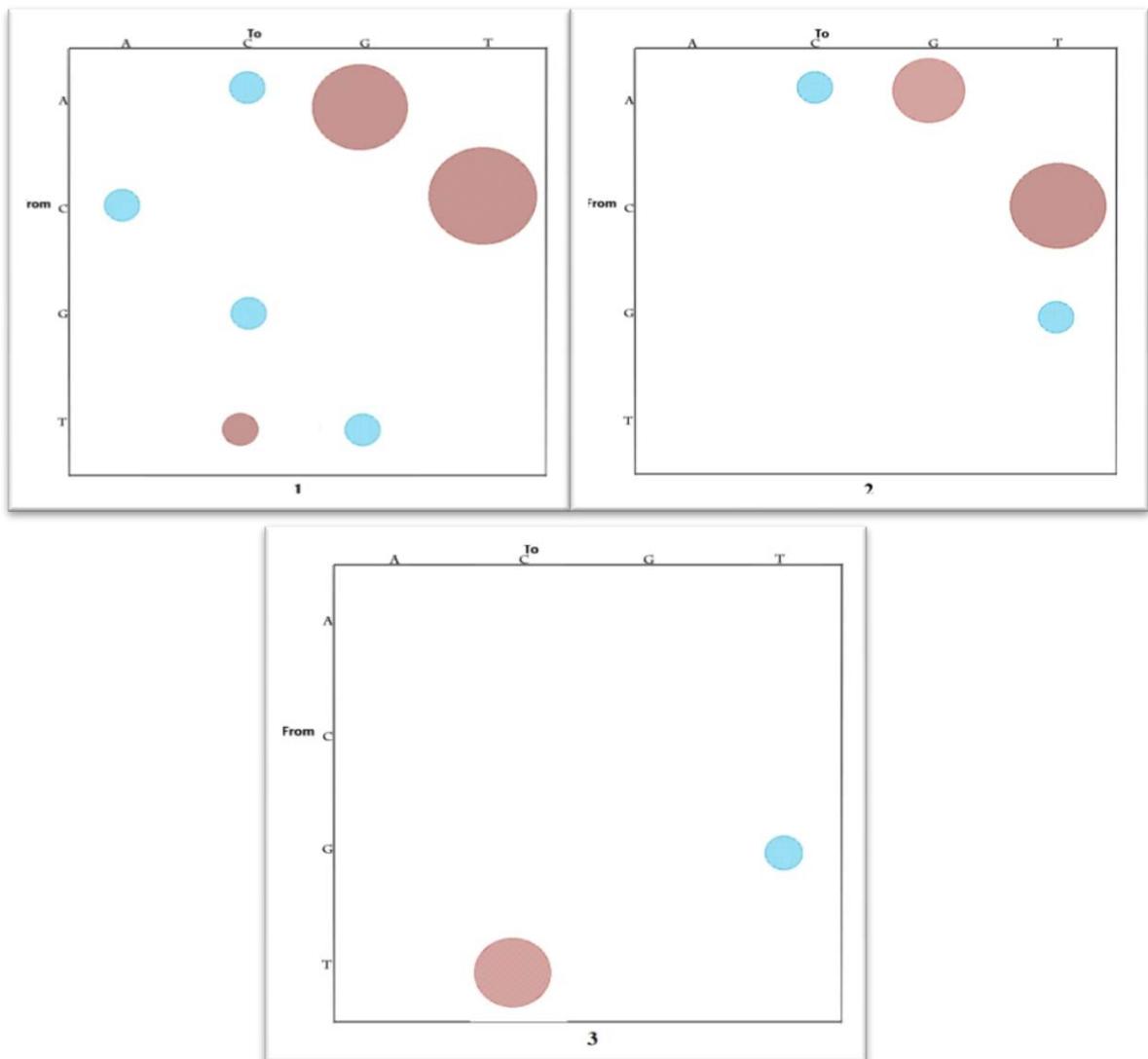
### A. Caracterización del la variación genética en el ADNmt de los teribes a nivel de secuencias

En la región control del ADNmt de la etnia teribe de Panamá se identificaron 24 eventos de sustitución, estos correspondían a 17 transiciones y 7 transversiones (Fig. 7). La región no codificante del ADNmt del grupo amerindio bajo estudio presento mayor propensión hacia las transiciones que hacia las transversiones, pues los cálculos de proporcionalidad entre ambos tipos de eventos mutacionales revelaron valores de 2.4, sugiriendo de esta forma las tendencias hacia los cambios antes mencionados (Fig. 6). Las mutaciones más frecuentes fueron las sustituciones de C→T con una frecuencia de 0.30 (Cuadro 4), las transiciones de A→G, G→A y C→T en las posiciones 265, 16319 y 16223 respectivamente no fueron incluidas en los cálculos de sesgo transicional debido a que todos los individuos presentaban estos cambios con respecto a la secuencia de referencia Cambridge, lo mismo ocurrió con la transversión de G→C en las posiciones, 16255, 16361, 16370 y 16373, pues al estar presentes estos cambios en todos los individuos, las posiciones antes mencionadas al presentar un estado homoplásmico reflejan una variabilidad genética reducida en la población estudiada, esto podría indicar que durante el periodo de formación de la población teribe, como consecuencia del efecto fundador se pudieron haber perdido linajes mitocondriales por deriva génica o bien los mismos pudieron desaparecer durante el cuello de botella que sufrió esta etnia durante el periodo colonial, ambos eventos pudieron haber generado las regiones monomórficas mencionadas anteriormente. Los niveles de variabilidad en las regiones estudiadas podrían ser afectados por las sustituciones nucleotídicas, pues estos

cambios podrían generar cierto grado de desorganización en el ADNmt; lo que quizá derivaría en la formación de posiciones informativas que en la actualidad pueden ser usadas para definir la variabilidad genética o elucidar las relaciones filogenéticas de las poblaciones, pues las mismas se podrían presentar ya sea como sitios variables o monomórficos característicos que permitirían establecer mejor el grado de sus afinidades genéticas con otras poblaciones.

		11111111111111111111111111111111
		666666666666666666666666666666
	1111222355611111122222223333333	
	1245356138101112523345590116677	
	3685765222391376532985801091903	
CRS	A.GTAA	TATCTCACATTACCCCGACC.GGGGGG
TER1	C.CGG.G.....	T.CG.TT.TC.TA.ACCCC
TER2	C.CGG.G.....	T.CG.TTT.C.TA.ACCCC
TER3	C.CGG.G.....	G.GCG.T...C.T..ACCCC
TER4	C.CGGC.G.T...	TGC..T..TC.T..ACCCC
TER5	C.CGG.G.....	TGC..TTT.CCT..ACCCC
TER6	C.CGGC.G....	GT.C..TT.TCCT..ACCCC
TER7	CTCGG.GC.G..	T.C.GT.T.C.T..ACCCC
TER8	.T...CGC...G...	G.T.T.C.TAAACCCC
TER9	CTCGG.GCT.T.T	CG.T.T.C.T..ACCCC
TER10	CTCGG.G.T.T.T...	T...C.T..ACCCC
TER11	C.CGGC.GC...G....	T...C.TAAACCCC
TER12	...CG...TGTGC	.GT.TT.C.TAAACCCC
TER13	...CG.TG...GC	GGT.TTTC.TA.ACCCC
TER14	.T...CGCT.T..G...	T.TTCC.TA.ACCCC
TER15	...CG..G.G....	GT...C.TAAACCCC
TER16	...GC.....	T...C.T..ACCCC
TER17	...G.TG..T...	GT...C.T..ACCCC
TER18	CTCGG.G.T.T.T...	T...C.T..ACCCC
TER19	...G..G.GT...	T...C.T..ACCCC
TER20	C.CGG.GC....	T...T...C.T..ACCCC
TER21	C.CGG.GC...G....	TT.TCCTAAACCCC
TER22	C.CGG.G...T.T...	T...CCTA.ACCCC
TER23	C.CGG.GC.G....	TTT.CCT.AACCCC
TER24	.T.GG.GC..T.T...	T...C.T..ACCCC
TER25	CT.GG.GCT.T....	TT..CCTA.ACCCC
TER26	...G.TGT.T....	T...C.T..ACCCC

**Fig.6.** Posiciones variables en el asa D del ADNmt de amerindios teribes de Panamá. En esta región se observaron 24 incidentes de sustitución de nucleótidos.



**Fig. 7.** Transiciones y transversiones presentes en las regiones estudiadas. Las graficas 1, 2 y 3 corresponden a los eventos de sustitución de la HVS-I, HVS-II y HVS-III respectivamente. Los círculos rojos son transiciones y los azules transversiones. La proporción de estas mutaciones en cada región oscilo entre 2.00 y 2.50

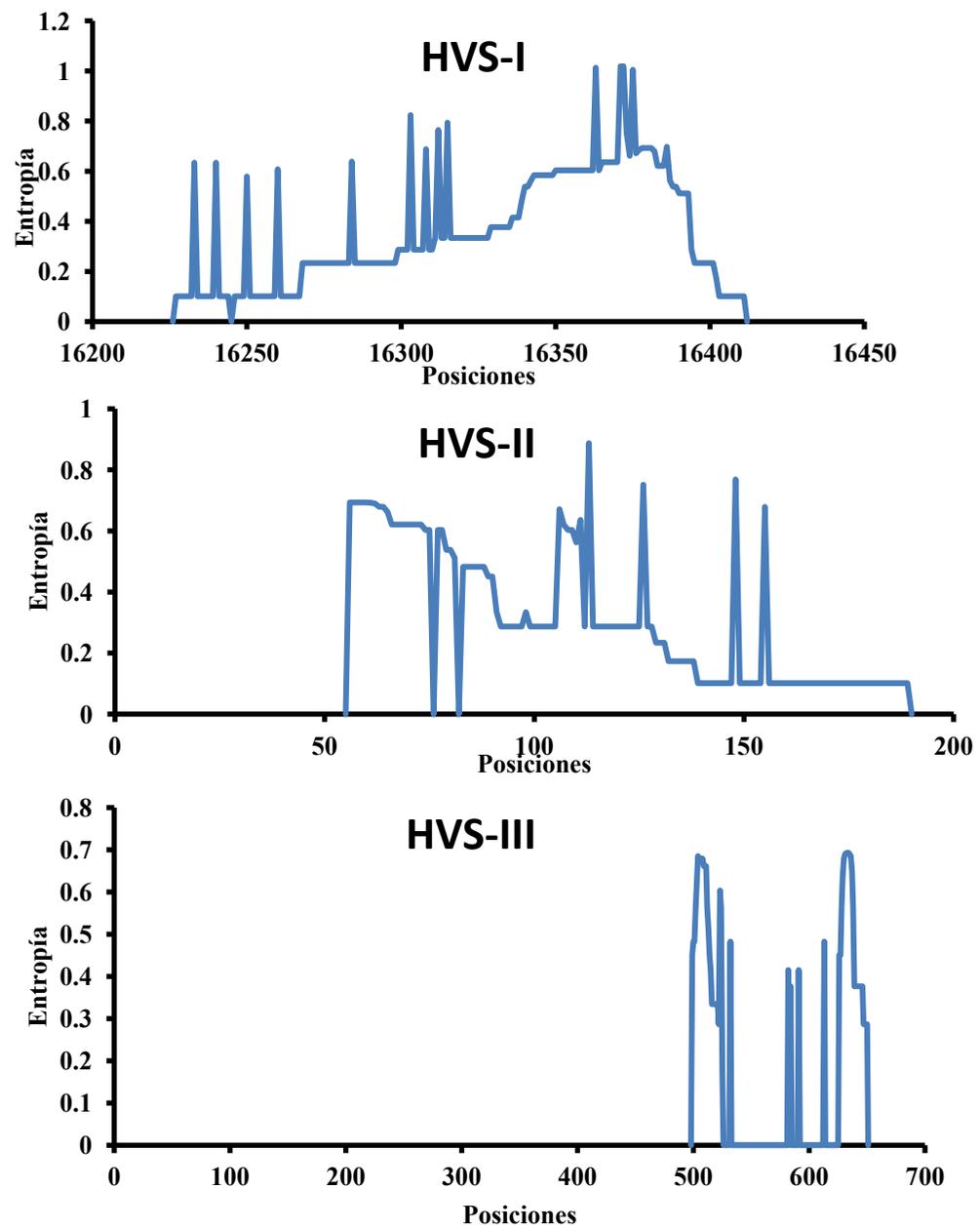
**Cuadro 4.** Frecuencias relativas de eventos de sustitución en la región control del ADNmt de los teribes.

<b>Tipos de sustitución</b>	<b>Cantidad de eventos observados</b>	<b>Frecuencia relativa</b>
<b>Transición</b>		
A→G	6	0.25
C→T	7	0.30
T→C	4	0.17
<b>Transversiones</b>		
A→C	2	0.08
C→A	1	0.04
T→G	1	0.04
C→G	1	0.04
G→T	2	0.08
<b>Total</b>	<b>24</b>	<b>1.00</b>

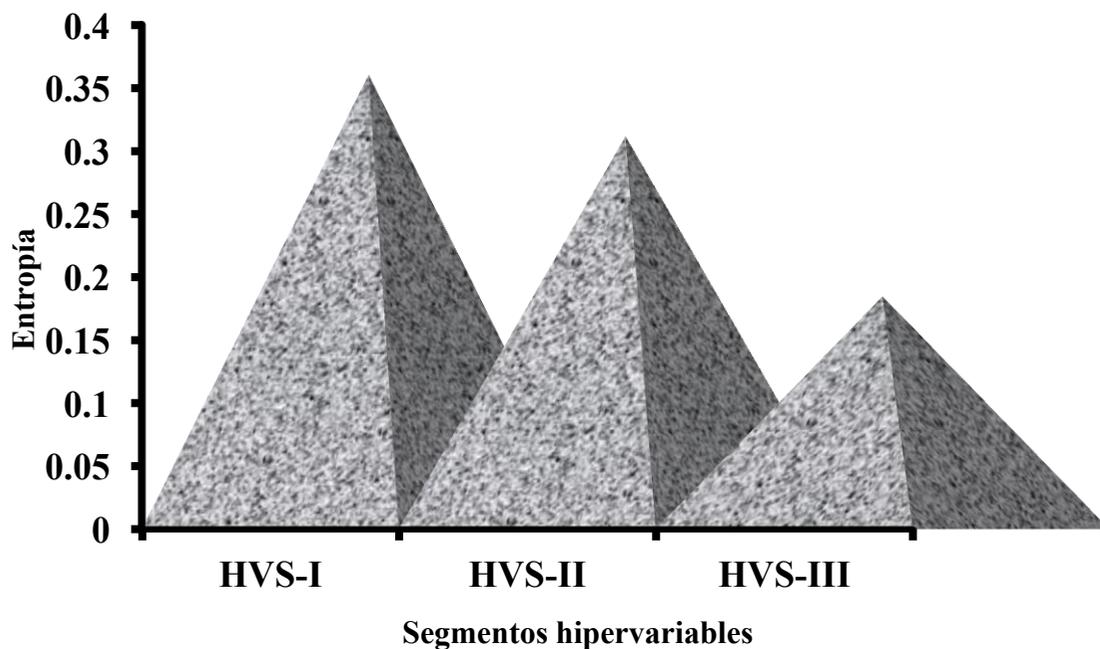
Una forma de evaluar visualmente la distribución de la variabilidad genética por posición es mediante el cálculo de los niveles de entropía, ya que la misma puede ser considerada como una medida de predictibilidad, pues está relacionada con la cantidad de información contenida por posición en un conjunto de secuencias alineadas y es lo que se interpreta como variabilidad por posición (Shannon 1948, Hall 2001). De acuerdo con el análisis de entropía en los tres segmentos hipervariables (Fig. 8), algunas posiciones registraron aumentos bruscos en los niveles de entropía, sugiriendo que dichas posiciones podrían proveer una mayor cantidad de información para las regiones hipervariables estudiadas en esta población.

La causa del comportamiento entrópico en la región control del ADNmt de los teribes, se debe a la ocurrencia y cantidad de sustituciones de bases, pues al calcular el coeficiente de determinación entre ambos eventos, este sugería que el 92.75% de la variación en los niveles de entropía se debía a la variación en la cantidad de

sustituciones. De acuerdo con los valores de entropía registrados en las tres regiones hipervariables (Fig. 9), la HVS-I fue la que presentó una mayor variabilidad y por lo tanto mayor informatividad, seguida por las HVS-II y HVS-III.



**Fig. 8.** Distribución de la variabilidad genética por posición en base a los niveles de entropía



**Fig. 9.** Variabilidad genética por región de acuerdo con los niveles de entropía

En los fragmentos secuenciados se presentaron dos deleciones, la primera abarcaba las posiciones 106-111, la cual corresponde a la deleción huetar descubierta por Santos en 1992 (Santos 1992), la misma era portada en 22 de los 48 individuos (45.83%), el resto de las muestras presentaban una secuencia parcial o completa. La segunda deleción incluía las posiciones 523-524 y era exhibida en el 25% de las muestras, esta mutación también se presentó en el 40% de los individuos pertenecientes a tres poblaciones chibchas (kogi, ijka y arsario) de América del Sur, con los que se compararon los teribes. Las posiciones 514-524 están compuestas generalmente por cinco unidades CA repetidas en tandem, las mismas pueden variar en el número de repeticiones generando heteroplasmia por longitud de repeticiones, este polimorfismo

de dinucleótidos repetidos es un marcador de inestabilidad del genoma mitocondrial y es una herramienta valiosa en pruebas de identificación forense (Howell & Smejkal 2000, Ye *et al.* 2008); la pérdida de una de estas unidades repetidas en las posiciones 523-524 generó cuatro repeticiones en tandem de dinucleótidos CA, esta variante se observó tanto en algunos individuos teribes como en las tribus sureñas. La distribución de los alelos generados por estas unidades repetidas, varía entre poblaciones geográficamente diferentes, lo que podría ser de utilidad en estudios poblacionales y filogenéticos (Chung *et al.* 2005).

El porcentaje de heteroplasmia observado en el asa-D en la población analizada fue de 2.88%. En los teribes esta región exhibió 4 secuencias, dos de las cuales presentaban variantes (Cuadro 5), los cambios observados de T→C y de A→C en las posiciones 312 y 16258 respectivamente son representantes de heteroplasmia por posición, mientras que las posiciones 523-524 son exponentes de heteroplasmia por longitud de unidades de repetición como se cito en el párrafo anterior.

**Cuadro 5.** Secuencias observadas en la región control del ADNmt de los teribes

<b>Secuencias</b>	<b>Posiciones</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
CCCCCCTCCCC		77.08
CCCCCCCCCCCC	305-317	22.92
CCCCCC	568-573	100
CCCCCTCCCC	16184-16193	100
CCCACCCCTC		79.17
CCCCCCCCTC	16255-16264	20.83

### **B. Medidas de diversidad genética y neutralidad**

La variación genética en la población teribe de Panamá fue estimada a través de medidas de diversidad genética como: número de sitios segregantes, diversidad haplotípica y diversidad nucleotídica. Los resultados fueron cotejados con datos obtenidos en la literatura de siete poblaciones de filiación lingüística chibcha. Las tribus con las que fueron comparados los teribes fueron: bribri, huetar, ngöbe, kuna, ijka, kogi y arsario. De acuerdo con los valores de diversidad obtenidos para el HVS-I, los teribes son los que presentan la más alta diversidad haplotípica y nucleotídica en comparación con las otras poblaciones chibchas con las que han sido comparados (Cuadro 6), estos valores sugieren que entre los teribes existe cierto grado de diferenciación genética, esto también podría ser interpretado como una baja cantidad de polimorfismos compartidos entre individuos dentro de la población. En contraposición a los teribes, el grupo amerindio ijka fue el que presentó una menor diferenciación genética, ya que fue la

etnia que exhibió menor diversidad haplotípica y nucleotídica, lo que sugiere que en esta población existe una mayor cantidad de polimorfismos compartidos entre los individuos que componen este grupo, lo que en términos de variabilidad podría hacer referencia a homogeneidad genética para la HVS-I del ADNmt de los ijka.

La diversidad genética de la población teribe también fue evaluada en los HVS-II y III de su ADNmt. En este análisis se observó que de los tres segmentos hipervariables del ADNmt evaluados en los teribes, el HVS-I fue el que presentó valores más elevados en cuanto a diversidad genética, mientras que en las otras dos regiones se exhibieron valores menores tanto en diversidad haplotípica como en diversidad nucleotídica (Cuadro 7). Estos resultados son coincidentes con las pruebas de variabilidad entrópica por región mencionadas en la sección anterior.

**Cuadro 6.** Diversidad genética del HVS-I del ADNmt en poblaciones chibchas de Baja Centroamérica y Sur América

Población	N	S	h	$\pi$
Bribri <sup>1</sup>	10	9	0.756	0.006
Huetar <sup>2</sup>	29	12	0.709	0.010
Ngöbe <sup>2</sup>	46	12	0.763	0.012
Teribe	48	15	0.801	0.014
Kuna <sup>2</sup>	63	10	0.592	0.009
Ijka <sup>2</sup>	31	12	0.185	0.004
Kogi <sup>2</sup>	21	10	0.523	0.009
Arsario <sup>2</sup>	28	10	0.725	0.012

N= tamaño muestral; S= sitios segregantes; h= diversidad haplotípica;  $\pi$ = diversidad nucleotídica. 1= Torroni *et al.* 1993; 2= Santos *et al.* 1994, Batista *et al.* 1995, Kolman *et al.* 1995, Kolman & Bermingham 1997, Melton 2008.

**Cuadro 7.** Diversidad genética en la región control del ADNmt de los teribes y valores de los estadísticos D de Tajima y Fs de Fu para esta etnia

Segmento hipervariable	S	% sitios segregantes	h	$\pi$	D	Fs
HVS-I	15	3.89	0.801	0.014	1.0549	-4.7469
HVS-II	7	2.36	0.739	0.008	1.8480	-2.5979
HVS-III	3	2.04	0.610	0.009	0.6195	-9.0161

Los análisis interpopulacionales de variabilidad mostraron un porcentaje de varianza intrapoblacional superior al 70% y un  $F_{st}=0.24181$ , estos resultados sugieren que la mayor variabilidad se encuentra dentro de las poblaciones y no entre ellas, el  $F_{st}$  indica que entre las poblaciones podría existir una baja o moderada diferenciación genética. Dado que el  $F_{st}$  no es producto de las condiciones actuales de la población, es posible que la baja diferenciación que se observa entre las poblaciones de la Baja América Central y las del norte de Sur América sea producto tanto de las diferencias culturales entre tribus como de la colonización española, ambos sucesos pudieron haber generado las diferencias genéticas que se observan en la actualidad entre estos grupos étnicos.

Las pruebas de neutralidad empleadas para evaluar si la región control del ADNmt de los teribes se encontraba bajo el modelo de evolución neutral fueron la D de Tajima (Tajima 1989), Fs de Fu (Fu 1997) y F de Ewens-Watterson. (Ewens 1972, Watterson 1978). Los tres estimadores fueron desarrollados a partir del modelo infinito de alelos

(MIA) propuesto por Kimura y Crow en 1964 (Kimura & Crow 1964, Hedrick 2005), salvo que las pruebas de neutralidad de Tajima y Fu se basan en el MIA sin recombinación mientras que la prueba de Ewens-Watterson puede ser usada tanto para datos diploides como haploides. La diferencia entre los tres estimadores radica en que la  $D$  de Tajima toma en cuenta la información de los nucleótidos en las secuencias así como las frecuencias de las diferentes secuencias y las diferencias entre ellas; la  $F$  de Ewens-Watterson solo considera la frecuencia de los alelos observados y no las diferencias entre ellos y la  $F_s$  de Fu utiliza la información de la distribución de los haplotipos (Hedrick 2005, Melton 2008).

Los resultados de las pruebas de neutralidad realizadas sobre los tres segmentos hipervariables de la región control del ADNmt de los teribes (Cuadro 8), sugieren que estas regiones se encuentran bajo el modelo de evolución neutral. De acuerdo con la literatura valores positivos en la  $D$  de Tajima indican un cuello de botella reciente, mientras que valores negativos en la  $F_s$  de Fu indican que ha ocurrido una expansión demográfica (Ramos-Onsins & Rozas 2002, Melton 2008, Excoffier & Lischer 2010). Los valores de estos estadísticos (Cuadro 7) indican que el grupo amerindio teribe pudo haber atravesado por un cuello de botella reciente y una expansión demográfica.

**Cuadro 8.** Valores de probabilidad de los estadísticos D de Tajima, F de Ewens-Watterson y Fs de Fu para los tres segmentos hipervariables de la región control del ADNmt de los teribes

Segmentos hipervariables	D	F	Fs**
HVS-I	0.8830	0.8140	0.0830
HVS-II	0.9740	0.9990	0.0580
HVS-III	0.7430	0.9700	0.0200

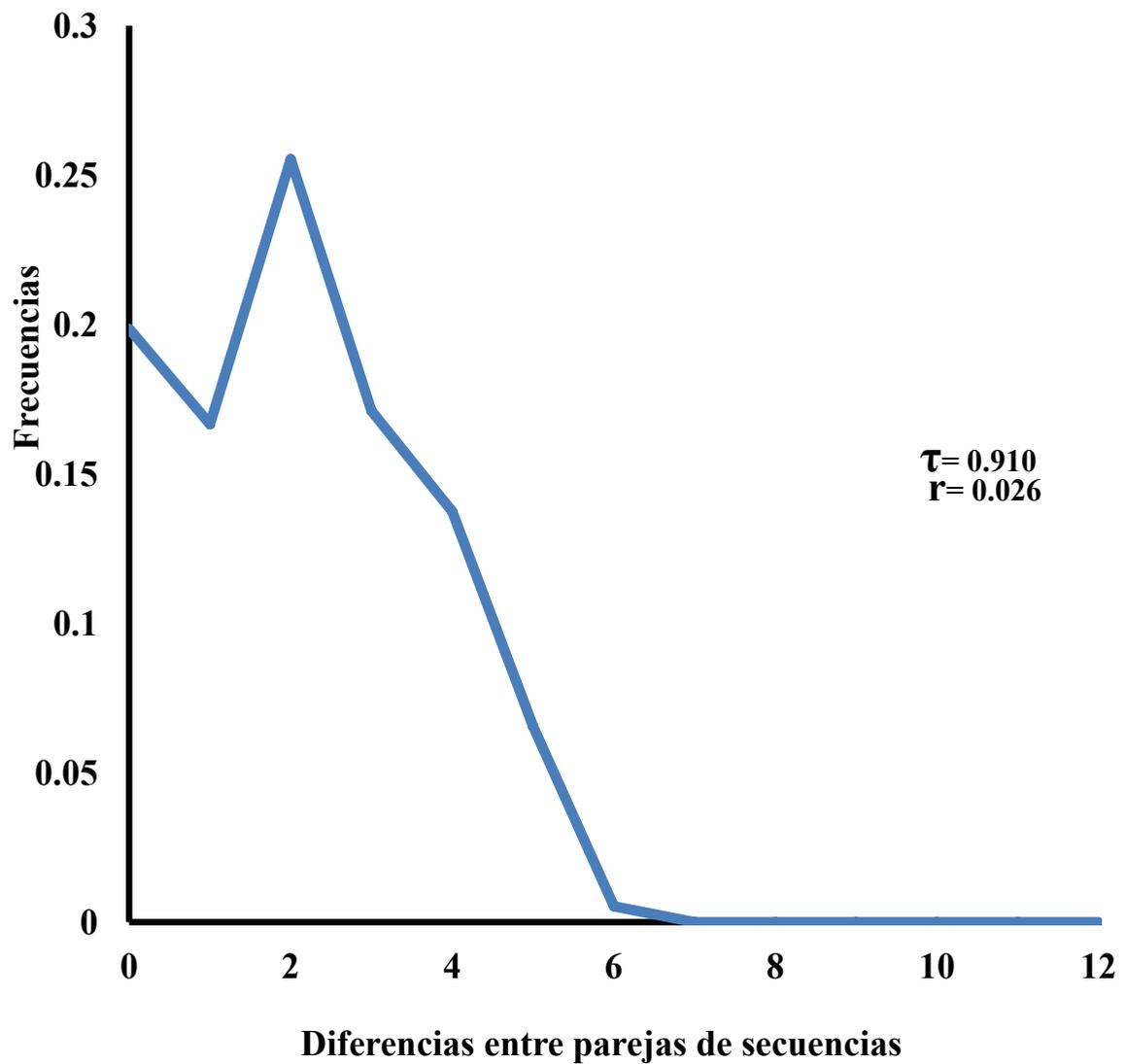
\*\*El estadístico Fs es considerado significativo al 5% cuando el valor de probabilidad sea inferior a 0.02 y no inferior a 0.05, esto es debido a que el punto crítico de significancia estadística se encuentra por debajo del segundo percentil de su distribución empírica (Fu 1997, Excoffier & Lischer 2010).

### C. Distribución de diferencias entre parejas

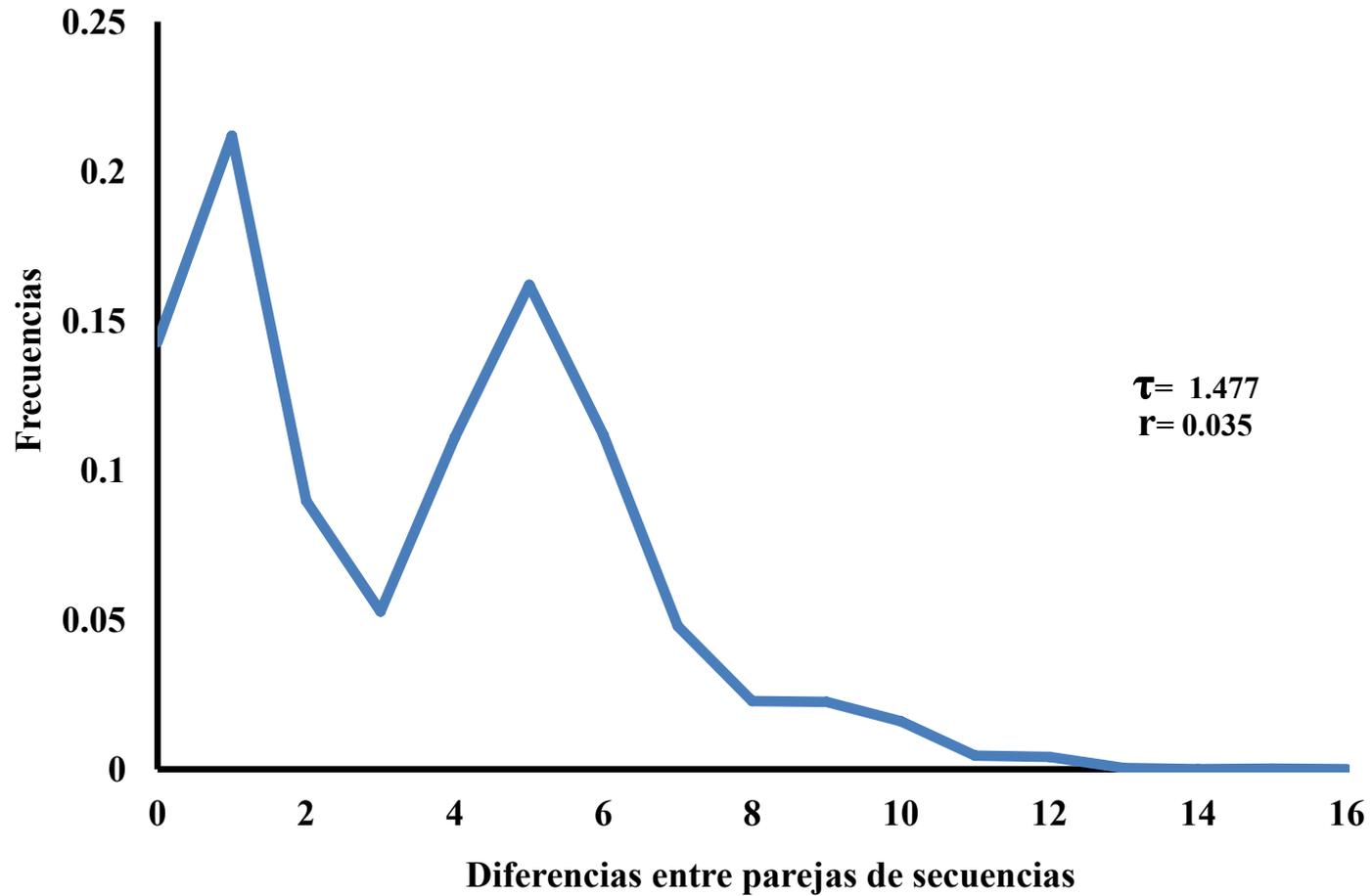
Las distribuciones de las diferencias entre pares de secuencias fueron calculadas para los teribes y para un conjunto de nueve poblaciones chibchas que actualmente se localizan en la región de Talamanca, en la parte este de Panamá y norte de Colombia. Para cada distribución se evaluó el índice de desigualdad de Harpending (Rogers & Harpending 1992), este valor fue utilizado para determinar si las poblaciones eran compatibles con el modelo de expansión demográfica súbita, el cual se basa el modelo de alelos infinitos propuesto por Kimura en 1971 (Librado & Rozas 2009). Para determinar el tiempo de la expansión chibcha se utilizaron las tasas de mutación de  $1.72 \times 10^{-3}$  por generación y  $2.27 \times 10^{-3}$  por generación (Torróni *et al.* 1994) y el tiempo generacional de 27 años por generación (Neel & Weiss 1975, Ruíz-Narvaéz *et al.* 2005).

Los resultados obtenidos de las distribuciones de las diferencias por parejas de secuencias para el HVS-I del ADNmt de los teribes (Fig. 10), el índice de desigualdad

de Harpending, la  $F_s$  de  $F_u$  y la cantidad de sitios segregantes (Cuadro 7), sugieren que la población teribe pasó por una expansión demográfica hace aproximadamente entre 5,411 y 7,142 años, la misma pudo haber ocurrido a inicios del holoceno durante el periodo arcaico de América (10,000-3,000 a.C.) (Sonneborn 2007), en términos lingüísticos la expansión de los teribes podría estar ubicada dentro del periodo en que ocurrió la fragmentación de microfilo lenmichí hace 8,000 a.C. (Constenla Umaña 2008) y la escisión de las lenguas chibchas hace 6,800 a.C. (Barrantes 1993). El estadístico  $D$  de Tajima para esta población fue de  $D=1.0549$  lo que sugiere que este grupo étnico pudo haber pasado por un cuello de botella recientemente.



**Fig. 10.** Distribuciones de las diferencias entre pares de secuencias del HVS-I del ADNmt de los teribes.  $\tau$ = estimador de la distribución de las diferencias entre parejas y  $r$ =índice de desigualdad de Harpending.



**Fig. 11.** Distribución de diferencias entre pares de secuencias del HVS-I del ADNmt de poblaciones chibchas de la Baja Centroamérica y norte de Colombia. Los grupos amerindios usados en este análisis fueron: boruca, bribri, huetar, teribe, ngöbe, kuna, ijka, kogi y arsario.

La distribución de diferencias entre parejas de un conjunto de nueve poblaciones chibchas (Fig. 11), sugiere crecimiento demográfico, esto es compatible con valores en los estadísticos  $D$  de Tajima y  $F_s$  de Fu de  $-1.127$  y  $-15.771$  respectivamente, aunque los valores en los estadísticos antes mencionados no sugieran un cuello de botella reciente, la forma bimodal de esta distribución sí es sugerente de que las tribus chibchas pudieron haber experimentado un cuello de botella en un pasado no muy lejano y que es probable que se encuentren en un periodo demográfico estacionario, esto se corrobora con el valor del índice de desigualdad de Harpending de  $0.035$ , que indica que valores superiores al punto crítico de corte de  $0.03$  en este estadístico es característico de poblaciones demográficamente estacionarias (Rogers & Harpending 1992). El tiempo de expansión de estas etnias se estimó en aproximadamente entre  $8,783$  y  $11,592$  años, en términos geológicos este tiempo de coalescencia sugiere correspondencia con finales del pleistoceno e inicios del holoceno hace aproximadamente  $10,000$  y  $12,000$  años a.C. y por consiguiente con el periodo arcaico de América, el cual es caracterizado por el surgimiento de la agricultura en el continente lo cual corresponde, aproximadamente al periodo comprendido entre los años  $10,000 - 11,000$  a.C. (Melton 2008).

## **D. Análisis filogenéticos**

Para evitar distorsiones en la estructura del árbol por aquellas variantes más recientes, se utilizó la corrección de la distribución gamma con un parámetro  $\alpha = 0.47$  calculado por Wakeley en 1993 (Wakeley 1993), esta corrección se basa en el modelo de variación de las tasas de sustitución de nucleótidos (Gross 2006, Pevsner 2009). Las Relaciones filogenéticas se realizaron mediante el método estadístico de distancias del vecino más cercano sin raíz para ilustrar dichas relaciones entre las poblaciones chibchas de la región de Talamanca, este de Panamá y la parte norte de Colombia.

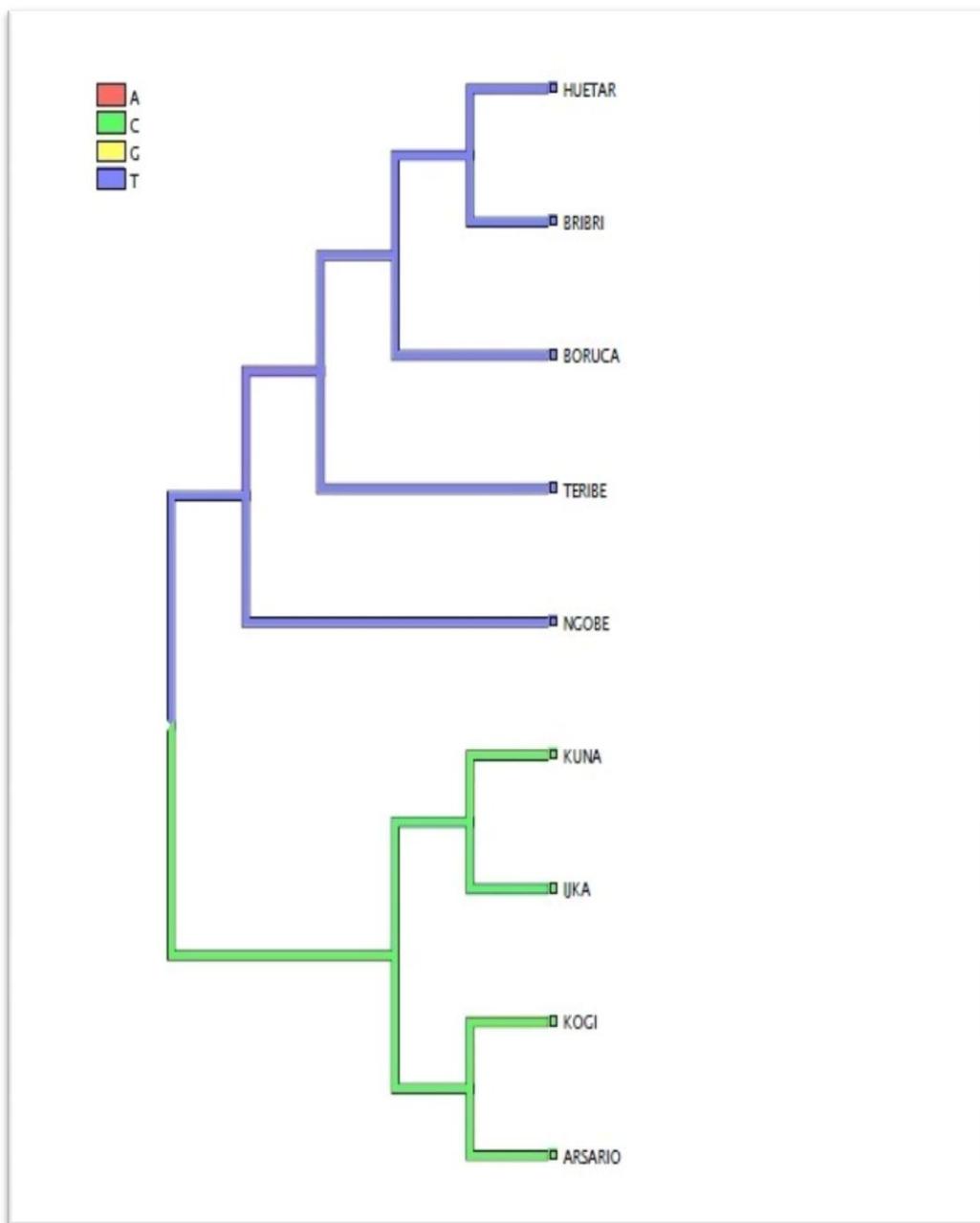
### **D.1. Relaciones filogenéticas**

Las Relaciones filogenéticas presentadas en la figura 13, exhibe una separación entre las tribus Talamanqueñas y las poblaciones chibchas ubicadas en la parte este de Panamá y norte de Colombia, cabe la posibilidad de que esta separación pueda ser explicada por una transición de C→T en la posición 16111 (Fig.13) en el HVS-I de la región control de su ADNmt, las poblaciones chibchas que se encuentran entre la parte sur de Costa Rica y oeste de Panamá (huetar, bribri, boruca, teribe y ngöbe) poseen una timina (T) en la posición antes mencionada, mientras que las tribus chibchas ubicadas en la parte este de Panamá (kuna) y noroccidental de Colombia (ijka, kogi y arsario) poseen una citocina (C) en la posición 16111; esto sugiere que en algún momento en el pasado los kunas pudieron haber tenido contacto con las etnias sureñas antes mencionada, esta posible relación fue expuesta por Barrantes en 1993 de acuerdo con los resultados obtenidos del análisis genético que realizó con los sistemas Diego y transferrina (Barrantes 1993), cabe mencionar que esta transición no se ha identificado

en poblaciones asiáticas a excepción de unas pocas poblaciones del este de Siberia, incluyendo los chukchi del noreste de Siberia, esto podría ser indicativo de que este marcador se originó en Beringia poco después del asentamiento en este territorio (Eshleman *et al.* 2003). Los grupos que parecen tener más afinidad genética a nivel de su ADNmt son: los bribris y huetares por parte de los grupos talamanqueños, los kunas con los ijkas y los kogi con arsario por parte de las etnias de Colombia y este de Panamá.



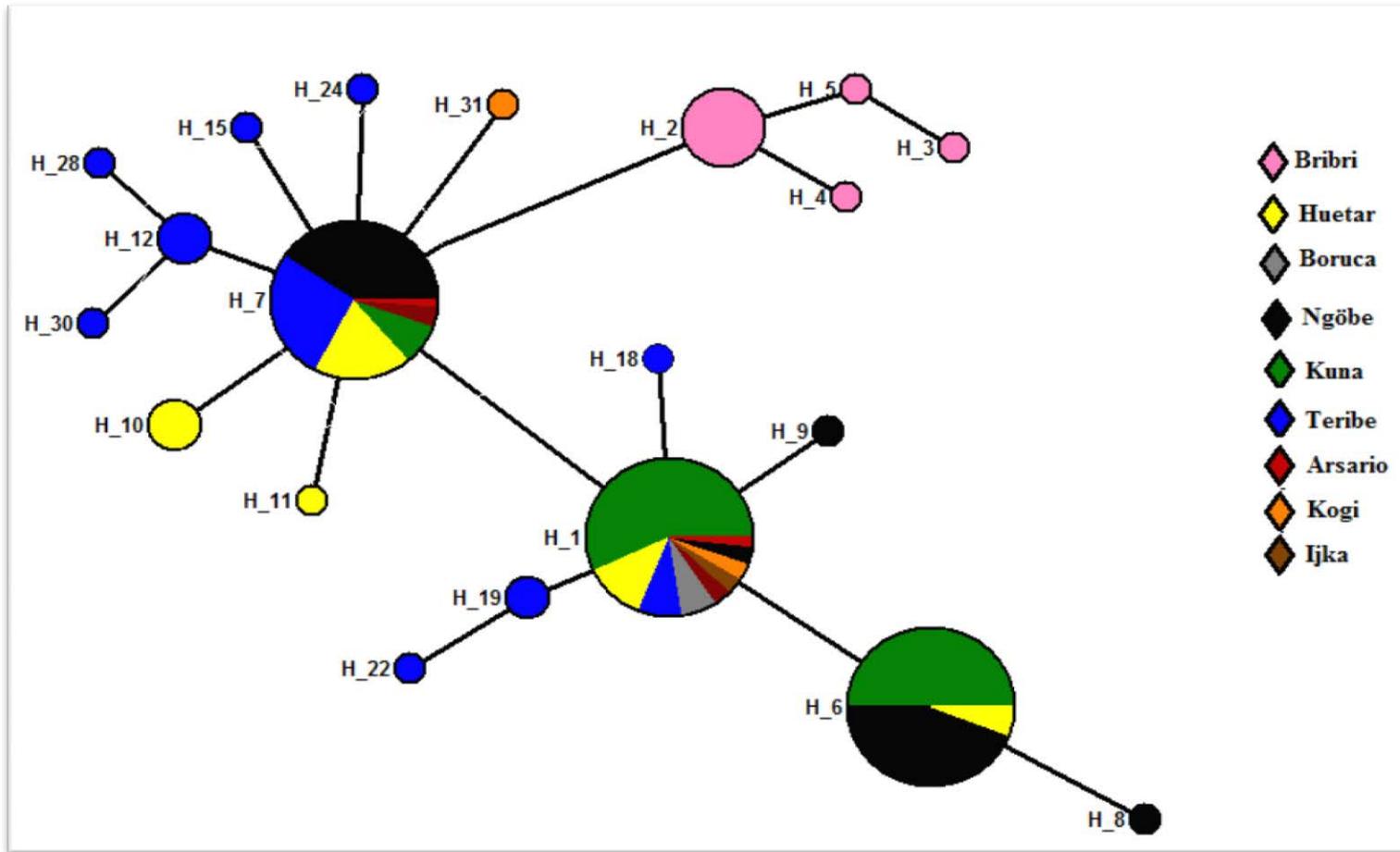
**Fig. 12.** Reconstrucción de las relaciones filogenéticas utilizando el método de distancias del vecino más cercano sin raíz.



**Fig. 13.** Reconstrucción del estado ancestral para la posición 16111 del HVSI de la región control del ADNmt de amerindios chibchas de Costa Rica, Panamá y Colombia. Los grupos con el color verde poseen una C en lugar de una T, mientras que las poblaciones con el color violeta poseen una T en lugar de una C.

## D.2. Redes medias vecinas

Los haplotipos fueron definidos mediante el uso del programa informático DnaSP a partir de secuencias del HVS-I de la región control del ADNmt de 205 individuos de filiación lingüística chibcha, distribuidos en un conjunto de nueve poblaciones. La forma haplotípica más común entre los individuos evaluados es el haplotipo definido como H\_7, el mismo cuenta con aproximadamente un 38.14% de individuos portadores, seguido por el H\_1 y H\_6 con porcentajes de portadores entre 29.89% y 17.53% respectivamente. De la forma haplotípica H\_7 parecen derivar los haplotipos H\_1 y H\_6, así como también el agrupamiento formado por el grupo bribri, el cual aparentemente no comparte formas haplotípicas con ninguno de los otros grupos amerindios evaluados, esto podría indicar que las formas haplotípicas expuestas por los bribris (Fig. 14) pudieron haberse originado durante la expansión chibcha, posiblemente durante la revolución neolítica, ya que durante este periodo se desarrolló la agricultura y el estilo de vida cambió de nómada a sedentario, lo que posiblemente llevó a que las poblaciones empezaran a acumular mutaciones que permitirían su posterior diferenciación genética y por consiguiente cultural (Eshleman *et al.* 2003, Melton 2008). El tiempo de expansión para este tipo de filogenia se estima en aproximadamente 13,333 a.C. años con una desviación estándar de 5,626 a.C., lo que corresponde hablando en términos de la prehistoria de América al periodo conocido como paleoindio el cual tuvo lugar hace más de trece mil años, hacia el final del último periodo glacial (Cooke 2005).



**Fig.14.** Red filogenética de medias vecinas. Las formas haplotípicas expuestas en esta filogenia fueron definidas a través del programa DnaSP el cual asigno y agrupo a las poblaciones de acuerdo a sus afinidades genéticas. Las formas haplotípicas más comunes son la H\_7, H\_1 y H\_6, estas son compartidas por aproximadamente el 85.56% de las poblaciones, El 14.44% restante podrían considerarse formas haplotípicas derivadas de las tres principales mencionadas anteriormente.

## DISCUSIÓN

### A. Variación genética

Las mutaciones más frecuentemente observadas en el asa D de la región control del ADNmt del grupo amerindio teribe de Panamá, fueron las transiciones de tipo pirimidínico con una frecuencia de ocurrencia del 71%, dentro de este tipo de sustituciones los cambios C→T fueron los más comunes (Tabla 4). La frecuencia de sustituciones de bases individuales no es aleatoria, esto probablemente se deba a que evolutivamente las transiciones se ven más favorecidas que las transversiones debido a que provocan una menor desorganización en el ADN y por ello son menos reconocidas como errores y en consecuencia llevan una probabilidad menor de ser corregidas, las diferencias entre las proporciones de transiciones y transversiones se conoce como sesgo de transición (Wakeley 1996, Strandberg & Salter 2004, Keller *et al.* 2007), la estimación del mismo podría ser de interés para evaluar las tendencias mutacionales en las regiones mitocondriales estudiadas, ya que las mismas pueden variar tanto en frecuencia como en proporción en los segmentos analizados, además al tener conocimiento acerca de estos patrones de sustitución se podrían estimar las relaciones filogenéticas de forma más fidedigna. Tanto en el ADN codificante como no codificante de vertebrados existe una elevada frecuencia de transiciones C→T, estas probablemente son resultado de la inestabilidad química de residuos de citocina que ocurren en el dinucleótido CpG (Strachan & Read 2006).

La mutación C→T suele ocurrir cuando los residuos de citocina se metilan en el carbono 5, esto provoca que la 5-metil-citocina sea inestable y propensa a desaminación

espontánea (Nelson & Cox 2008, Knight 2009, Vogel & Motulsky 2010), lo que generaría una perturbación en el espacio electrónico del tercer orbital en el último subnivel energético de la banda de valencias del carbono 4 de la citocina, ocasionada probablemente por la migración del átomo de hidrogeno del carbono 5 de la citocina después de la metilación, este evento provocaría el desplazamiento del grupo amino de la 5-metilcitocina lo que genera la formación de un grupo ceto en el carbono 4 de la citocina metilada, transformándola de esta forma en una timina lo que produce un cambio tautomérico debido a un emparejamiento erróneo entre la citocina y la timina provocando el evento de transición mencionado anteriormente (Vollhardt & Peter 2007, Mcmurry 2008, Nelson & Cox 2008). Al generarse un cambio de C→T en la región no codificante del ADNmt, el mismo podría catalogarse como una mutación neutra, debido a que posiblemente tanto el valor adaptativo como reproductivo de los individuos en una población no se verían afectados; sin embargo, este cambio podría producir variantes mitocondriales entre dichos individuos, lo que causaría variación genética de tipo heteroplásmico ya sea a nivel individual o poblacional, como se observa en las posiciones 532, 613, 16232, 16239, 16248 de los teribes (Fig. 6) en donde solo algunos individuos exhiben una T en lugar de una C, mientras que otros si se corresponden con la secuencia de referencia Anderson la cual presenta una citocina en esas posiciones.

La región control del ADNmt de los teribes exhibe una proporción de sitios segregantes del 3%, bajos niveles de diversidad nucleotídica y haplotípica (Tabla 7), lo que sugiere que al igual que otras tribus amerindias de filiación chibcha, los teribes de Panamá presentan una diversidad genética reducida, la cual posiblemente sea efecto del

drástico cuello de botella por el que atravesaron estas poblaciones durante el periodo colonial, sin embargo, aunque la colonia afectó considerablemente el tamaño de las poblaciones amerindias, sería conveniente mencionar que los conflictos intertribales que se dieron después de la colonización junto con las enfermedades a las que se vieron expuestos estos grupos étnicos, también afectaron la constitución genética de estas tribus (Barrantes 1993). En el caso específico de los teribe, su tamaño poblacional se ha visto muy afectado debido a eventos históricos como fraccionamiento de la población por monjes franciscanos a principios del siglo XVIII, conflictos territoriales tanto con grupos étnicos indígenas como no indígenas durante el siglo XIX y exposición a enfermedades infecciosas a principios del XX (Instituto de Estudios de las Tradiciones Sagradas de Abia Yala, 2001), aunque es una de las etnias minoritarias en Panamá, a juzgar por los resultados obtenidos para el HVS-I los teribes o Tjer-di, como se hacen llamar hoy en día, exhibieron valores ligeramente más elevados tanto en diversidad haplotípica como nucleotídica en comparación con los otros grupos de filiación chibcha con los que se contrastaron estas medidas de diversidad, esto sugiere que en los teribes la HVS-I es un poco más estable ante los efectos de la deriva que sus otras tribus hermanas que se presentan menos variables en esta región mitocondrial. El pequeño grado de diferenciación genética que se observa entre los teribes debido a los valores de diversidad ligeramente altos que obtuvieron en comparación con sus grupos hermanos, probablemente sea el reflejo del bajo porcentaje de heteroplasmia que se registró en esta etnia, el cual posiblemente se deba a los eventos de sustitución nucleotídica que observaron en las regiones mitocondriales estudiadas.

Las poblaciones amerindias están conformadas principalmente por grupos familiares con sistemas de uniones en los que se registran altos niveles de endocruzamiento, sin embargo cuando escasean tanto el espacio como los recursos se generan tensiones que provocan que algunas familias se escindan del grupo principal, estas microfisiones podrían ocurrir en otras localidades en momentos temporales diferentes, generando un efecto lineal en la unidad de cruzamiento evolutiva; finalmente los grupos familiares escindidos durante el proceso de migración tienden a fusionarse entre si o con grupos de otras localidades formando de esta manera una nueva población (Barrantes 1993). La baja diferenciación que se observó entre las tribus estudiadas podría ser adjudicada a los patrones de fisión-fusión que se mencionaron anteriormente, por consiguiente estos patrones también podrían explicar la elevada variabilidad intrapoblacional que exhibieron estos grupos, ya que cuando varios grupos familiares pertenecientes o no a diferentes poblaciones se unen, los mismos generarían ciertos niveles de variabilidad genética dentro del nuevo grupo que han formado, debido al mestizaje que podría generarse en la nueva población, la misma podría adquirir una composición genética similar a la de las poblaciones de las cuales se originaron, posiblemente esta sea la razón por la cual las poblaciones chibchas analizadas exhiban poca diferenciación genética entre ellas y una mayor varianza dentro de las mismas. La población teribe, al igual que otras tribus amerindias de la región de la Baja América Central han pasado por cierto tipo de eventos históricos que pudieron haber generado escisiones y nuevos agrupamientos o expansiones poblacionales, las cuales con el tiempo por diferencias culturales pudieron haber generado cierto grado de diversidad genética tanto a nivel

nuclear como mitocondrial y por ende se pudo haber producido los bajos niveles de diferenciación que se observan en la actualidad entre estas poblaciones.

### **B. Análisis filogenéticos**

Barrantes *et al.* (1990), a partir de las distancias genéticas obtenidas de 48 marcadores nucleares, y lingüísticas de ocho poblaciones amerindias (bocotás bribri, brouca, cabecar, guatuso, guaymi (ngöbe), kuna, teribe) se establecieron las relaciones filogenéticas y filolingüísticas de las mismas, sus resultados mostraron que los bribri y cabécar son muy parecidos, de acuerdo con los datos etnohistóricos ambas tribus tradicionalmente se encuentran muy relacionadas debido a la continuidad geográfica, temporal y cultural que mantienen desde tiempos precolombinos (Barrantes *et al.* 1990, Barrantes 1993). Los siguientes grupos amerindios que presentaban alta similitud eran los guaymies y bocotás, estas tribus presentan una etnohistoria similar a la de los bribri y cabécar, de allí su parecido, al mismo tiempo los guaymies y bocotás guardan semejanzas con las poblaciones talamaqueñas del oeste y con los kunas al este, por otro lado los teribes se presentan como una tribu con aparente divergencia temprana de los demás grupos talamaqueños, aunque exhiben afinidades con los guatusos del oeste y con los bocotás y guaimies del este; los kunas y los guatusos fueron los que mostraron mayores diferencias entre sí tanto genética como lingüística (Barrantes *et al.* 1990, Barrantes 1993).

De acuerdo con las filogenias realizadas con datos obtenidos a partir de microsatélites del cromosoma Y (Fig. 3), los teribes presentan mayor similitud con grupos chibchas de la Baja América Central y con las tribus cayapa de Ecuador y gaviao

del amazona brasileño, también exhiben cierto grado de semejanza con los grupos amerindios tayacaja y arequipa de los andes peruanos (Ruíz-Narvaéz et al. 2005). Las relaciones que exhiben las tribus chibchas y las de Sur América podrían ser explicadas por el estudio de Wang *et al* (2007), en donde se señalaron que la dispersión de las poblaciones humanas había ocurrido desde el norte de las Américas hacia el sur y que las semejanzas genéticas entre las poblaciones sureñas y mesoamericanas se debían posiblemente a migraciones recientes a lo largo de la costa.

Los análisis filogenéticos utilizando el HVS-I del ADNmt de 205 individuos pertenecientes a nueve poblaciones chibchas (arsario, boruca, bribri, huetar, ijka, kogi, kuna, ngöbe, y teribe), mostraron que los bribbrís y huetares son bastantes similares (Fig. 11), estas semejanzas se deben posiblemente a que los huetares es un grupo que ha estado expuesto al proceso de mezcla de manera más intensa que otros grupos indígenas de Costa Rica, pues los mismos han tenido interacciones con etnias no indígenas y con poblaciones amerindias como guatusos, cabecares y votos ( Santos 1992, Barrantes *et al.* 1990); por consiguiente es probable que los huetares porten en su genoma mitocondrial algún componente cabecar, razón por la cual formarían una agrupación con los bribbrís que comparten una etnohistoria común con los cabecares, este patrón se observa en también en la filogenia de Ruíz-Narváez *et al* (2005) en donde los huetares muestran mayor afinidad con los cabecares (Fig. 3), de acuerdo con lo expuesto los huetares no solo comparten componentes del genoma mitocondrial con los cabecares sino que también comparten genes del cromosoma Y, lo cual explicaría los patrones de agrupamiento entre los bribbrí, cabecares y huetares a nivel del HVS-I del ADNmt y de

microsatélites en el cromosoma Y; como es de esperar los bribris y huetares también muestran cierto grado de afinidad con las otras tribus talamancas. Por su parte los teribes exhiben afinidades al oeste con el grupo boruca, bribri y huetar y hacia el este con los ngöbes, también presentan similitudes con los kunas y con los grupos del norte de Colombia aunque en menor grado. Los kunas por otro lado muestran menos afinidad con las tribus chibchas del oeste aunque presentan mayor similitud con las tribus chibchas del norte de Colombia.

Rasgos culturales básicos compartidos entre poblaciones de talamanca como: semejanzas en los métodos de subsistencia, estructura social, mitos y estilos en la cerámica (Torres 1980, Cooke & Herrera 2004), sugieren que entre estos grupos en algún momento de su historia tuvieron algún tipo de contacto ya sea comercial o biológico entre ellos, la evidencia arqueológica reciente indica que el estilo de cerámica Concepción, pudo haber sido introducido a Panamá desde las cuencas de los ríos Terraba, Sierpe y Coto hace 3,500 – 2,300 a.C., por otra parte hace aproximadamente 1,570 - 590 a.C. los grupos amerindios de la costa Caribe de Costa Rica, cerca de la frontera con Panamá, practicaban la alfarería del estilo black creek, por lo que cabe la posibilidad de que algunas tribus de agricultores alfareros se hubieran asentado hace más de 1,300 años en el litoral e islas de la Bahía de Almirante y la laguna Chiriquí, las similitudes que guardan los estilos cerámicos son indicativos de que entre estas tribus se mantenían contactos sociales y trueques (Cooke & Herrera 2004), las regiones costeras mencionadas anteriormente se encuentran cerca de lo que antiguamente era parte del territorio teribe antes de la colonia (Yala 2001). La erupción del volcán Barú hace

aproximadamente 1,000 - 600 d.C., probablemente ocasionó que grupos de migrantes se establecieran en las zonas laguneras de Bocas del Toro (Cooke & Herrera 2004), este evento migratorio posiblemente generó mezclas entre los grupos migrantes y los grupos locales, lo que pudo haber alterado la constitución genética de ambos grupos, a nivel mitocondrial eventos de mutación pudieron haber generado nuevas variantes en las poblaciones, algunas se fijaron, manteniéndose hasta la actualidad en algunas tribus y debido a patrones culturales de unión de cada grupo las mismas han generado las pequeñas diferencias entre estas poblaciones que se observan en los estudios de genética de poblaciones.

Los kunas, por su parte presentan similitudes culturales con las tribus del norte de Colombia, pues su sistema de creencias presenta elementos mitológicos que son más comúnmente identificados con culturas amazónicas (Torres 1980), por su cercanía geográfica es posible que los kunas hayan mantenido mayor contacto social y comercial con los grupos al este de Panamá que con los grupos del oeste. Desde el punto de vista genético la mayoría de los kunas tiene más afinidad con los ijka, arsario y kogi porque en la posición 16111 del HVS-I de su ADNmt las cuatro poblaciones tienen una citocina, esto hizo que al realizarse el análisis filogenético los kunas presentaran mayor cercanía con las poblaciones del norte de Colombia, mientras que los talamancas en esa misma posición poseen una timina, esta filogenia corrobora las divisiones que Torres en 1980 había establecido para estos grupos indígenas, por un lado se encontraba la división Talamanca que involucraba a algunas tribus del oeste de Panamá y a ciertos grupos del sur de Costa Rica y la división kuna, la cual involucraba a las tribus del

archipiélago de las mulatas o San Blas y a las de Darién. Por consiguiente, dadas las evidencias arqueológicas y antropológicas expuestas anteriormente, las interacciones comerciales y sociales de estas poblaciones en el pasado pudieron haber generado algún tipo de contacto biológico en algunos grupos, lo que pudo generar algunos cambios en su constitución genética marcando ciertas semejanzas y diferencias entre ellos las cuales podrían haber generado el patrón de afinidad que se observó en el análisis filogenético de las poblaciones antes mencionadas.

### **C. Patrones demográficos históricos inferidos**

La evaluación del estadístico D de Tajima para los teribes sugiere que esta población atravesó recientemente por un cuello de botella, mientras que los estadísticos  $F_s$  de Fu y el índice de desigualdad de Harpending, junto con el análisis de la distribución de diferencias entre parejas para esta etnia sugieren que la misma paso por una expansión demográfica hace aproximadamente 5,411 - 7,142 a.C. este rango temporal se ubica dentro del periodo arcaico de América el cual ocurrió hace 3,000 - 10,000 y en el tiempo en que ocurrió la división de las lenguas chibchas hace 6,800 a.C. (Barrantes 1993). Por otro lado el análisis demográfico combinado para las nueve poblaciones chibchas, sugiere que estos grupos han experimentado un crecimiento demográfico, mientras que el comportamiento bimodal de la distribución de diferencias entre parejas sugiere que los chibchas pasaron por un cuello de botella recientemente y por un periodo demográfico estacionario de acuerdo con los el valor del índice de desigualdad de Harpending para estas poblaciones.

La datación de los tiempos de expansión chibcha realizados con marcadores microsateliticos del cromosoma Y exhiben un rango temporal entre 2,700 – 17,700 años, mientras que los haplotipos de restricción del ADNmt presenta una estimativa de tiempo de 9,800 – 13,100 años (Ruíz-Narvaéz 1998). Las secuencias del HVS-I del ADNmt de nueve tribus chibchas sugieren tiempos de expansión entre 8,783 - 11,592 años, por su parte las redes medias vecinas de haplotipos señalaron un tiempo estimado de expansión de 13,333 años. Las estimativas temporales de expansión mencionadas anteriormente abarcan el rango de tiempo en que ocurrió la divergencia del grupo protochibcha hace aproximadamente 7,000 -10,000 a.C. (Barrantes et al. 1990), estas estimativas también presentan correspondencia con datos lingüísticos de la fragmentación del microfilo lenmichí hace aproximadamente 8,000 a.C. (Constenla Umaña 2008). Las diferencias en los tiempos de expansión estimados tanto para los marcadores del cromosoma Y como para las secuencias del HVS-I del ADNmt, posiblemente se deban a las diferencias en las tasas de mutación para cada uno de estos genomas. Las tasas de mutación para microsatélites del cromosoma Y han sido estimadas en  $4.14 \times 10^{-3}$  por generación, mientras que para el ADNmt están estimadas entre  $2.27 \times 10^{-3}$  y  $1.72 \times 10^{-3}$  por generación (Ruíz-Narvaéz et al. 2005), mientras más rápida y estable sea la velocidad a la que se generan cambios en determinado genoma, mayor podría ser la cantidad de eventos mutacionales que el mismo podría acumular a través del tiempo, posiblemente esta sea la causa de que los tiempos de expansión estimados para marcadores del cromosoma Y sean más reciente que los estimados para la región control del ADNmt.

Al evaluar los tiempos de expansión con el parámetro kappa, se obtuvieron estimativas temporales de expansión entre 15,087 – 23,107 a.C., estos valores son similares a los obtenidos de 91 secuencias del HVS-I, en donde el intervalo de tiempo de expansión se estimó entre 16,700 – 29,500 a.C. (Ruíz-Narvaéz 1998). Por consiguiente el rango temporal comprendido entre 13,333 – 23,107 años, para las 205 secuencias del HVS-I del ADNmt utilizadas, indica que podrían estar reflejando una expansión anterior a la divergencia del grupo protochibcha, la cual podría estar asociada con la entrada de los primeros humanos al continente Americano (Ruíz-Narvaéz 1998). Por su parte la evidencia arqueológica sugiere que los primeros humanos entraron al continente hace aproximadamente 14,000 – 27,000 años (Sonnenborn 2007, Wells 2003), este intervalo de tiempo abarca los rangos temporales de expansión estimados para las secuencias del HVS-I del ADNmt de los grupos chibchas estudiados, lo que vincula la expansión demográfica estimada hace 13,333 – 23,107 años con el ingreso de los primeros humanos al continente. Sonnenborn (2007), sugiere que los antiguos migrantes que entraron al continente americano eran grupos de cazadores asiáticos que atravesaron Beringia en busca de alimento, pues seguían a las manadas de mamuts, bisontes y renos, después de la migración hacia el continente los mismos se convirtieron en los primeros residentes americanos. Por otra parte los primeros asentamientos en las llanuras de América se registraron hace 10,000 – 17,600 años (Sonnenborn 2007), lo que coincide con el tiempo de expansión máximo estimado para el cromosoma Y en cual fue de 16,700 años (Ruíz-Narvaéz 1998), al mismo tiempo el intervalo temporal de los primeros asentamientos incluye los tiempos estimados para la expansión chibcha hace

8,783 - 11,592 años, el cual abarca al periodo de divergencia del protochibcha. Es posible que los grupos humanos que poblaron el continente hayan pasado por periodos de crecimiento demográfico y subdivisiones, los grupos que se derivaron de estas escisiones posiblemente al tener un número menor de individuos los mismos pudieron ser más susceptibles a los efectos de la deriva, generando en estos grupos pequeñas diferencias que pasaron a formar parte de la constitución genética característica de estas agrupaciones humanas las cuales probablemente dieron origen a las poblaciones amerindias de la actualidad. A nivel mitocondrial y del cromosoma Y los cambios demográficos y variaciones genéticas por las que pasaron estos grupos humanos han quedado registrados en estos genomas, razón por la cual posiblemente al evaluar estas poblaciones las mismas reflejen tiempos estimados de expansión asociados tanto al origen de las poblaciones chibchas como con la entrada de los primeros pobladores del continente.

## CONCLUSIONES

1. Los teribes presentaron bajos niveles de diversidad haplotípica y nucleotídica para los tres segmentos hipervariables, sin embargo al cotejar los valores obtenidos para el HVS-I de su ADNmt con los de otras tribus chibchas de la región, los mismos fueron un poco más elevados, esto probablemente se relacione con la cantidad de eventos de sustitución que se registraron en los teribes, pero en términos generales los valores de diversidad genética de esta etnia no difieren del patrón de variación que sigue la mayoría de los grupos amerindios del continente.
2. La delección Huetar está presente en un 45.83% de los individuos teribes estudiados, en esta etnia el 25% de los individuos presentaban cuatro repeticiones del dinucleótido CA en lugar de las cinco que normalmente se han registrado de acuerdo con la secuencia de referencia Anderson, esta variación en el número de repeticiones generó en los teribes una heteroplasmia por longitud en las posiciones 523-524.

3. Las relaciones filogenéticas de los teribes con respecto a los grupos chibchas con los que se compararon, muestra que los teribes exhiben mas afinidad genética con los grupos talamanqueños que con las tribus kunas del este de Panamá.
4. El tiempo estimado de expansión máximo es de 23,107 años con base en la distribución de diferencias entre parejas para el HVS-I del ADNmt de las poblaciones chibchas evaluadas en este trabajo, corresponde con los datos arqueológicos que hacen referencia a la entrada al continente de los primeros grupos humanos.

## BIBLIOGRAFÍA

- Achilli, A., U.A. Perego, C.M. Bravi, M.D. Coble, Q.P. Kong, S. R. Woodward, A. Salas, A. Torroni & H.J. Bandelt. 2008. The phylogeny of the four pan-American mtDNA haplogroups: Implications for evolutionary and disease Studies. *Plos One*. 3. 1-8.
- Azofeifa, J., E. Ruiz & R. Barrantes. 2001. Blood group, red cell, and serum protein variation in the Cabecar and Huetar, two Chibchan amerindian tribes of Costa Rica. *Am. J. Hum. Biol.* 13. 57-64.
- Barrantes, R., P. E. Smouse, J. V. Neel, H. W. Mohrenweiser & H. Gershowitz. 1982. Migration and genetic infrastructure of the Central American Guaymi and their affinities with other tribal groups. *A.J.P.A.* 58. 201-14.
- Barrantes, R., P.E. Smouse, H.W. Mohrenweiser, H. Gershowitz, J. Azofeifa, T.D. Arias & J.V. Neel. 1990. Microevolution in lower Central America: Genetic characterization of the Chibcha-speaking groups of Costa Rica and Panama, and a consensus taxonomy based on genetic and linguistic affinity. *Am. J. Hum. Genet.* 46. 63-84.
- Barrantes, R. 1993. *Evolución en el tropico: Los amerindios de Costa Rica y Panamá*. Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.
- Batista, O. 1995. *Variación en el ADN mitocondrial del grupo amerindio cuna de Panamá*. Magister Scientiae (MSc). Universidad de Costa Rica.
- Bieber, H., S. W. Bieber, A. Rodewald & R. Barrantes. 1996. Microevolution and genetic affinities among six Amerindian tribes of lower Central America: Comparative genetic study of serum proteins. *Hum. Biol.* 68. 929-53.
- Constenla Umaña, A. 2002. *Acerca de la relación genealógica entre las lenguas lencas y las lenguas misumalpas*. *Filología y Lingüística-Universidad de Costa Rica* 28. 189-206.
- Constenla Umaña, A. 2005. *¿Existe relación genealógica entre las lenguas misumalpas y las chibchenses?* . *Estudios de Lingüística Chibcha*. 24. 7-85.
- Constenla Umaña, A. 2008. *Estado actual de la subclasificación de las lenguas chibchenses y de la reconstrucción fonológica y gramatical del protochibchense*. *Estudios de Lingüística Chibcha*. 27. 117-35.
- Cooke, R. & L.A.S. Herrera. 2004. *Historia general de Panamá: Panamá prehispánico*. Comité nacional del centenario de la República de Panamá. Panamá.
- Cooke, R. 2005. *Prehistory of native americans on the Central American land bridge: colonization, dispersal, and divergence*. *J. Archeol. Res.* 13. 129-87.

- Eshleman, J.A., R. S. Malhi & D.G. Smith. 2003. Mitochondrial DNA studies of native americans: conceptions and misconceptions of the population prehistory of the Americas. *Evol. Anthropol.* 12. 7-18.
- Ewens, W.J. 1972. The sampling theory of selectively neutral alleles. *Theor. Popul. Biol.* 3. 87-112.
- Excoffier, L. & H.E.L. Lischer. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.* 10. 564-67.
- Fagundes, N.J.R., R. Kanitz & S.L. Bonatto. 2008. A reevaluation of the native american mtDNA genome diversity and its bearing on the models of early colonization of Beringia. *Plos one.* 3. 1-5.
- Felsenstein, J. 2004. *Inferring Phylogenies*. Sinauer Associates. Massachusetts, USA.
- Fernández, E. 2000. Polimorfismos de DNA mitocondrial en poblaciones antiguas de la cuenca mediterranea. Thesis. Doctor (Dr). Universidad de Barcelona.
- Fu, Y.X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics.* 147. 915-25.
- Chung, U., H. Y. Lee, J. E. Yoo, M. J. Park & K.J. Shin. 2005. Mitochondrial DNA CA dinucleotide repeats in Koreans: the presence of length heteroplasmy. *Int. J. Legal Med.* 119. 50-53.
- Gilbert, M.T., T. Kivisild, B. Gronnow, P. K. Andersen, E. Metspalu, M. Reidla, E. Tamm, E. Axelsson, A. Gotherstrom, P. F. Campos, M. Rasmussen, M. Metspalu, T. F. Higham, J. L. Schwenninger, R. Nathan, C. J. De Hoog, A. Koch, L. N. Möller, C. Andreasen, M. Meldgaard, R. Villems, C. Bendixen & E. Willerslev. 2008. Paleo-Eskimo mtDNA genome reveals matrilineal discontinuity in Greenland. *Science.* 320. 1787-89.
- Gordon, B.L. 1982. *A Panama forest and shore: Natural History and amerindian culture in Bocas del Toro*. Pacific Grove. California, USA.
- Gross, H.J. 2006. *Human mitochondrial DNA and evolution of Homo sapiens*. Springer. Berlin, Alemania.
- Hall, T. 2001. Help file for BioEdit version 5.0.6. Carlsbad, CA. USA.
- Hasegawa, M., A. Di Rienzo, T. D. Kocher & A.C. Wilson. 1993. Toward a more accurate time scale for the human mitochondrial DNA tree. *J. Mol. Evol.* 37 347-54.
- Hedrick, P.W. 2005. *Genetics of populations*. Jones and Bartlett. Massachusetts, USA.

- Hoopes, J. & O. Fonseca. 2003. Goldwork and Chibcha identity: Endogenous change and diffuse unity in the isthmo-Colombian area. p. 49-89. In J. Quilter & J. Hopes (eds). *Goldwork and Chibcha identity: Endogenous change and diffuse unity in the isthmo-Colombian area*. Dumbarton Oaks, Washington DC.
- Howell, N. & C.B. Smejkal. 2000. Persistent heteroplasmy of a mutation in the human mtDNA control region: hypermutation as an apparent consequence of simple-repeat expansion/contraction. *Am. J. Hum. Genet.* 66. 1589-98.
- Keller, I., D. Bensasson & A.R. Nichols. 2007. Transition-transversion bias is not universal: A counter example from grasshopper pseudogenes. *Plos Genetics.* 3. 0185-91.
- Kimura, M. & J.F. Crow. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics.* 49. 725-38.
- Knight, J.C. 2009. *Human genetic diversity: functional consequences for health and disease*. Oxford university press. New York, USA.
- Kolman, C.J. & E. Bermingham. 1997. Mitochondrial and nuclear DNA diversity in the Choco and Chibcha amerinds of Panama. *Genetics.* 147. 1289-302.
- Kolman, C.J., E. Bermingham, R. Cooke, R. H. Ward, T. D. Arias & F. Guionneau-Sinclair. 1995. Reduced mtDNA diversity in the Ngöbé amerinds of Panama. *Genetics.* 140. 275-83.
- Lange, F.W. & D. Stone. 1984. *The Archeology of lower Central America: A school of american research book*. University of New Mexico. Albuquerque, New Mexico.
- Librado, P. & J. Rozas. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics.* 25. 1451-52.
- McMurry, J. 2008. *Organic chemistry*. Thomson Learning. California, USA.
- Melton, P.E. 2005. *Molecular perspectives on the origins of Chibchan populations from the Sierra Nevada de Santa Marta, Colombia*. Magister Scientiae (MSc). University of Kansas.
- Melton, P.E., I. Briceño, A. Gómez, E.J. Devor, J.E. Bernal & M.H. Crawford. 2007. Biological relationship between Central and South American Chibchan speaking populations: Evidence from mtDNA. *A.J.P.A.* 133. 753-70.
- Melton, P.E. 2008. *Genetic history and pre-Columbian diaspora of Chibchan speaking populations: Molecular genetic evidence*. Doctor of Philosophy (Phd). University of Kansas.

- Neel, J.V. & K.M. Weiss. 1975. The genetic structure of a tribal population, the Yanomama Indians. XII. Biodemographic studies. *Am. J. Phys. Anthropol.* 42. 25-51.
- Nelson, D.L. & M.M. Cox. 2008. *Lehninger: principles of biochemistry*. W. H. Freeman and Company. New York, USA.
- O'Rourke, D.H. & B.K. Suarez. 1985. Patterns and correlates of genetic variation in south amerindians. *Ann. Hum. Biol.* 3. 13-31.
- O'Rourke, D.H., B. K. Suarez & J.D. Crouse. 1985. Genetic variation in north amerindian populations: co- variance with climate. *Am. J. Phys. Anthropol.* 67. 241-50.
- O'Rourke, D.H. & J.R. Raff. 2010. The human genetic history of the Americas: the final frontier. *Current Biology.* 20. 202-07.
- Pakendorf, B. & M. Stoneking. 2005. Mitochondrial DNA and human evolution. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 6. 165-83.
- Perego, U.A., A. Achilli, N. Angerhofer, M. Accetturo, M. Pala, A. Olivieri, B. H. Kashani, K. H. Ritchie, R. Scozzari, Q. P. Kong, N. M. Myres, A. Salas, O. Semino, H. J. Bandelt, S. R. Woodward & A. Torroni. 2009. Distinctive paleo-indian migration routes from Beringia marked by two rare mtDNA haplogroups. *Current Biology.* 19. 1-8.
- Pevsner, J. 2009. *Bioinformatics and functional genomics*. Wiley- Blackwell. New Jersey, USA.
- Quesada, J.D. 2001. *Teribes y Terrabas: Recuentos de un reencuentro*. Universidad de Costa Rica, Ciudad Universitaria Rodrigo Facio. San José, Costa Rica.
- Ramos-Onsins, S.E. & J. Rozas. 2002. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Mol. Biol. Evol.* 19. 2092-100.
- Reverté, J. 1967. *Los indios Teribes de Panamá*. Panamá, Ciudad de Panamá.
- Rogers, A.R. & H. Harpending. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol. Biol. Evol.* 9.
- Ruíz-Narvaéz, E.A. 1999. *Variación genética del cromosoma Y en las poblaciones amerindias de Costa Rica y Panamá*. Magister Scientiae (MSc). Universidad de Costa Rica.
- Ruíz-Narvaez, E.A., F. R. Santos, D. R. Carvalho-Silva, J. Azofeifa, R. Barrantes & S.D.J. Pena. 2005. Genetic Variation of the Y Chromosome in Chibcha-Speaking Amerindians of Costa Rica and Panama. *Hum. Biol.* 77. 71-91.
- Santos, M. 1992. *Análisis de variación genética del ADNmt y nuclear de una población amerindia, huetar, Costa Rica*. Magister Scientiae (MSc). Universidad de Costa Rica.

- Santos, M., R. H. Ward & R. Barrantes. 1994. mtDNA variation in the Chibcha amerindian Huetar from Costa Rica. *Hum. Biol.* 66. 963-77.
- Schurr, T.G. & S.T. Sherry. 2004. Mitochondrial DNA and Y chromosome diversity and the peopling of the Americas: evolutionary and demographic evidence. *Am. J. Hum. Biol.* 16. 420-39.
- Shannon, C.E. 1948. A mathematical theory of communication. *Bell Syst. Tech. J.* 27. 1-55.
- Shitara, H., J. I. Hayashi, S. Takahama, H. Kaneda & H. Yonekawa. 1998. Maternal inheritance of mouse mtDNA in interspecific hybrids: segregation of the leaked paternal mtDNA followed by the prevention of subsequent paternal leakage. *Genetics*. 148. 851-57.
- Sonneborn, L. 2007. Chronology of american indian history. 481. In *Chronology of american indian history*. Facts On File, New York, USA.
- Stoneking, M., S.T. Sherry, A. J. Redd & L. Vigilant. 1992. New approaches to dating suggest a recent age for the human mtDNA ancestor. *Philos. Trans. R. Soc. London B Biol. Sci.* 337. 167-75.
- Strachan, T. & A.P. Read. 2006. *Genética Humana*. Mc Graw Hill. New York, USA.
- Strandberg, A.K. & L.A. Salter. 2004. A comparison of methods for estimating the transition:transversion ratio from DNA sequences. *Mol. Phyl. Evol.* 32. 495-503.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123. 585-95.
- Tamm, E., T. Kivisild, M. Reidla, M. Metspalu, D. G. Smith, C. J. Mulligan, C. M. Bravi, O. Rickards, C. Martinez-Labarga, E. K. Khusnutdinova, S. A. Fedorova, M. V. Golubenko, V. A. Stepanov, M. A. Gubina, S. I. Zhadanov, L. P. Ossipova, L. Damba, M. I. Voevoda, J. E. Dipierri, R. Villems & R.S. Malhi. 2007. Beringian standstill and spread of native american founders. *Plos One*. 2. 1-6.
- Torres, R. 1980. *Panamá indígena*. Instituto Nacional de Cultura. Panamá, Ciudad de Panamá.
- Torrioni, A., Schurr T. G., C. C. Yang, E. J. E. Szathmar, R. C. Williams, M. S. Schanfield, G. A. Troup, W. C. Knowler, D. N. Lawrence, K. M. Weiss & D.C. Wallace. 1992. Native american mitochondrial DNA analysis indicates that the amerind and the Nadene populations were founded by two independent migrations. *Genetics*. 130. 153-62.

- Torrioni, A., T. G. Schurr, M. F. Cabell, M. D. Brown, J. V. Neel, M. Larsen, D. G. Smith, C. M. Vullo & D.C. Wallace. 1993. Asian affinities and continental radiation of the four founding native american mtDNAs. *Am. J. Hum. Genet.* 53. 563-90.
- Torrioni, A., Y. S. Chen, O. Semino, A. S. Santachiara-Benecere, C. R. Scott, M. T. Lott, M. Winter & D.C. Wallace. 1994. Mtdna and Y-Chromosome polymorphisms in 4 native-american populations from southern Mexico. *Am. J. Hum. Biol.* 54. 303-18.
- Torrioni, A., A. Achilli, V. Macaulay, M. Richards & H.J. Bandelt. 2006. Harvesting the fruit of the human mtDNA tree. *Trends in Genetics.* 22. 339-45.
- Vogel, F. & A.G. Motulsky. 2010. *Human genetics: problems and approaches.* Springer. Berlín, Alemania.
- Vollhardt, K. & C. Peter. 2007. *Organic chemistry: structure and function.* W. H. Freeman and company. New York, USA.
- Von Chong, N. & M. Ortiz. 1982. Estudio etnográfico sobre el grupo teribe. Licenciatura (Lic). Universidad de Panamá.
- Wakeley, J. 1993. Substitution rate variation among sites in hypervariable region I of human mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* 37. 613-23.
- Wakeley, J. 1996. The excess of transitions among nucleotide substitutions: new methods of estimating transition bias underscore its significance. *TREE.* 11. 158-63.
- Wang, S., C.M. Lewis, M. Jakobsson, S. Ramachandran & N. Ray. 2007. Genetic variation and population structure in Native Americans. *Plos Gent.* 3. 1-19.
- Watterson, G. 1978. The homozygosity test of neutrality. *Genetics.* 88. 405-17.
- Wells, S. 2003. *The journey of man: A genetic odyssey.* Random House. New York, USA.
- Wells, S. 2006. *Deep ancestry: Inside the genographic project.* National geographic society. Washington, D.C., USA.
- Wilson, A.C. & I.R. Franklin. 1968. The distribution of the Diego Blood group and its relationship to climate. *Carib. J. Sci.* 8. 1-12.
- Yala, I.D.E.D.L.T.S.D.A. 2001. *Narraciones Teribes.* Fundación coordinadora de pastoral aborigen. San José, Costa Rica.
- Ye, C., Y. T. Gao, W. Wanqing, J. P. Breyer, X. O. Shu, J. R. Smith, W. Zheng & Q. Cai. 2008. Association of mitochondrial DNA displacement Loop (CA)<sub>n</sub> dinucleotide repeat polymorphism with breast cancer risk and survival among chinese women *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 17. 2117-22.

**Páginas electrónicas consultadas**

<http://www.contraloria.gob.pa> 14 -8- 2009. 12:54:14 p.m

<http://www.contraloria.gob.pa/> 3-2-2010. 01:04:34 a.m

<http://www.dnabaser.com/order/index>. 15 - 3 -2010. 05:20:17 a.m

<http://www.unesco.org/uy/phi/aguaycultura/es/paises/costa-rica/pueblo-terrabas>. - -  
2010. 12:56:20 p.m

<http://www.taxonomy.zoology.gla.ac.uk>. 20-11-2010. 03:15.36 a.m

<http://www.fluxus-engineering.com/sharenet>. 30 - 11 - 2010. 04:01:30 a.m

<http://www.google.es/intl/es/earth/index>. 5 -6-2011. 07:40:14 am

<http://www.macclade.org/download>. 7 - 7-2011. 12:03:43 p.m

<http://web.ku.edu/~hoopes/506/Chronology>. 29 - 9 - 2011. 03:27:39 a.m