

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA**

**SISTEMA DE ESTUDIO DE POSGRADO**

**VARIACION EN EL ADN MITOCONDRIAL DEL GRUPO  
AMERINDIO CUNA DE PANAMA.**

**Tesis sometida a la consideración de la Comisión  
del Programa de Estudios de Posgrado en Biología  
para optar al grado de *Magister Scientiae*.**

**ORIANA IRINA BATISTA CEBALLOS.**

**Ciudad Universitaria "Rodrigo Facio" Costa Rica  
1995.**

## **DEDICATORIA**

**A los cuna de Panamá.**

## AGRADECIMIENTOS.

La realización de este trabajo fue posible gracias a la contribución de varias personas e instituciones.

- El Servicio Alemán de Intercambio Académico (DAAD), me benefició con una beca para realizar los estudios de maestría.

- El Instituto de Investigaciones Tropicales Smithsonian (STRI), por un año y medio, me brindó apoyo económico y logístico para la realización de esta investigación.

- El Instituto Conmemorativo Gorgas donó las muestras de suero.

- La Escuela de Biología de la Universidad de Costa Rica y su personal docente y científico contribuyeron a mi formación académica.

- El Instituto Nacional de Investigaciones en Salud (INISA), me acogió durante dos meses para el aprendizaje de técnicas moleculares.

- Los Dres. Eldredge Bermingham y Connie Kolman, durante mi estadía en el STRI, condujeron en forma sistemática y metódica la parte experimental y los análisis de esta investigación, y además me dieron consejos y motivaciones constantes.

- La Dra. Francoise Guionneau-Sinclair, Dra. Lucía Jorge y Chimene Longwater colaboraron con la obtención de las muestras.

- El Dr. Shawn McCafferty, M. Sc. Lee Weight y Marivi Walker me aconsejaron en la utilización de la infraestructura del laboratorio de Biología Molecular del STRI. Además, la contribución de Shawn McCafferty en el análisis de los resultados fue valiosa.

- Los Dres. Henry Harpending y Steve Sherry brindaron su asistencia en la realización de los análisis y simulaciones de las diferencias genéticas entre pares de haplotipos.

- La M. Sc. Georgina de Alba, a través de la Oficina de Educación del STRI, contribuyó a la realización de la parte experimental de este trabajo.

- Los miembros del Comité Asesor: Dr. Ramiro Barrantes, Dra. María Zaldívar y M. Sc. María Santos me brindaron tiempo y asesoría en la revisión de este documento.

- El M. Sc. Gustavo Gutiérrez revisó la versión final de este escrito.
- Los Dres. Richard Cooke y Jorge Lobo me dieron sugerencias y consejos para la elaboración de este trabajo.
- Los Dres. Julieta Carranza y Alvaro Morales me orientaron, como directores del Sistema de Estudios de Posgrado en Biología.
- Juan A. Bernal V. me ayudó en la confección de figuras y gráficos.
- Gerardo Jiménez me orientó en el aprendizaje de técnicas moleculares en el INISA.
- Mis amigos Magnolia, Ernesto y Nimia me brindaron su apoyo incondicional.
- Mis padres y hermanos siempre me brindaron su apoyo.

A todos mi sincero agradecimiento.

## HOJA DE APROBACION.

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 al grado de *Magister Scientiae*.

Ramiro Barrantes Ph. D.  
Director de Tesis

R.B.L.

María Zaldívar Ph. D.  
Miembro del Comité Asesor

M<sup>a</sup> Eugenia Zaldívar

María Santos M. Sc.  
Miembro del Comité Asesor

M. Santos

Gustavo Gutiérrez M. Sc.  
en representación de  
Alvaro Morales Ph. D.  
Director del Programa  
de Posgrado en Biología

G. Gutiérrez

Alvaro Morales Ph. D.  
en representación de  
Yamileth González Ph. D.  
Decana del Sistema de  
Estudios de Posgrado

A. Morales

Oriana I. Batista Lic.  
Candidata

O. Batista

# INDICE

	Página
DEDICATORIA .....	ii
AGRADECIMIENTOS .....	iii
HOJA DE APROBACION .....	v
INDICE .....	vi
RESUMEN .....	viii
LISTA DE CUADROS .....	x
LISTA DE FIGURAS .....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xii
INTRODUCCION .....	13
A. Evolución de los grupos nativos americanos .....	13
A.1 Arqueología, lingüística y genética .....	14
A.2 Utilización del ADNmt en el estudio de grupos nativos americanos .....	16
B. Antecedentes de estudios genéticos en los amerindios de Panamá y Costa Rica .....	24
C. Las poblaciones cuna .....	25
D. Objetivos .....	29
MATERIAL Y METODOS .....	31
A. Las poblaciones estudiadas .....	31
B. Métodos .....	32
B.1 Recolección de las muestras .....	32
B.2 Aplicación de las técnicas de laboratorio .....	35
B.2.1 Extracción del ADN .....	35
B.2.2 Amplificación por PCR .....	36
B.2.3 Purificación, secuenciación y lectura .....	37
B.2.4 Análisis de restricción .....	38
B.3 Análisis de los resultados .....	39
B.3.1 Estimación de la variación genética .....	39
B.3.2 Relaciones filogenéticas .....	40
B.3.3 Análisis estadístico .....	41

B.3.4	Distribuciones de las diferencias genéticas entre pares de haplotipos . . .	42
B.3.5	Información utilizada en las comparaciones . . . . .	43
RESULTADOS	. . . . .	45
A.	Caracterización de la variación genética en el ADNmt de los cuna . . . . .	45
A.1	A nivel de secuencias . . . . .	45
A.2	A nivel de análisis de restricción . . . . .	49
A.3	Relaciones filogenéticas . . . . .	49
A.4	Análisis estadístico . . . . .	50
B.	Comparación de la tribu cuna con otras tribus americanas . . . . .	51
B.1	Entre tribus amerindias a nivel de análisis de restricción . . . . .	51
B.2	Comparaciones a nivel de secuencias . . . . .	52
B.2.1	Comparación de la diversidad genética . . . . .	53
B.2.2	Relaciones filogenéticas . . . . .	55
B.2.3	Análisis estadístico . . . . .	58
B.2.4	Distribuciones de las diferencias genéticas entre pares de haplotipos . . . . .	62
DISCUSION	. . . . .	65
BIBLIOGRAFIA	. . . . .	78

## RESUMEN

Se estudió la variación en el ADNmt de los amerindios cuna de Panamá mediante secuencias del segmento I de la región control y la determinación de polimorfismos de restricción fuera de ésta.

El análisis de sitios de restricción reveló que los cuna presentan genomas mitocondriales pertenecientes a dos (A y B) de los cuatro haplogrupos amerindios. Se compararon estos resultados con los descritos para otros siete grupos chibchas (ngöbé, huetar, teribe, guatuso, boruca, bribri y cabécar), y otros siete grupos amerindios, geográficamente cercanos (los maya, waunáan, emberá, macushi, yanomama, piaroa y makiritare). Con excepción de los huetar y boruca, todos los grupos chibchas presentaron genomas mitocondriales pertenecientes a sólo dos de los cuatro haplogrupos (A y B), mientras que en la mayoría de los grupos no chibchas se detectaron genomas mitocondriales pertenecientes a los cuatro haplogrupos (A, B, C y D).

A nivel de análisis de secuencias en los cuna se identificaron siete haplotipos que se ubicaron en dos grupos, A y B, caracterizados por poseer sustituciones de tipo transición y ausencia de deleciones e inserciones. La diversidad haplotípica ( $h$ ) fue 0.59 y las nucleotídicas  $\pi$  y  $E(v)$  fueron 0.0109 y 2.1, respectivamente. Estos resultados se compararon con los de otros grupos chibchas (ngöbé, huetar) y no chibchas (waunáan, emberá, nuu chah nulth y mapuche). En ese orden los valores de diversidades haplotípicas ( $h$ ) fueron 0.76, 0.71, 0.91, 0.95, 0.95 y 0.91; y sus diversidades nucleotídicas  $\pi$  y  $E(v)$  fueron 0.013(2.7), 0.011(3.1), 0.019(7.0), 0.017(5.5), 0.017(5.5) y 0.016(5.0), respectivamente. Además, se establecieron comparaciones con otras tribus chibchas (guatuso, bribri, cabécar y bugle) con base en sus diversidades haplotípica solamente. En ese

orden, los valores fueron los siguientes: 0.64, 0.73, 0.57 y 0.87, respectivamente. Se muestra que los chibchas presentan los valores de diversidad más bajos.

Las redes de mínima distancia construídas para establecer las relaciones filogenéticas entre los haplotipos de los cuna, ngöbé, huetar, nuu chah nulth, mapuche y haida permitieron la realización de un análisis cualitativo y cuantitativo (análisis de varianza molecular) que en general, demostraron la ausencia de estructura filogeográfica.

El análisis comparativo de las distribuciones de las diferencias entre pares de haplotipos para los cuna, ngöbé, huetar, nuu chah nulth, mapuche y haida indicó que los seis grupos comparten una cresta que sugiere una expansión ocurrida entre 84000-56000 años atrás. Además, los grupos chibchas presentan una segunda cresta que sugiere una expansión más reciente hace aproximadamente 10000 años.

Este estudio permitió diferenciar los grupos chibchas de los amerindios no chibchas a nivel del ADNmt. Los primeros poseen menor diversidad genética y la mayoría tienen genomas mitocondriales que pertenecen a sólo dos haplogrupos, A y B, mientras que las tribus no chibchas poseen mayor diversidad genética y la mayoría presentan ADNmts de los cuatro haplogrupos A,B,C y D. Se sugiere que la baja diversidad en el ADNmt de los grupos chibchas, se debe al posible origen a partir de una pequeña población fundadora y a un aislamiento biológico y cultural de las tribus descendientes.

## LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Número de muestras recolectadas y donadas por población cuna.....	34
Cuadro 2. Subdivisiones de agrupaciones de poblaciones cuna utilizadas en el análisis AMOVA .....	42
Cuadro 3. Nucleótidos polimórficos y sitios de restricción en el ADNmt de los cuna .....	45
Cuadro 4. Número y tipos de mutaciones en el segmento I de la región control de los cuna .....	46
Cuadro 5. Valores de variación genética entre subdivisiones de agrupaciones de poblaciones cuna .....	50
Cuadro 6. Frecuencias de los cuatro haplogrupos de ADNmt en tribus chibchas y no chibchas de Centroamérica y del norte de Suramérica.....	52
Cuadro 7. Sustituciones nucleotídicas que comparten los cuna con otras tribus.....	53
Cuadro 8. Valores de diversidad haplotípica, número de haplotipos y haplogrupos en tribus amerindias chibchas y no chibchas .....	54
Cuadro 9. Valores de diversidad nucleotídica y haplotípica para las poblaciones cuna, ngöbé, huetar, nuu chah nulth y haida .....	54
Cuadro 10. Valores de variación genética intertribal para seis grupos de nativos americanos .....	61

## LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1.	Organización de los genes en la molécula de ADNmt humano .....	18
Figura 2.	Distribución geográfica de tres grupos amerindios chibchas de la parte baja de Centroamérica y ubicación de los sitios de muestreo en las poblaciones cuna .....	33
Figura 3.	Secuencia de nucleótidos en el segmento I de la región control del ADNmt .....	47
Figura 4.	Distribución de las mutaciones en el segmento I de la región control del ADNmt de los cuna .....	48
Figura 5.	Red de mínima distancia para 16 haplotipos de tres poblaciones chibchas (cuna, ngöbé y huetar) .....	57
Figura 8.	Red de mínima distancia para 59 haplotipos de cinco grupos amerindios (cuna, ngöbé, huetar, mapuche y nuu chah nulth) y un grupo na-dene (háida) .....	60
Figura 9.	Distribuciones de las diferencias entre pares de haplotipos de los cuna, ngöbé y huetar .....	63
Figura 10.	Distribuciones de las diferencias entre pares de haplotipos de los chibchas, nuu chah nulth y mapuche.....	64

## LISTA DE ABREVIATURAS

### MAYUSCULA

A	adenina
ACD	solución ácida de citrato y dextrosa
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNmt	ADN mitocondrial
ADNn	ADN nuclear
AluI	enzima de restricción de <i>Arthrobacter luteus</i>
AMOVA	análisis de varianza molecular
A.P.	antes del presente
ARN	ácido ribonucleico
ARNt	ARN de transferencia
ARNt <sup>fen.</sup>	ARN de transferencia para fenilalanina
ARNt <sup>lis.</sup>	ARN de transferencia para lisina
ARNt <sup>prol.</sup>	ARN de transferencia para prolina
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosomal
ATP	adenosin trifosfato
BSA	albúmina sérica bovina
C	citocina
C14	carbono 14
COII	subunidad segunda de la citocromo oxidasa
EDTA	ácido etilendiamino tetraacético
G	guanina
HaeIII	enzima de restricción de <i>Haemophilus aegyptius</i>
HCl	cloruro de hidrógeno
KHCO <sub>3</sub>	bicarbonato de potasio
NADH	molécula de nicotinamida adenina dinucleótido reducida
NH <sub>4</sub> Cl	cloruro de amonio
MgCl <sub>2</sub>	cloruro de magnesio
NaCl	cloruro de sodio
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
SDS	duodecil sulfato de sodio
SN	tampón NH <sub>4</sub> Cl 155 mM, KHCO <sub>3</sub> 10 mM, EDTA 0.1 mM
T	timina
TBE	tampón 0.05 M Tris borato, 0.001 M citrato de sodio, pH 8.3
TE	tampón 10 mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0
Tris	tris-hidroximetil-aminometano
U	unidades

### MINUSCULA

dNTPs	dinucleótidos trifosfato
kb	kilobases
ml	mililitro
mM	milimolar
pb	pares de bases
μM	micromolar
μl	microlitro

## INTRODUCCION.

### **A. Evolución de los grupos nativos americanos.**

De acuerdo con la evidencia más reciente los ancestros de los aborígenes americanos llegaron a nuestro continente a través del estrecho de Bering hace varios milenios de años, y sus descendientes se dispersaron en el continente hasta llegar a Suramérica. El origen, el número y el tiempo de llegada de aquellos primeros inmigrantes han constituido materia de múltiples investigaciones y controversias (Meltzer 1993, Szathmary 1993). En la actualidad existe un consenso sobre el origen asiático de los aborígenes americanos (Wallace et al. 1985, Schurr et al. 1990, Torroni et al. 1992, Wallace y Torroni 1992), pero la polémica sobre el tiempo de ingreso y el número de migraciones al continente continua (Szathmary 1993).

Los grupos aborígenes están integrados por poblaciones que han vivido adaptándose a su medio ambiente a través del tiempo. No obstante, algunas tribus han estado expuestas a factores externos (ej. conquista europea) que de una u otra forma han contribuido a modificar sus estructuras poblacionales y genéticas. Por lo tanto, la composición genética de estos grupos es el producto de interacciones entre los factores genéticos y ambientales (Summers 1987). Hay evidencia de que algunos grupos de aborígenes americanos se han extinguido (Romoli 1987, Torres de Araúz 1981) y que otros se han integrado a poblaciones de diferentes orígenes. Sin embargo, existen en la actualidad otros grupos aborígenes que se han mantenido en relativo aislamiento en diferentes partes del continente lo que ha facilitado la reconstrucción de sus historias evolutivas (Neel et al. 1977, Barrantes et al. 1990). Los aborígenes existentes exhiben una marcada diversidad lingüística y cultural. Por ejemplo, existen siete tribus con lenguajes diferenciados en el pequeño país de

Panamá (Constenla 1991) y además, abundantes registros antropológicos y arqueológicos (Cooke y Ranere 1992) que permiten la realización de estudios multidisciplinarios.

### **A.1 Arqueología, lingüística y genética.**

La primera disciplina en estudiar el tema de la colonización de América fue la arqueología. Posteriormente, también intervinieron la lingüística, la antropología física y más recientemente, la genética. Todas buscan concretar un mismo objetivo: reconstruir la historia evolutiva de los aborígenes americanos mediante el uso de métodos específicos. La arqueología basa sus estudios en la caracterización y asignación de fechas a los materiales encontrados en los sitios arqueológicos utilizando diferentes métodos (ejemplo C14). La lingüística utiliza varios métodos para reconstruir la historia evolutiva de los grupos. Uno de los más utilizados, en este sentido es el método glotocronológico (Swadesh 1955), el cual consiste en la identificación de similitudes y diferencias entre las palabras de diversas lenguas, reconstrucción de filogenias y estimación del tiempo en que ocurrió la divergencia entre ellas. La genética estudia el ADN y sus diferentes formas de expresión, el ARN y las proteínas, utilizando diversos métodos de biología molecular. La finalidad es detectar variaciones que permitan discriminar entre los grupos étnicos y reconstruir sus filogenias. El ADN es fundamental para entender los procesos evolutivos, debido a que en él se acumulan los registros históricos de cada organismo viviente. De esta manera, la historia evolutiva, aunque incompleta en muchos grupos, deja características distintivas en su material genético que han permitido la reconstrucción de filogenias, la identificación de los mecanismos responsables de los cambios genéticos y la determinación de los efectos que tienen las fuerzas evolutivas de selección natural, deriva genética y la

migración sobre tales cambios. Las tres formas de análisis tienen prácticamente el mismo sustento teórico y propósitos similares.

La información aportada por cada una de estas disciplinas ha sido insuficiente, al menos hasta el momento, para resolver las controversias sobre el tiempo y el número de migraciones al continente americano (Meltzer 1993, Szathmary 1993). La dificultad en la reconstrucción de la evolución se ha dado porque los grupos nativos han interactuado en formas múltiples con los factores ambientales, y porque los métodos utilizados en algunas disciplinas científicas tienen ventajas y desventajas con respecto a los métodos empleados en otras.

Estudios recientes, han tratado de dar un enfoque multidisciplinario que integre los resultados obtenidos en el registro fósil, en los análisis de frecuencias génicas y en la información lingüística (Greenberg et al. 1986, Cavalli-Sforza et al. 1988, Barrantes et al. 1990). Quizás así se pueda reconstruir la historia evolutiva de los grupos nativos americanos con mayor precisión.

Actualmente, los efectos provocados por estudios previos son los siguientes: en la arqueología, existen dos tendencias principalmente relacionadas con el tiempo de llegada de los ancestros de los nativos americanos. La primera sostiene que los nativos americanos descendieron de un grupo relativamente pequeño de cazadores recolectores que cruzaron el estrecho de Bering en una sola migración hace ~12,000 años (Bada et al. 1984, Nelson et al. 1986). Estos representan la cultura Clovis distribuída en forma sincrónica a lo largo del continente (Meltzer 1993). La segunda sostiene una ocupación más temprana (~20,000-30,000 años), con base en el material encontrado en los sitios arqueológicos de Monte Verde en

Chile (Dillehay y Collins 1988), Meadowcroft Rockshelter en Pennsylvania (Adovasio et al. 1983) y Boqueirao do Sitio da Pedra Furada en Brasil (Guidon y Delibrias 1986).

Una segunda hipótesis alternativa, basada en caracteres lingüísticos, dentales y en evidencias genéticas sostiene que el Nuevo Mundo fue colonizado por tres migraciones separadas desde el noreste de Asia (Greenberg et al. 1986). La migración más temprana, correspondiente a los amerindios, ocurrió alrededor de 12000 años A. P. y dio lugar a la cultura Clovis. Las otras dos migraciones correspondientes a los na-dene y eskaleut ocurrieron después. Cada una de las migraciones trajo consigo un lenguaje ancestral que finalmente originó muchos lenguajes descendientes.

## **A.2 Utilización del ADNmt en el estudio de grupos nativos americanos.**

Hace aproximadamente dos décadas, los genetistas encontraron en el ADNmt un instrumento para explorar los orígenes, tiempo de divergencia y patrones de migración de los humanos modernos (Cann et al. 1987). La molécula de ADNmt tiene forma circular y consta de 16569 pares de bases (pb), organizadas en una región codificadora y otra no codificadora (Anderson et al. 1981). La región codificadora se caracteriza porque sus 37 genes carecen de intrones y están separados por muy pocos nucleótidos entre sí. Estos genes especifican 22 ARNt, 13 ARNm y 2 ARNr (Fig.1). Entre las proteínas codificadas están siete subunidades de la deshidrogenasa NADH, tres subunidades de la citocromo oxidasa, dos subunidades de la ATPasa y el citocromo b (Anderson et al. 1981, Attardi 1985). Los genes de ARNt están dispersos entre los genes codificadores de proteínas y los ARNr forman un sólo grupo.

La región no codificadora o control está formada por 1122 pb y ubicada entre los genes de ARNt<sup>prol.</sup> y ARNt<sup>fen.</sup>. En esta región se encuentran el origen de replicación de la hebra H (Anderson *et al.* 1981, Stephen *et al.* 1979), el asa D ("D loop") y los orígenes de transcripción de las dos hebras (L,H). El asa D es un segmento de ADN ubicado cerca del origen de duplicación, y se forma cuando se sintetiza un corto segmento de ADN de la hebra H, la cual desplaza la hebra H parental. La región control es el área que presenta mayor tasa de evolución (Fig. 1). Esta a su vez presenta dos segmentos que son más variables que el resto de la región (Vigilant *et al.* 1989). El origen de replicación de la hebra L está ubicado en un pequeño segmento no codificante, aproximadamente a 5.7 kb del origen de duplicación de la hebra H (Anderson *et al.* 1981).

El ADNmt tiene propiedades únicas que lo han convertido en una herramienta muy útil para efectuar estudios de genética de poblaciones y evolución porque: 1) su alta tasa de evolución, cinco a diez veces más alta que la del ADNn (Brown *et al.* 1979), permite comparar grupos humanos que tienen relativamente poco tiempo de separación y 2) la forma de herencia por vía materna (Giles *et al.* 1980) y su aparente haploidia (Raymond y Lawrence 1985), facilitan los análisis e inferencias debido a que en él no existen las ambigüedades causadas por la recombinación.

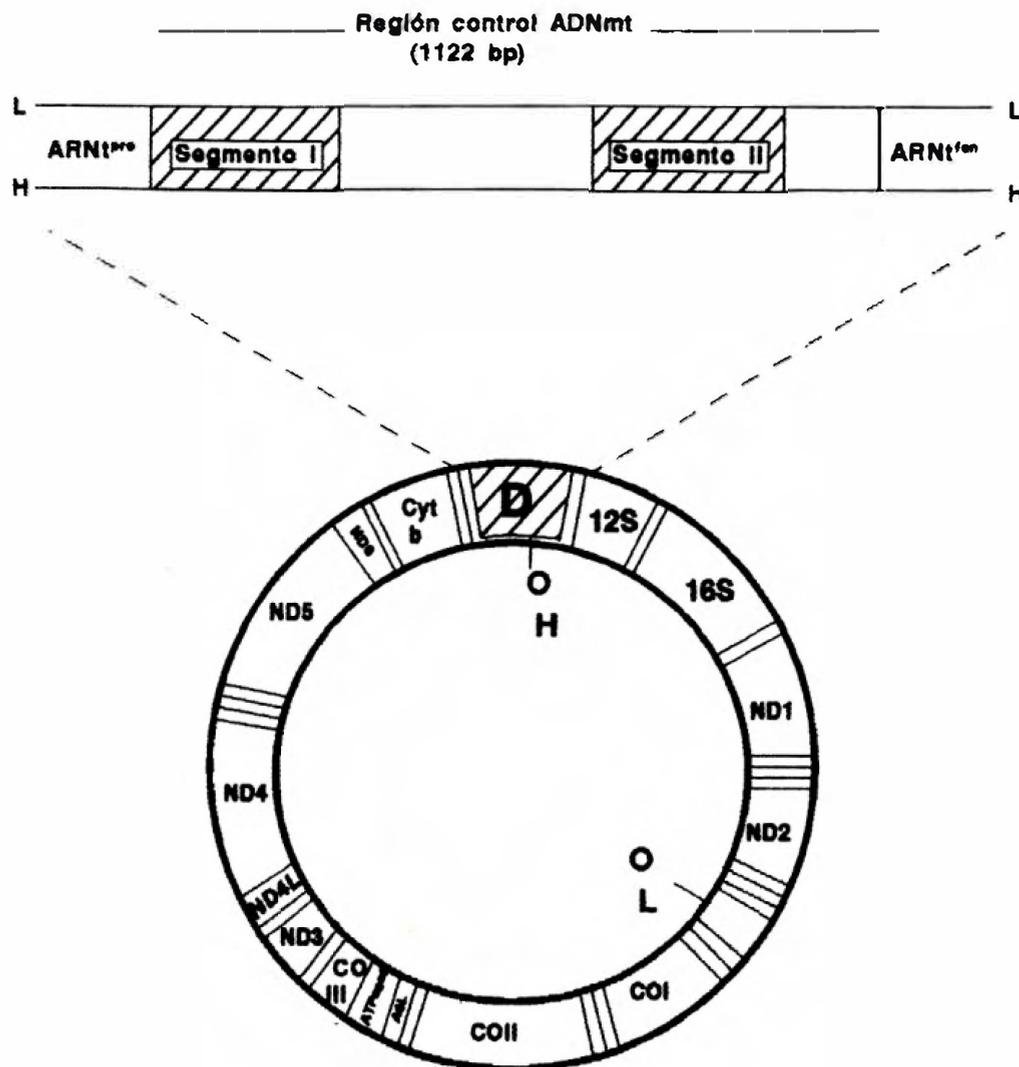


Figura 1. Organización de los genes en la molécula de ADNmt humano. Esta molécula contiene 13 genes codificadores de proteínas {tres subunidades de citocromo oxidasa (COI-III), siete subunidades de NADH deshidrogenasa (ND1-6, ND4L), dos subunidades de ATPasa (6-6L), y citocromo b (Cyt b); dos genes de ARNr (12S y 16S); y 22 ARNt ubicados entre los genes de proteínas y de ARNr}. Los orígenes de replicación de la hebra H y L están indicados en el interior del círculo. La sección aumentada representa la región control delimitada por el ARNt<sup>pro</sup> y ARNt<sup>fen</sup>, la cual muestra los dos segmentos hipervariables.

Se han propuesto varias alternativas para explicar la alta tasa de evolución del ADNmt. Una de ellas es la demostración que la polimerasa de ADNmt es aproximadamente cinco veces menos exacta en la duplicación que la polimerasa responsable de duplicar el ADN nuclear (ADNn) (Kunkel y Loeb 1981), una diferencia que puede contribuir a la tasa más alta de sustitución en el ADNmt que lo observado para el ADNn (Brown y Simpson 1982). Esta alta tasa de error en la duplicación ha sido claramente observada en un segmento de catorce pares de bases que contiene homopolímeros de A y C interrumpidos por una T en la posición 16189, al cual se le ha denominado dominio hipervariable (Horai y Hayasaka 1990), debido a que cuando ocurre la mutación de T→C en la posición 16189 el número de C y A varía (Vigilant *et al.* 1989, Horai y Hayazaka 1990, Horai *et al.* 1993). Otra proposición, es la ausencia de un mecanismo de reparación eficiente, lo que provoca una alta incidencia no sólo de transiciones, sino también de mutaciones de longitud que se acumulan (Cann y Wilson 1983). Por lo tanto, ya que la región control sólo lleva su nombre debido a que en ella se encuentran los puntos de inicio de la transcripción de la hebra H y L y el punto de inicio de la duplicación de la hebra H, esta área tiene sólo funciones reguladoras que facilitan la ocurrencia de los procesos de duplicación, transcripción y traducción. No obstante, el hecho de que en esta área se formen estructuras secundarias no es un motivo para que ocurra un alto número de mutaciones. Por ejemplo, el ADNmt de plantas evoluciona rápidamente en estructura, pero lentamente a nivel de secuencias (Gray 1989). Por consiguiente, quizás la combinación de la formación de estructuras secundarias, su exposición a agentes oxidativos y el hecho de que no codifican por ningún producto podrían ser los responsables de esta alta tasa de mutación en la región control.

Hasta la fecha, la búsqueda de caracteres diagnósticos que permitan reconstruir la historia evolutiva de los grupos nativos americanos a nivel del ADNmt, ha estado basada en procedimientos que permiten detectar los polimorfismos en los sitios de restricción, la variación en longitud de la región V y las mutaciones en la región control. Para estos estudios se utiliza como referencia la secuencia publicada por Anderson *et al.* (1981). Los genomas mitocondriales que tienen diferencias o mutaciones con respecto a la secuencia de referencia se denominan haplotipos independientemente del método utilizado para su identificación (Szathmary 1993). Los haplotipos que forman una agrupación en un árbol filogenético, porque comparten un descendiente común, forman linajes de ADNmt (Szathmary 1993). Esta terminología es común, pero el haplotipo es denominado linaje individual por algunos estudiosos de este tema, situación que confunde a los lectores (ejemplos en Szathmary 1993, p. 213). Por lo tanto, en este trabajo se denominará haplotipo al conjunto de mutaciones asociadas en los ADNmts, independientemente del método utilizado para su identificación.

Para detectar los polimorfismos de restricción se ha utilizado la técnica de análisis de restricción. Esta técnica es útil debido a que el ADN de algunos individuos varía en las secuencias de los sitios que reconocen las enzimas de restricción. De esta forma se originan fragmentos llamados "de restricción" de longitudes diferentes, los cuales reflejan las variaciones existentes entre los individuos y por lo tanto, son informativos al comparar las diferencias genéticas entre las poblaciones. Haciendo uso de este enfoque Wallace *et al.* (1985) y Schurr *et al.* (1990) estudiaron las diferencias presentes en grupos nativos de Norte, Centro y Suramérica y documentaron que éstos exhiben altas frecuencias de algunas variantes raras encontradas en Asia, y que los ancestros de los nativos americanos pasaron por cuellos de

botella. Posteriormente, Torroni et al. (1992) estudiaron grupos amerindios y na-dene, y sugirieron que éstos fueron fundados por dos migraciones distintas que se expandieron en América en tiempos diferentes. De acuerdo con ellos, la primera migración acarreó solamente genomas mitocondriales asiáticos que subsecuentemente evolucionaron en cuatro haplogrupos específicos de amerindios A, B, C y D. La segunda migración dio lugar a los na-dene y sólo acarreó ADNmts de los haplogrupos A y B. No obstante, en estudios posteriores se propuso que los na-dene acarrearán sólo ADNmts pertenecientes al haplogrupo A (Torroni et al. 1993a,b). Un estudio muy reciente confirmó la existencia de los cuatro haplogrupos de ADNmt específicos de los amerindios, pero también encontraron evidencia para proponer otros haplotipos fundadores (Bailliet et al. 1994).

Otro de los caracteres estudiados, la región V, está ubicada entre los genes que codifican la citocromo oxidasa II y el ARN<sub>t</sub><sup>1is</sup>. Esta delección se ha identificado principalmente en poblaciones asiáticas (Wrischnik et al. 1987, Horai y Matsunaga 1986), en poblaciones derivadas del este de Asia (Herzberg et al. 1989) y en poblaciones cuyos ancestros habitaron el este de Asia, como sería el caso de los amerindios. La presencia de la delección de 9 pb en el Nuevo Mundo se utiliza como un carácter diagnóstico para distinguir uno de los cuatro linajes fundadores propuesto por Torroni et al. 1992 y Wallace y Torroni 1992. La ausencia de la delección entre los dogrib (na-dene), se cita como evidencia para sugerir que los ancestros de los amerindios y na-dene llegaron en migraciones separadas (Torroni et al. 1993b). Sin embargo, la alta frecuencia de la delección en los na-dene Navajo se explica como producto de mezcla racial con grupos amerindios (Torroni et al. 1992). En los amerindios la delección ha sido observada en Norteamérica (Schurr et al. 1990, Ward et al. 1991, Torroni et al. 1992); en

Centroamérica (Torrioni *et al.* 1993a, Santos *et al.* 1994, Kolman *et al.* en prensa) y en Suramérica (Horai *et al.* 1993).

Para determinar las mutaciones en la región control del ADNmt se utiliza la técnica de secuenciación, la cual consiste en la determinación de la disposición de los nucleótidos en un segmento particular de ADN. Se ha estudiado la región control porque es la región más polimórfica del genoma mitocondrial humano (Vigilant *et al.* 1989, Aquadro y Greenberg 1983, Cann *et al.* 1984, Horai y Hayasaka 1990, Stoneking *et al.* 1991). La mayoría de la variación de esta región está concentrada en dos segmentos hipervariables (Vigilant *et al.* 1989) [Fig.1]. A la fecha hay mayor cantidad de estudios realizados en el segmento I de la región control debido a que se encontró un número mayor de polimorfismos en ciertas poblaciones (Vigilant *et al.* 1989, Rienzo y Wilson 1991). No obstante, en estudios recientes se ha encontrado niveles equivalentes de polimorfismo en ambos segmentos (Kolman *et al.* en prensa) y mayor polimorfismo en el segmento II (Santos *et al.* 1994). Los estudios realizados a nivel de secuencias del segmento I de la región control de los nuu chah nulth de Norteamérica (Ward *et al.* 1991), de grupos amerindios de Norte, Centro y Suramérica (Horai *et al.* 1993), de los huetar (Santos *et al.* 1994) y ngöbé de Centroamérica (Kolman *et al.* en prensa) y de los mapuches de Suramérica (Ginther *et al.* 1993) han demostrado la existencia de mutaciones específicas que definen cuatro haplogrupos, que han sido útiles en la caracterización de las tribus étnicas y se ha demostrado su correspondencia con los cuatro haplogrupos de análisis de restricción determinados por Wallace y Torrioni (1992). No obstante, estos estudios también han servido para proponer hipótesis diferentes sobre el número de migraciones y tiempo de llegada de los inmigrantes a América. Los trabajos de Ward *et al.* 1991 y Horai *et al.* 1993, sugieren que una considerable diversidad mitocondrial

fue introducida durante el tiempo de la colonización inicial y, por lo tanto, no apoyan la hipótesis de que la formación de los grupos étnicos amerindios estuvo necesariamente acompañada de un severo cuello de botella genético. Además, Horai et al. (1993), proponen que probablemente ocurrieron cuatro ondas de migraciones hacia el Nuevo Mundo hace 14000 a 21000 años atrás y que algunas de las cuatro poblaciones migratorias pudo haber experimentado algún grado de cuello de botella genético.

#### **B. Antecedentes de estudios genéticos en los amerindios de Panamá y Costa Rica.**

La mayoría de los grupos de Panamá y Costa Rica son representantes del phylum lingüístico chibcha-paya (Constenla 1991). En Costa Rica los chibchas están representados por las tribus bribri, cabécar, guatuso, huetar (guetar) y brunca (boruca), mientras que en Panamá están los guaymí (movere, ngöbé), bugle (bokotá, guaymí sabanero), tiribí (teribe) y cuna (tule). Según evidencia arqueológica y genética la existencia de los grupos chibchas de Panamá y Costa Rica data de al menos 10000 años atrás (Cooke y Ranere 1992, Barrantes et al. 1990). La estructura del istmo centroamericano ha conducido a la hipótesis de que en él han ocurrido cuellos de botella y mezclas con grupos que migraban hacia Norte y Suramérica.

Las investigaciones a nivel genético, en las poblaciones amerindias de Panamá y Costa Rica, fueron muy escasas hasta finales de la década del 70 (Barrantes 1993). Los primeros trabajos consistieron en el estudio de la variación a nivel de grupos sanguíneos y proteínas del suero para caracterizar algunos grupos chibchas (boruca, bribri, cabécar) (Matson y Swanson 1965a). Posteriormente, se incluyeron los grupos chocó de Panamá (Matson y Swanson 1965b, Matson et al. 1965).

Otros investigadores estudiaron a los guaymí de Panamá (Tanis *et al.* 1977, Spielman *et al.* 1979) y Costa Rica incluyendo además proteínas eritrocitarias (Barrantes *et al.* 1982). En los resultados de estos estudios se identificaron varias características genéticas que permiten distinguir las poblaciones chibchas de Baja Centroamérica de los grupos de Mesoamérica y del norte de Suramérica. Estas son: ausencia del Di\*A en la mayoría de los grupos, altas frecuencias de TF\*D-CHI y 6PGD\*C, así como frecuencias polimórficas de cinco variantes restringidas a la región, TPI\*2-BRI, TF\*D-GUA, ACP\*GUA1, LDHB\*GUA1, PEPA\*2-KUNA (Barrantes *et al.* 1990). Estos resultados apoyaron la hipótesis de que las tribus de esta región se originaron a partir de una pequeña población fundadora y que han tenido un desarrollo *in situ*, durante un largo período, semejante a lo propuesto por Neel (1977) para tribus de Suramérica.

Trabajos recientes sobre variación genética a nivel del ADNmt, mediante el uso de las técnicas de secuenciación y análisis de restricción, demostraron la existencia de una baja diversidad genética en los grupos chibchas, huetar de Costa Rica (Santos *et al.* 1994), los ngöbé de Panamá (Kolman *et al.* en prensa), bribri, cabécar, teribe, guatuso (Torrioni *et al.* 1994, Barrantes no publicado). En general, estas tribus se caracterizan por tener un número menor de haplotipos, menor diversidad genética con respecto a lo documentado para los grupos chocó de Panamá (Kolman y Bermingham no publicado) y una delección de 6 pares de bases, asociada al haplogrupo A, en el segmento II de la región control del ADNmt (Santos *et al.* 1994).

### **C. Las poblaciones cuna.**

Actualmente, el origen de los cuna no es muy claro. Algunos estudiosos del tema proponen que se originaron de los cueva, una de las tribus encontrada por los españoles en la

costa del pacífico de Panamá. Así, por ejemplo, los cueva aparecen como afines a los cuna en clasificaciones como las de Greenberg (1987). Según Constenla (1991) la aceptación despreocupada de esta clasificación no se justifica y más bien considera que los cuevas pudieron ser en parte chocó. Otros proponen que los cuna inmigraron desde la región del chocó ubicada en el norte de Colombia y ocuparon el territorio dejado por los cueva (Howe 1986). Romoli (1987), quien apoya esta última hipótesis sostiene que la evidencia histórica muestra que las tribus de habla cueva desaparecieron antes de mediados del siglo XVI, y que los cuna llegaron al Tuíra desde Colombia setenta años después de la extinción de los cueva. Además, aduce que la escasez de datos lingüísticos no permite establecer una relación firme entre los cueva y los cuna. También se ha propuesto que los cuna podrían representar un conjunto de tribus amerindias, diezmadas durante la conquista española, y no una tribu diferente (Stier 1979). Howe (1978) sugiere que estos grupos remanentes estuvieron ubicados en un área de contacto entre Colombia y Panamá, la cual fue habitada por los grupos de lenguaje chocó en el tiempo de la conquista, lo que conduce a la posibilidad de que los cuna tienen un origen chocó o se han mezclado con ellos. Por otro lado, los resultados de marcadores proteicos (Barrantes 1993), también apoyan de cierta manera, la hipótesis de que los cuna provienen de Suramérica. Pero, gran parte del análisis se basó en la frecuencia e influencia del antígeno Di-a.

A finales del siglo XVI existían cuna en Panamá, pero fue hasta el siglo XVII cuando un grupo de misioneros confirmaron la presencia definitiva de éstos en el área (Torres de Araúz 1981). La presión de los poblados españoles y la inmigración de los indios chocó en el sur del Darién junto con las epidemias entre los colombianos y los cuna del sur, aisló una mayoría de la población cuna sobre la costa

costa del pacífico de Panamá. Así, por ejemplo, los cueva aparecen como afines a los cuna en clasificaciones como las de Greenberg (1987). Según Constenla (1991) la aceptación despreocupada de esta clasificación no se justifica y más bien considera que los cuevas pudieron ser en parte chocó. Otros proponen que los cuna inmigraron desde la región del chocó ubicada en el norte de Colombia y ocuparon el territorio dejado por los cueva (Howe 1986). Romoli (1987), quien apoya esta última hipótesis sostiene que la evidencia histórica muestra que las tribus de habla cueva desaparecieron antes de mediados del siglo XVI, y que los cuna llegaron al Tuira desde Colombia setenta años después de la extinción de los cueva. Además, aduce que la escasez de datos lingüísticos no permite establecer una relación firme entre los cueva y los cuna. También se ha propuesto que los cuna podrían representar un conjunto de tribus amerindias, diezmadas durante la conquista española, y no una tribu diferente (Stier 1979). Howe (1978) sugiere que estos grupos remanentes estuvieron ubicados en un área de contacto entre Colombia y Panamá, la cual fue habitada por los grupos de lenguaje chocó en el tiempo de la conquista, lo que conduce a la posibilidad de que los cuna tienen un origen chocó o se han mezclado con ellos. Por otro lado, los resultados de marcadores proteicos (Barrantes 1993), también apoyan de cierta manera, la hipótesis de que los cuna provienen de Suramérica. Pero, gran parte del análisis se basó en la frecuencia e influencia del antígeno Di-a.

A finales del siglo XVI existían cuna en Panamá, pero fue hasta el siglo XVII cuando un grupo de misioneros confirmaron la presencia definitiva de éstos en el área (Torres de Araúz 1981). La presión de los poblados españoles y la inmigración de los indios chocó en el sur del Darién junto con las epidemias entre los colombianos y los cuna del sur, aisló una mayoría de la población cuna sobre la costa

norte del istmo. Los poblados, ilesos empezaron a acercarse más a la costa del Caribe y los que se encontraban dispersos se agruparon en las villas (Howe 1986).

A mediados del siglo XIX los cuna iniciaron paulatinamente la reubicación de las villas sobre las islas del archipiélago de San Blas cercanas a la costa. Los motivos para este movimiento, parecen haber sido la realización de comercio, la presión de insectos, culebras y enfermedades (Howe 1986). En su nuevo medio los cuna utilizaron las islas como dormitorios de comunidades. El agua, los cultivos de las plantas y los animales los obtuvieron del continente e incrementaron la explotación de los recursos marinos para la obtención de proteínas, como aún lo continúan haciendo. Junto con esta expansión vinieron cambios radicales en la organización social y cultural. La tierra fue tomada como propiedad privada en los primeros tiempos, las mujeres abandonaron su función prominente en la agricultura y confeccionaron aplicaciones complejas (molas) para sus vestidos y para venderlas como artesanías dentro y fuera del país (Howe 1986)

En la primera década del siglo XX, la migración avanzó bastante, varias villas se movieron y otras continuaron moviéndose de la misma manera unos pocos años después. Algunas villas nunca dejaron la costa (Howe 1986). Es así que unas ocho comunidades se ubican sobre la costa y solamente dos (Cangandi y Mandinga) están emplazadas a varios kilómetros dentro de tierra firme (Howe 1974). El tamaño de los poblados varió ampliamente, como aún sucede, desde una casa hasta comunidades grandes de varios cientos de miembros. Los estimados del tamaño de la población y el número de viviendas en las islas indican un rápido crecimiento de la población cuna. Por ejemplo, Stout 1947, señala las siguientes cifras de estimados para la población cuna de San

Blas 3000, 7000, 20100 para los años 1853, 1874, 1925, respectivamente, y documenta una cifra de 20831 para el censo de 1940. En cuanto al número de viviendas, por ejemplo, la isla de Narganá contaba con 40, 100 y 130 viviendas para los años 1853, 1873 y 1909, respectivamente (Stout 1947). Pero, estas cifras no sólo indican un crecimiento en el tamaño de la población de San Blas, sino también el incremento de la migración hacia las islas. Estas migraciones habían finalizado para el año 1925, aproximadamente (Stout 1947, Howe 1986). El censo de 1940 es un indicativo de que los cuna de San Blas hicieron un ajuste cultural exitoso a las nuevas condiciones. Este incremento se debe en parte, a las condiciones más saludables en las islas que en el continente (Stout 1947). Por otra parte, Howe (1986), ofrece cifras del tamaño de la población oficial indígena de San Blas a partir del año 1950, pero que excluyen varios miles del total real, debido a que el censo del gobierno excluye a los trabajadores emigrantes. Los tamaños de la población fueron de 17350 en 1950, 19343 en 1960, 23945 en 1970 y 27652 en 1980. El tamaño de la población no indígena de San Blas, ubicada la mayor parte en y alrededor de los límites del pueblo del Puerto de Obaldía, fue de 736 en 1970 , de 915 en 1980.

Los cuna poseían una sociedad matrilineal en la cual muchos aspectos sociales y económicos eran dirigidos por el padre de cada familia (Stout 1947, Howe 1986). Este sistema se mantiene aún, pero su control e importancia se ha reducido desde 1900. La exogamia en las islas es frecuente, aunque no es tan común como la endogamia. Existen pocas uniones conyugales entre los cuna de las islas y los de la costa. Los matrimonios con los negros no son tolerados en las islas. Aún cuando se permite la poliginia la mayoría de los hombres son monógamos (Stout 1947). Los pocos casos de poliginia están usualmente limitados a los jefes o a otros hombres prominentes. Se prohíben los matrimonios entre hermanos,

medios hermanos, hermanos de crianza, tía-sobrino, tío-sobrino. Los matrimonios entre primos cruzados y paralelos son infrecuentes, pero algunas veces son justificados por la creencia de que estos matrimonios aseguran un mejor trato para la esposa (Stout 1947).

Los primeros estudios para conocer la variación genética de los cuna fueron de carácter cuantitativo, basados en medidas antropométricas (Hrdlicka 1926). Posteriormente, se hicieron investigaciones de carácter cualitativo utilizando sistemas ya referidos de grupos sanguíneos y sistemas de proteínas y globulinas del plasma (Matson et al. 1965, Matson y Swanson 1965b). No obstante, estos estudios tuvieron ciertas limitaciones técnicas y metodológicas. En estudios ulteriores, se incluyeron sistemas de proteínas de los eritrocitos y se detectaron dos polimorfismos privados en los cuna, la ACP-GUA y la PEPA'2KUN (Barrantes 1990). La variante (ACPB'GUA1) había sido detectada en los guaymí y en los bokotá (Tanis et al. 1977). Barrantes (1993) sugiere que la presencia de polimorfismo en la ACP-GUA de estas tres tribus y su ausencia en las otras tribus podría indicar una relación más estrecha entre ellas. La PEPA'2KUN se ha encontrado también en los bribri, cabécar, guatuso, huetar y teribe. Además, Barrantes (1993), sugiere que la presencia de bajas frecuencias del Diego en los cuna puede deberse a flujo o intercambio de genes con tribus de Suramérica, ya que la mayoría de tribus chibchas carecen de este antígeno.

Los estudios de variación genética mediante marcadores proteicos serán muy útiles para compararlos con nuestros resultados. No obstante, los estudios a nivel de ADN, aunque relativamente recientes, han indicado un número mayor de polimorfismos a nivel del ADN (Nei 1987). En los cuna se han iniciado estudios de variación genética a nivel de ADN. Torroni et al. (1994) estudiaron a los cuna mediante análisis

de polimorfismos de restricción y documentaron la presencia de genomas mitocondriales característicos de uno (A) de los cuatro haplogrupos amerindios. No obstante, esa investigación tuvo ciertas limitaciones metodológicas. Por ejemplo, las muestras procedían de una sola isla (Río Azúcar) y sólo fue utilizada la técnica de análisis de polimorfismos de restricción, la cual provee menor resolución que la técnica de secuenciación. Por tal razón en el presente estudio se incluyeron individuos que representaran la distribución geográfica actual de los cuna y se utilizaron dos técnicas, análisis de restricción y secuenciación.

Esta investigación se realizó de acuerdo con los siguientes objetivos:

#### D. OBJETIVOS.

##### Generales:

1- Analizar la variación genética del ADNmt de las poblaciones cuna, a partir de la información obtenida mediante las técnicas de análisis de restricción y secuenciación.

2- Comparar la variabilidad genética del ADNmt del grupo cuna con la de otros grupos amerindios, dentro y fuera de la región de Costa Rica y Panamá, mediante haplogrupos definidos por análisis de restricción y secuenciación, medidas de diversidad genética, análisis de varianza molecular y distribuciones de las diferencias entre pares de haplotipos del segmento I de la región control.

**Específicos:**

- 1- Caracterizar y estimar el grado de variación genética del segmento I de la región control del ADNmt del grupo cuna, mediante medidas de diversidad haplotípica,  $h$ , y nucleotídicas,  $\pi$  y  $E(v)$ .
- 2- Comparar los grupos chibchas de Panamá y Costa Rica ngöbé, teribe, cuna, huetar, guatuso, bribri, cabécar y boruca con las tribus waunáan y emberá de Panamá; los maya del norte Centroamérica; los makiritare, piaroa, macushi y yanomamama del norte de Suramérica a nivel de haplogrupos de ADNmt determinados mediante análisis de restricción.
- 3- Comparar el grado de variabilidad genética de la región control del ADNmt del grupo cuna con el de los ngöbé, huetar, guatuso, cabécar, bribri, bugle, waunáan, emberá, nuu chah nulth, mapuche y haida mediante medidas de diversidad haplotípica,  $h$ , y nucleotídicas,  $\pi$  y  $E(v)$ .
- 4- Explorar la posibilidad de encontrar otros marcadores genéticos en el segmento I de la región control del ADNmt de los cuna mediante la técnica de secuenciación.
- 5- Construir una red de mínima distancia "minimum spanning tree" que relacione los haplotipos del segmento I de la región control del ADNmt de los cuna, ngöbé, huetar, nuu chah nulth, mapuche y haida.
- 6- Ejecutar un análisis de variación molecular (AMOVA) para determinar el grado de variación intratribal e intertribal en estas tribus.
- 7- Calcular las distribuciones de las diferencias genéticas entre pares de haplotipos de la región control del ADNmt en los cuna, ngöbé, huetar y nuu chah nulth.

## MATERIAL Y METODOS.

### A. Las poblaciones estudiadas.

Los amerindios cuna habitan tres territorios naturales en Panamá: La Comarca de San Blas a lo largo de la Costa del Caribe, los márgenes del lago Bayano al este de Panamá y la vertiente de los ríos Tuira y Chucunaque en la provincia de Darién. La Comarca de San Blas es un vasto territorio que abarca 320000 hectáreas de bosque y 375 islas, de las cuales aproximadamente 50 están habitadas. La población cuna está formada por 47300 habitantes (censo de 1990), 67% de los cuales viven en las islas y costas de la comarca, 2,7% viven en Darién, 23.52 % viven en Panamá y 6.78% están distribuidos en otras provincias de Panamá.

Desde un punto de vista lingüístico, existe un solo lenguaje cuna, compartido por todos los cuna, independientemente del lugar donde viven (Torres de Araúz 1981). Las diferencias de una región geográfica a otra son pocas (Howe 1974, Howe 1986). Los cuna que habitan el valle del Bayano al igual que los cuna de San Blas han obtenido reserva para sus tierras, pero la existencia de una planta hidroeléctrica en el Bayano ha forzado la reubicación de ciertas villas y la migración de algunos hombres hacia la capital de Panamá (Costello 1983, Wali 1983). Los cuna que habitan la vertiente del río Chucunaque tienen un mayor contacto con los cuna de San Blas que con los del Bayano debido a su proximidad geográfica (Fig. 2). Estos tienen menor contacto con poblaciones no indígenas debido a su posición geográfica, pero carecen de una reserva oficial. Los cuna del Tuira son los que tienen menor contacto con los de San Blas (Howe 1974).

Con la excepción de los cuna del Tuira, los cuna han tenido un mínimo grado de mezcla racial con grupos no

indígenas a pesar del largo período de contacto con varios grupos negros y blancos (Stout 1947). Este bajo grado de mezcla racial se corroboró mediante la utilización de seis marcadores de origen caucásico y cinco de negros. El grado máximo estimado de mezcla racial potencial fue de 0.039 y el mínimo  $>0.01$  (Barrantes 1993). Por otra parte, existe una población minoritaria de pocos miles de cuna en varias comunidades del chocó, en Colombia. Ellos han sido sometidos a presiones de aculturación que no se dieron en Panamá (Howe 1974).

## **B. METODOS**

La parte experimental de esta investigación se realizó en el laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones Tropicales Smithsonian ubicado en la isla de Naos, en Panamá, y consistió de tres partes principalmente: la recolección de muestras, la aplicación de técnicas de laboratorio y el análisis de los resultados.

### **B.1. Recolección de muestras.**

Un total de 53 muestras se recolectaron (45 de sangre y 8 de cabello) de individuos procedentes de los márgenes del lago Bayano en la provincia de Panamá, de la vertiente del río Chucunaque en la provincia de Darién y de 14 islas del archipiélago de San Blas (Cuadro 1, Fig. 2). La primera etapa de recolección consistió en la obtención de 26 muestras procedentes de 15 poblados cuna ubicados en San Blas, Darién



Figura 2. Distribución geográfica de tres grupos amerindios chibchas de la parte baja de Centroamérica (parte inferior izquierda) y ubicación de los sitios de muestreo en las poblaciones cuna (parte superior derecha). Los sitios de recolección con su respectivo número de muestras están representados con letras. Las letras A-N representan las islas de la Comarca de San Blas, la letra O poblaciones de los márgenes del lago Bayano en la provincia de Panamá y las letras P y Q representan poblaciones de la vertiente del río Chucunaque en la provincia de Darién.

y Bayano. Una segunda etapa de recolección consistió en la obtención de 27 muestras procedentes de cinco islas del archipiélago de San Blas. En general, con excepción de la isla de Tupile, el número de muestra por cada poblado fue bajo, disminuyéndose así la posibilidad de obtener individuos emparentados. Además de las dos etapas de recolección mencionadas, el laboratorio Conmemorativo Gorgas donó 10 muestras de suero procedentes de los márgenes del lago Bayano. Estas muestras se recolectaron entre octubre de 1983 y enero de 1985. Extensiva información biográfica fue recolectada por cada individuo, cuando fue posible. El tamaño de la muestra por etapa y sus respectivos lugares de procedencia aparecen en el cuadro 1.

Cuadro 1. Número de muestras recolectadas y donadas por población cuna.

Lugar de procedencia	etapas de recolección		Inst. Gorgas
	1.	2.	
<b>Islas de San Blas</b>			
A. Cartí-Tupile	1	0	0
B. Cartí-Suitupo	2	0	0
C. Río Sidra	1	0	0
D. Río Azúcar	1	0	0
E. Narganá	1	0	0
F. Isla Tigre	0	1	0
G. Playón Chico	1	0	0
H. Tupile	1	23	0
I. Ailigandí	8	1	0
J. Achutupu	0	1	0
K. Mamitupu	1	0	0
L. Ustupu	3	1	0
M. Mulatupo Sasardí	1	0	0
N. Coetupo	1	0	0
<b>Provincia de Panamá</b>			
O. Lago Bayano	2	0	10
<b>Provincia de Darién</b>			
P. Nurra	1	0	0
Q. Ualá	1	0	0
<b>Total</b>	<b>26</b>	<b>27</b>	<b>10</b>

## B.2 Aplicación de las técnicas de laboratorio.

### B.2.1. Extracción del ADN.

La extracción del ADN se realizó utilizando el procedimiento de Ward y Jorge, no publicado. De 10 a 20 ml de sangre contenidos en tubos de sistema "Vacutainer" (Becton Dickison) con 1.5 ml de la solución anticoagulante ACD se centrifugaron y se separaron los glóbulos rojos y el plasma. Los residuos de glóbulos rojos se lisaron con una solución tampón (SN) de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  155 mM,  $\text{KHCO}_3$  10mM y EDTA 0.1 mM, con el propósito de extraer mayor cantidad de leucocitos y ADN, y prevenir la extracción de eritrocitos. Los leucocitos se separaron por centrifugación y se resuspendieron en una solución tampón de NaCl 75mM y EDTA 25mM, a la cual se le añadió proteinasa K y SDS. La mezcla se incubó a 37°C durante toda la noche y al día siguiente se le agregó 1.4 ml de una solución saturada de NaCl, se agitó cuidadosamente y se centrifugó. El sobrenadante se vertió en un tubo cónico de 30 ml, se le adicionó etanol absoluto y se mezcló lentamente hasta visualizar el ADN en forma de fibras blancas. El ADN se capturó con pipetas Pasteur, se lavó con etanol al 70%, se dejó secar a temperatura ambiente y finalmente, se resuspendió en una solución tampón (TE) de tris 10mM-pH 8.0, EDTA 0.1 mM.

El ADN fue aislado de muestras de cabello mediante la incubación de las raíces de cabello en una solución tampón (proteínasa K\SDS) a 58°C durante toda la noche. Posteriormente, se hicieron cuatro extracciones orgánicas, una de fenol, dos de fenol\cloroformo y una de cloroformo. Además, la capa acuosa fue purificada utilizando filtros Centricon 100. La extracción del ADN a partir de muestras de suero consistió en la incubación de 100  $\mu\text{l}$  de suero con un volumen similar de buffer de extracción 2x (1x=10mM Tris-HCl, pH 8.0, 2mM EDTA, 10mM NaCl, 1% SDS, 8mg/ml DTT y 0.4 mg/ml proteinasa K) a 55°C durante toda la noche. Seguidamente, se

hicieron las extracciones orgánicas y la purificación mediante filtración en Centricon-100.

### B.2.2. Amplificación por PCR.

La PCR es un método *in vitro* de síntesis de ácido nucleico, por el cual un segmento particular del ADN puede ser duplicado. Esto involucra la utilización de dos oligonucleótidos que flanquean el segmento de ADN que se quiere amplificar; y ciclos repetidos de desnaturalización del ADN, hibridación de los oligonucleótidos a sus secuencias complementarias, y extensión de los oligonucleótidos hibridizados mediante la ADN polimerasa (Mullis y Faloona 1987, Mullis et al. 1986, Saiki 1990). Este es un método fácil de realizar y requiere de muy poco tiempo para obtener grandes cantidades de ADN.

Un fragmento de 350 pb del segmento 1 de la región control del ADNmt (Vigilant et al. 1989), se amplificó utilizando concentraciones iguales de los siguientes oligonucleótidos: L15997 y H16498 (Ward et al. 1991).

El ADN de una sola hebra se obtuvo digiriendo una de las hebras del ADN, que contiene un grupo fosfato en posición 5', con la enzima *lambda* exonucleasa (Gibco BRL) (Higuchi y Ochman 1989). Se efectuaron dos tipos de reacciones de PCR cada una de las cuales contenía un oligonucleótido fosforilado en posición 5'. Cada reacción se llevó a cabo en presencia de 0.75 unidades de *Thermus aquaticus* ADN polimerasa, 0.4  $\mu$ M de cada oligonucleótido, 67 mM de tris-HCl (pH 8.8), 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.25mM de una mezcla de los cuatro deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) y 0.250  $\mu$ g/ml de BSA. Las reacciones se efectuaron en un termociclador (Perkín Elmer-Cetus, modelo 460) por un período de 28 ciclos. Las

condiciones fueron las siguientes: desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, hibridación a 57 °C por 45 segundos y extensión a 72 °C por 45 segundos.

Del producto amplificado 3 µl se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio en una solución tampón de 0.05M Tris-borato y 0.001M Na<sub>2</sub>EDTA, pH 8.3 (TBE) a 85 voltios. Se visualizaron las bandas por exposición a luz ultravioleta y se confirmaron los tamaños y concentraciones relativas de los productos mediante la comparación con un marcador de peso molecular (ØX174/HaeIII). El producto de PCR fue digerido con 0.15µl de lambda exonucleasa en un volumen final de 30µl a 37 °C por 30 minutos, a fin de generar ADN de una sola hebra.

### B.2.3. Purificación, secuenciación y lectura.

Los productos de la digestión se purificaron utilizando microconcentradores Centricon-30 (Amicon Inc.).

El fragmento de 360 pb (16024-16383) del segmento 1 de la región control de los 63 cuna se secuenció utilizando 7 µl del producto purificado. Los oligonucleótidos H16401 (Ward et al. 1991) y H16226 (5' GCAGTGGATGGTGTATAGTT 3') fueron utilizados para secuenciar la hebra pesada y los oligonucleótidos L15997 (Ward et al. 1991), L16191 (5'TCCACATCAAACCCCCTCC 3') y 16106 (5'GCCAGCCACCATGAATATTG 3') fueron utilizados para secuenciar la hebra ligera de cada muestra. El número en la designación del oligonucleótido identifica el extremo 3' de acuerdo a la secuencia de referencia, mientras que la H y la L designan la hebra pesada (Heavy) y ligera (Light), respectivamente. Se utilizó el sistema de secuenciación Sequenase (United States Biochemical) versión 2.0.

Los productos de secuenciación se incubaron a 85°C durante 5 minutos y se separaron por electroforesis utilizando geles de poliacrilamida al 6% con urea 7M. El gel fue secado y expuesto a una película fotográfica (Kodak X-OMAT) durante un período de 24-72 horas. Finalmente, la película se reveló utilizando un procesador automático (Kodak RP X-OMAT Processor, modelo M7B). Las secuencias obtenidas para cada individuo fueron leídas mediante la lectura directa de la autorradiografía expuesta a una cámara de luz. Cada lectura de la secuencia individual se alineó y se comparó con la secuencia de referencia (Anderson et al. 1981), mediante el programa "Mac Vector", asegurándose de que todas las sustituciones fueran detectadas sin ambigüedad en ambas hebras.

Debido a que la mutación de T→C en la posición 16189 causa "tartamudeo" de la polimerasa en las 18 secuencias que portaban dicha mutación, se utilizó un oligonucleótido interno "corriente abajo", el cual permitió leer las secuencias en la hebra ligera entre las posiciones 16230 y 16400.

#### **B.2.4. Análisis de restricción.**

Se realizó un análisis de cuatro sitios de restricción en los individuos que fueron secuenciados, a fin de determinar su presencia y frecuencia. Estos sitios caracterizan, en forma general, cuatro haplogrupos de ADNmt (Torrioni et al. 1992). Se amplificaron cuatro segmentos del genoma mitocondrial para determinar la presencia del sitio Hae III 663 (haplogrupo A); de la delección intergénica de 9 pares de bases, COII/tRNA<sub>Lys</sub> (haplogrupo B); del sitio Alu I 13262 (haplogrupo C) y la ausencia del sitio AluI 5176 (haplogrupo D). Los oligonucleótidos utilizados en la

amplificación de los segmentos anteriores fueron los siguientes: L577: H743 (Kolman et al. en prensa), L13232: H13393, L08215: H08297 (Ward et al. 1991) y L05099 (5'-CCTAACTACTACCGCATTCTAC-3'):05333 (CCTCGATAATGGCCCATTTGGGC-3'), respectivamente. Del producto de amplificación se digirieron 10  $\mu$ l con 10 unidades de la endonucleasa correspondiente en presencia de 2  $\mu$ l del tampón apropiado. Las reacciones se efectuaron en un volumen final de 20  $\mu$ l durante toda la noche a 37 °C y la totalidad se separó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 15% en una solución tampón de TBE corridos a 200 voltios por un período de 4 a 5 horas. El gel se tiñó con bromuro de etidio (1mg/ml) durante 30 minutos y se determinaron los respectivos patrones de bandas mediante la exposición a luz ultravioleta y se compararon con el marcador de peso molecular (ØX174/HaeIII).

### B.3. Análisis de los resultados.

#### B.3.1 Estimación de la variación genética.

La variación genética del primer segmento de la región control del ADNmt (16024-16383) de los cuna se determinó mediante dos tipos de medidas: La diversidad haplotípica ( $h$ ) de Nei y Roychodhury (1974) y dos medidas de diversidad nucleotídica  $\pi$  (Nei y Tajima, 1981), y  $S(w)$  (Watterson 1975).

La diversidad haplotípica ( $h$ ) es la probabilidad de que dos alelos escogidos al azar sean diferentes y se estima de acuerdo con la siguiente fórmula:

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

donde:

$x_i$  = frecuencia del haplotipo  $i$  en la muestra.

$n$  = número de individuos en la muestra.

La diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) es el número promedio de diferencias nucleotídicas por sitio entre dos secuencias escogidas al azar. Esta es una medida más apropiada de polimorfismo para secuencias de ADN y se estima utilizando la siguiente fórmula:

$$\pi = \sum x_i x_j \pi_{ij} \quad n-1/n$$

donde:

$n$  = número de haplotipos.

$x_i$  y  $x_j$  = frecuencias de los haplotipos  
ith y jth, respectivamente.

$\pi_{ij}$  = proporción de nucleótidos diferentes entre  
los haplotipos ith y jth.

También se utilizó  $E(v)$ , atendiendo a la sugerencia de Excoffier y Langaney (1989), que para especular sobre la historia evolutiva de un grupo debe utilizarse una medida similar a  $E(v)$ , la cual es independiente de la frecuencia de haplotipos, y mide la variabilidad desde muchas generaciones anteriores. Por el contrario,  $\pi$  sólo mide la variación de las generaciones actuales. Para calcular  $E(v)$  se utiliza la siguiente fórmula:

$$E(v) = K/0.577 + \log_e(n-1) \quad \text{para } n > 20$$

donde:

$K$  = número de sitios polimorficos

$n$  = tamaño de muestra

### B.3.2 Relaciones filogenéticas.

Los haplotipos del segmento I de la región control del ADNmt se relacionaron mediante una red de distancia mínima o "minimum spanning tree" (Excoffier et al. 1992). La unión de los haplotipos en esta red es posible porque en algunas posiciones han ocurrido sustituciones filogeneticamente

informativas, es decir variaciones nucleotídicas que son compartidas por dos o más haplotipos (Aquadro y Greenberg 1983). La distribución de estos nucleótidos provee la información para el orden de ramificación en la red filogenética. La red fue construida a mano, siguiendo las recomendaciones de Excoffier et al. (1992). La construcción de la red se inició con el haplotipo que tiene los sitios filogenéticamente informativos y sucesivamente se fueron uniendo a él los demás haplotipos mediante ramificaciones que simbolizan un número mínimo de mutaciones. Es posible la construcción de varias redes, pero el conteo de las mutaciones a lo largo de la red permitió escoger la red más parsimoniosa, es decir, aquella que requiera un número mínimo de mutaciones para explicar las relaciones evolutivas entre los haplotipos. La utilidad de este tipo de representación gráfica es que permite realizar análisis filogenéticos cualitativos de los patrones de agrupamiento de los haplotipos, y cuantitativos de la variación genética dentro y entre poblaciones utilizando el número de sustituciones a lo largo de la red como una medida de divergencia evolutiva entre dos haplotipos (Excoffier et al. 1992).

### B.3.3 Análisis estadístico.

La variación en la composición genética de diferentes subdivisiones de agrupaciones de poblaciones cuna se determinó mediante un análisis de varianza molecular (AMOVA) (Excoffier et al. 1992). Se hicieron varios análisis en los que se compararon dos subdivisiones, una de las cuales incluía poblaciones que contenían ADNmts pertenecientes al haplogrupo B y la otra no. Además, se hicieron comparaciones entre subdivisiones, en ambas de las cuales se introdujeron poblaciones que contenían ADNmts pertenecientes al haplogrupo B o que carecían de él. Las agrupaciones con sus respectivos

tamaños de muestras aparecen en el cuadro 2. El AMOVA fue ejecutado a partir de una matriz de distancia métrica cuadrada euclídeana, calculada a partir del número de mutaciones entre haplotipos a lo largo de la red. La prueba de significancia se hizo permutando los datos originales 1000 veces.

Cuadro 2: Subdivisiones de agrupaciones de poblaciones cuna utilizadas en el análisis AMOVA.

*Caribe (A-N); n=49	Pacífico (O,P,Q) n=14
Oeste (A-F,Ø); n= 19	*este (G-N,P,Q); n=44
●Oeste de San Blas (A-F); n=7	*este de San Blas (G-N); n=42
*San Blas y Darién (A-N,P,Q); n=51	Bayano (O) n=12
*Poblaciones con haplogrupo B (G,H,I,M); n=35	poblaciones sin haplogrupo B n=28
●Oeste de San Blas sin haplogrupo B (A-F) n=7	Bayano sin el haplogrupo B, n=12
*Oeste de San Blas con haplogrupo B	*este de San Blas con haplog. B

(\*) Subdivisiones que incluyen poblaciones que tienen la delección de 9pb.  
Las letras A-N corresponden a las islas de la Comarca de San Blas (A=Cartí-Tupile, B=Cartí-Asutupo, C=Río Sidra, D=Río Acúcar, E=Narganá, F=Tigre, G=Playón Chico, H=Tupile, I=Zalaganda, J=Chichupú, K=Hamitupu, L=Uatupo, M=Mulatupo Sasardi, N=Coetupu). La letra Ø corresponde a Bayano y las letras P y Q a Nurra y Uala, respectivamente.

#### B.3.4 Distribuciones de las diferencias genéticas entre pares de haplotipos.

Se estimaron las distribuciones de las diferencias genéticas entre haplotipos del segmento I utilizando programas provistos por H. Harpending y S. Sherry. La distribución de diferencias genéticas, "mismatch distribution", se refiere al conteo de las diferencias nucleotídicas entre pares de secuencias dentro de una población (Rogers y Harpending 1992). Los histogramas que

muestran la frecuencia relativa de pares de individuos que difieren por  $i$  sitios en una muestra (donde  $i=0,1,2,3,\dots$ ) deberían preservar un registro de las expansiones y separaciones en el pasado remoto (Rogers y Harpending 1992). En esta distribución un episodio de crecimiento genera una onda que viaja hacia la derecha, recorriendo una unidad del eje  $X$  por cada  $1/2\mu$  generaciones, donde  $\mu$  es la tasa de mutación. Los estimados de la expansión de las poblaciones se basaron en la tasa de mutación para el segmento I de la región control ( $5.4 \times 10^{-5}$  por año) determinada por Harpending et al. (1993). Esto significa que 1 unidad es igual a  $1/2\mu$ , lo que a su vez representa aproximadamente, 9300 años.

#### B.3.5 Información utilizada en las comparaciones.

En este apartado, se mencionarán los grupos que fueron utilizados en las comparaciones. No obstante, es importante resaltar que los grupos de mayor interés en este trabajo lo constituyen los de Panamá y Costa Rica. Los grupos de Norteamérica y Suramérica fueron utilizados en forma mucho más general a fin de establecer diferencias con otros grupos no chibchas a nivel de número de haplogrupos, de haplotipos y medidas de diversidad genética.

Los siete haplotipos de los cuna fueron comparados con los encontrados en otros cuatro grupos amerindios: los 28 haplotipos identificados en individuos nuu chah nulth del Pacífico noroeste (Ward et al. 1991), los 13 de los mapuche de Argentina (Ginther et al. 1993), los 7 de los ngöbé de Panamá (Kolman et al. en prensa), los 7 de los huetar de Costa Rica (Santos et al. 1994); y con los 9 de un grupo Nandene haída del Pacífico noroeste (Ward et al. 1993). Para comparar la diversidad haplotípica y nucleotídica se utilizaron 334 posiciones nucleotídicas comunes a todos los

estudios (16050-16383). Las mismas se utilizaron para los análisis AMOVA y de las distribuciones de diferencias entre pares de haplotipos. Las posiciones polimórficas 16182-16184 fueron excluidas de los análisis debido a su asociación con la mutación en posición 16189 (Horai et al. 1993). Las tribus mencionadas fueron escogidas para las comparaciones debido a que incluyen tamaños de muestras mayores que 25. Sin embargo, para hacer el análisis más robusto se comparó la diversidad haplotípica de los cuna con la de los bribri, cabécar, bugle y guatuso (Barrantes et al. no publicado), cuyos tamaños de muestra son menores que 25.

A nivel de análisis de restricción los cuna fueron comparados con tribus no chibchas de Centroamérica (los maya), con tribus de la parte norte de Suramérica (los makiritare, los piaroa y los macushi), con otros grupos chibchas de Centroamérica (los bribri, guatuso, cabécar, teribe, guaymí y cuna) y con una tribu del norte de suramérica (los yanomama) cuya filiación chibcha aún no es clara. La información para la realización de esta comparación fue obtenida de Torroni et al. (1993a, 1994).

## RESULTADOS.

## A. Caracterización de la variación en el ADNmt de los cuna.

## A.1 A nivel de secuencias.

La secuencia completa de 360 pb (16024-16383) del segmento I de la región control del ADNmt se determinó en 63 individuos cuna. Se identificaron siete haplotipos caracterizados por 10 sitios polimórficos (Cuadro 3). Los haplotipos formaron dos grupos, el A y el B, ya definidos en estudios anteriores (Ward et al. 1991, Horai et al. 1993, Ginther et al. 1993, Santos et al. 1994).

Cuadro 3. Nucleótidos polimórficos, sitios de restricción en el ADNmt de los cuna enumerados de acuerdo con Anderson et al. (1981). La identificación (ID), número y distribución geográfica de las secuencias y sitios de restricción se muestra en el lado izquierdo. Los nucleótidos polimórficos y los sitios de restricción se muestran en el centro y derecha. Para los sitios de restricción un 0 y un 1 indican la ausencia o presencia del sitio, respectivamente, mientras que para la región V, un 2 indica la presencia de las dos copias de 9pb y un 1 la delección de una de las copias. Refiérase a la figura 2 para los sitios de colección.

ID	N	Lugares de colección	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 1 1 2 2 2 2 3 3 3 3 1 8 1 2 7 9 1 1 6 6 1 9 7 3 3 0 1 9 0 2	HaeIII 663	9bp 3272/ 6289	AluI 13262	AluI 5176
			C T T C G C T G C T				
K1	38	A-F,H-L,N-Q	. . . T . T . A T C	1	2	0	1
K3	1	I	. . . T . T . A . C	1	2	0	1
K4	5	H,I,L	T . . T . T . A . C	1	2	0	1
K5	1	O	T . . T . T . A T C	1	2	0	1
K7	13	G,H,I	. C C . . . . .	0	1	0	1
K21	1	M	. C C . A . . . .	0	1	0	1
K28	4	H	. C C . . . . .	0	1	0	1

Los haplotipos de los individuos que forman el grupo A, se caracterizan por compartir las siguientes mutaciones: T en posición 16111, T en posición 16223, T en posición 16290, A en posición 16319 y una C en posición 16362; mientras que los del grupo B poseen una C en posición 16189 y una C en posición 16217.

Los tipos de mutación se describen para la hebra L. Las 10 mutaciones fueron de tipo transición, ocho ocurrieron entre pirimidinas y dos entre purinas (Cuadro 4).

Cuadro 4. Número y tipos de mutaciones en el segmento I de la región control de los cuna.

Tipos de mutación	Nº observado	Frec. relativa
<b>Sustituciones</b>		
<b>Transiciones</b>		
Pirimidinas		
T→C	4	0.40
C→T	4	0.40
Purinas		
G→A	2	0.20

La sustitución T→C que ocurre en posición 16189 es muy peculiar debido a que se da dentro de una porción de 14 pb cuya secuencia contiene 4A, 5C, 1T y 4C (Fig. 3). Aún cuando esta mutación influye en la ocurrencia de otras mutaciones debido probablemente a errores de duplicación (Horai y Hayasaka 1990, Vigilant et al. 1989) en las secuencias de los cuna no se logró distinguir mayor o menor número de bases en esta región.

La distribución de las mutaciones en la región control es mostrada en las figuras 3 y 4. La mayor parte de las mutaciones se presentaron cerca del extremo 3' de la región secuenciada.

```

21 CTGTTCTTTC ATGGGGGAGC AGATTGGGT ACCACCGAAG TATTGACTCA CCCATCAACA
41 ACCGCTATGT ATTTCTTACA TTACTGCCAG CCACCATCAA TATTGTACGG TACCATAAAT
141 ACTTGACCAC CTGTAGTACA TAAAAACCCA ATCCACATC AAAAAGCCCTCCGC ATGCTTA
      C
201 CAAGCAAGTA CAGCAATCAA CCTCAACTA TCACACATCA ACTGCAACTC CAAGCCACC
      C      T
261 CCTCACCCAC TAGGATACCA ACAAACCTAC CCACCCTTAA CAGTACATAG TACATAAAGC
      A      T      C      A
321 CATTTACCGT ACATAGCACA TTACAGTCAA ATCCCTTCTC GTCCCATGG ATGACCCCGC
      ↓      T      C
381 TCAGATAGGG GTCCCTTGAC CACCATCCTC CGTGAATCA ATATCCCGCA CAAGAGTGGT

```

Figura 3. Secuencia de nucleótidos en el segmento I de la región control del ADNmt. La secuencia documentada por Anderson et al. (1981) es mostrada en bloques de 10. Los números de la izquierda indican la posición del primer nucleótido de cada línea. Las flechas indican el punto de inicio y de terminación del segmento secuenciado en los cuna. Los nucleótidos en negro ubicados debajo de cada bloque indican las sustituciones observadas en el menos un individuo cuna y la sección de recuadro representa el dominio hipervariable.

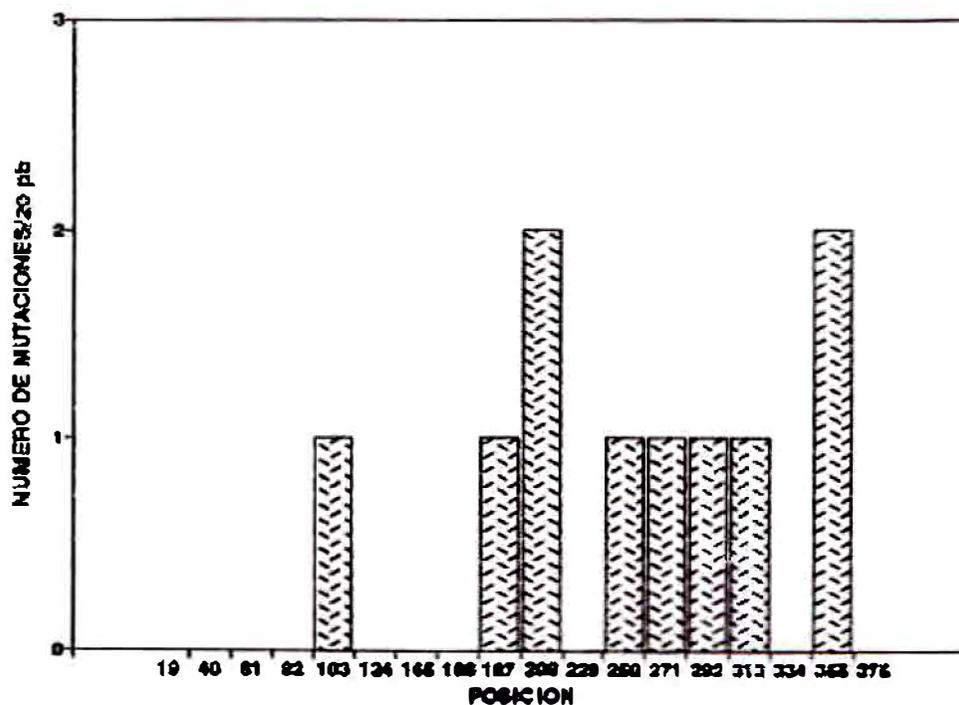


Figura 4. Distribución de las mutaciones en el segmento I de la región control del ADNmt de los cuna. El número total de mutaciones se presentan en bloques adyacentes de 20 pb no superpuestos. En el eje X se indican las posiciones a lo largo del segmento I de la región control del ADNmt. La posición 19 corresponde a la posición 16019 en la secuencia de Anderson et al. (1981).

### A.2 A nivel de análisis de restricción.

Los sitios de restricción estudiados HaeIII 663, AluI 13262 y AluI 5176 tuvieron una frecuencia de corte de 71%, 0% y 100%, respectivamente. La delección de 9pb entre los genes de la citocromo oxidasa II y el ARN<sup>t</sup> se presentó en el 71% de los individuos. La combinación de estos sitios con la presencia o ausencia de la delección de 9pb definieron dos haplotipos (Cuadro 3). El primero se caracteriza por la presencia del sitio HaeIII 663, del sitio AluI 5176 y la ausencia del sitio AluI 13262 y de la delección de 9pb. El segundo se caracteriza por la ausencia del sitio Hae III 663, del sitio AluI 13262 y la presencia de la delección de 9pb y del sitio AluI 5176. Estos dos haplogrupos coinciden con solamente dos de los cuatro propuestos por Torroni et al. (1992). El haplogrupo A fue observado en 45 (71%) individuos y el haplogrupo B en 18 (29%). Hubo una correspondencia entre los haplogrupos determinados mediante análisis de restricción y secuenciación (Cuadro 3).

### A.3 Relaciones filogenéticas.

Los haplotipos del primer segmento de la región control de la tribu cuna definieron dos grupos, los cuales corresponden al haplogrupo A y B. Los haplotipos representados en el grupo A al igual que aquellos del grupo B se conectaron entre sí mediante una única mutación, mientras que los dos haplogrupos estuvieron separados entre sí por nueve mutaciones (Fig. 6). Los individuos portadores de genomas mitocondriales del grupo B proceden en forma exclusiva de cuatro de las 14 poblaciones isleñas de San Blas (G,H,I,M) y ninguno de las poblaciones de tierra firme.

#### A.4 Análisis estadístico.

El análisis AMOVA demostró una diferencia significativa en la composición genética entre las subdivisiones de grupos de poblaciones cuna al incluir en una de éstas, poblaciones con haplotipos pertenecientes al grupo B y en la otra no. Sin embargo, el análisis no reveló resultados significativos al incluir o excluir en ambas subdivisiones poblaciones con haplotipos pertenecientes al grupo B (Cuadro 5).

Cuadro 5. Valores de variación genética entre subdivisiones de agrupaciones de poblaciones cuna. Ver la figura 2 para la ubicación de las localidades.

Combinaciones	Localidades	Variación interpoblacional (%)	(P)
Caribe* vs pacífico n=49                    n=14	A-N vs O-Q	23.56	0.0040
Oeste vs este* n=19                    n=44	A-F,O vs G-N,P,Q	30.82	0.0010
S.B.* vs Bayano n=49                    n=12	A-N vs O	22.29	0.0040
Oeste vs este de S.B.* n=07                    n=42	A-F vs G-N	27.17	0.0080
S.B.*, Darién vs Bayano n=51                    n=12	A-N,P,Q vs O	20.84	0.0110
Poblac.* vs otras n=35                    n=28	G,H,I,M vs A-F,J-L,N-Q	46.31	0.0010
Oeste* vs este* S.B. n=32                    n=17	A-H vs I-N	2.00	0.3976\$
Oeste de S.B. vs Bayano n=7                      n=12	A-F vs O	5.12	0.3636\$

(S.B.) San Blas.

(\*) poblaciones cuna con presencia de la delección de 9bp.

(\$) resultados significativos.

## B. Comparación de la tribu cuna con otras tribus americanas.

### B.1 Entre tribus amerindias a nivel de análisis de restricción.

El cuadro 6 proporciona un resumen de la comparación de los haplogrupos identificados por análisis de restricción en tribus chibchas y no chibchas de Centroamérica y de la parte norte de Suramérica. Los bribri y cabécar se colocan juntos debido al gran flujo génico que ha ocurrido entre estos dos grupos (Barrantes et al. 1990). El grupo guaymí incluye a los ngöbé, pero por tratarse de información procedente de dos artículos diferentes se ubican por separado. A diferencia de Torroni et al. 1994, quienes en una muestra de 16 cuna identificaron sólo ADNmts pertenecientes al haplogrupo A, en el presente estudio se identificaron genomas mitocondriales pertenecientes a los haplogrupos A y B.

Las tribus chibchas de Centroamérica presentan ADNmts pertenecientes a los haplogrupos A y B a excepción de los huetar y los boruca quienes, además presentan ADNmts ubicados en el haplogrupo D. Los yanomama no presentan ADNmts pertenecientes al haplogrupo A, pero sí pertenecientes a los otros tres haplogrupos (B, C y D). Al igual que los emberá y waunáan (Kolman y Bermingham, no publicado), los maya y los macushi presentan ADNmts pertenecientes a los cuatro haplogrupos. Además, los piarca y los makiritare presentan ADNmts pertenecientes a tres haplogrupos a pesar de tener tamaños de muestras pequeños en comparación con los de los chibchas de Centroamérica.

Cuadro 6. Frecuencias de los cuatro haplogrupos de ADNmt en tribus chibchas y no chibchas de Centroamérica y del norte de Suramérica.

Grupos	n	Haplogrupos (%)			
		A	B	C	D
<b>Tribus de Centroamérica</b>					
<b>No chibchas</b>					
Maya	26	53.8	23.0	15.4	7.7
<b>Chibchas</b>					
Bri-cabécar	24	54.2	45.8	0	0
Boruca	14	21.4	71.4	0	7.2
Huetar	27	70.3	3.7	0	26.0
Guatuso	20	85.0	15.0	0	0
Teribe	20	80.0	20.0	0	0
Guaymí	16	68.8	31.2	0	0
Ngöbé	45	67.4	32.6	0	0
Cuna1	16	100	0	0	0
Cuna2	63	71.4	28.6	0	0
<b>Tribus del Norte de Suramérica</b>					
Yanomama	24	0	16.7	54.2	29.1
<b>No chibchas</b>					
Piaroa	10	50	0	10.0	40.0
Makiritare	10	20	0	70.0	10.0
Macushi	10	10	20	30.0	40.0

Huetar de acuerdo con Santos et al. 1994

Cuna 2 de acuerdo con el presente estudio.

Ngöbé de acuerdo con Kelman et al. en prensa.

La información de las otras tribus chibchas de Centroamérica con base en Torroni et al. 1994

La información de la tribu naya y de las tribus de Suramérica con base en Torroni et al. 1994

## B.2 Comparaciones a nivel de secuencias.

A excepción de la transición G→A, en posición 16273, todas las mutaciones identificadas en las secuencias de los cuna han sido documentadas en otros grupos de aborígenes americanos (Cuadro 7). Como es de esperar los cuna compartieron más mutaciones con los huetar y ngöbé que con los grupos no chibchas. Las secuencias K3, K4, K5 y K7 han sido documentadas en otros grupos de amerindios como se observará posteriormente en las redes de mínima distancia, mientras que las secuencias K1, K21 y K28 no han sido documentadas.

Cuadro 7. Sustituciones nucleotídicas que comparten los cuna con otras tribus. Los números indican las posiciones de los nucleótidos de acuerdo con la secuencia de referencia de Anderson et al. 1981. En la segunda línea se muestra una secuencia consenso de las sustituciones ocurridas en el segmento I de la región control del grupo cuna. Los puntos indican similitud con las sustituciones encontradas en los cuna, la N indica ausencia de la sustitución, y otro nucleótido indica una sustitución diferente a la ocurrida en los cuna.

	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
grupo	1	1	2	2	2	2	3	3	3	3
	1	8	1	2	7	9	1	1	6	6
	1	9	7	3	3	0	1	9	0	2
Anderson	C	T	T	C	G	C	T	G	C	T
Cuna	T	C	C	T	A	T	C	A	T	C
Huetar <sup>a</sup>	.	.	.	.	N	.	N	.	.	.
Ngöbé <sup>b</sup>	.	.	.	.	N	.	N	.	.	.
Haida <sup>c</sup>	.	.	N	.	N	.	N	.	N	.
Nuu chah nulth <sup>d</sup>	.	.	.	.	N	.	N	.	N	.
Mapuche <sup>e</sup>	N	.	.	.	N	.	.	.	N	.

a: Santos et al. 1994; b: Kolman et al. en prensa; c: Ward et al. 1993; d: Ward et al. 1991; e: Ginther et al. 1993.

### B.2.1. Comparación de la diversidad genética.

Los valores de diversidad haplotípica y nucleotídica para los grupos amerindios chibchas y no chibchas se muestran en los cuadros 8 y 9. Los grupos chibchas y el grupo haida presentan los valores de diversidad más bajos. Mientras que los grupos no chibchas presentan los valores de diversidad más altos.

Cuadro 8. Valores de diversidad haplotípica, número de haplotipos y haplogrupos en tribus amerindias chibchas y no chibchas.

Grupo	Tamaño (n)	haplogrupo presente	número de haplotipos	diversidad haplotípica (h)
<b>CHIBCHAS</b>				
Cuna	63	A,B	07	0.59
Ngöbé	46	A,B	07	0.76
Huetar	27	A,B,D	07	0.71
Guatus	08	A	04	0.64
Cabécar	08	A	02	0.57
Eribri	20	A,B	06	0.73
Bugle	14	A	08	0.87
<b>NO CHIBCHAS</b>				
Emberá	46	A,B,C,D	>10	0.95
Waunáan	32	A,B,C,D	>10	0.91
Nuu chah nulth	63	A,B,C,D	28	0.95
Mapuche	38	A,B,C,D	18	0.91

Cuadro 9. Valores de diversidad nucleotídica y haplotípica para las poblaciones cuna, ngöbé, huetar, nuu chah nulth y haida.

Grupo	Diversidad haplotípica h	Diversidad nucleotídica $\pi$	E(v)
<b>Amerindios</b>			
<b>Chibchas</b>			
Cuna	0.59	0.011	2.1
Ngöbé	0.76	0.013	2.7
Huetar	0.71	0.011	3.1
<b>No chibchas</b>			
Emberá	0.95	0.017	5.5
Waunáan	0.91	0.019	7.0
Nuu-Chah-Nulth	0.95	0.017	5.5
Mapuche	0.91	0.016	5.0
<b>Na-dene</b>			
Haida	0.69	0.007	3.8

h de acuerdo con Nei y Roychodhury 1974.

$\pi$  de acuerdo con Nei y Tajima 1981.

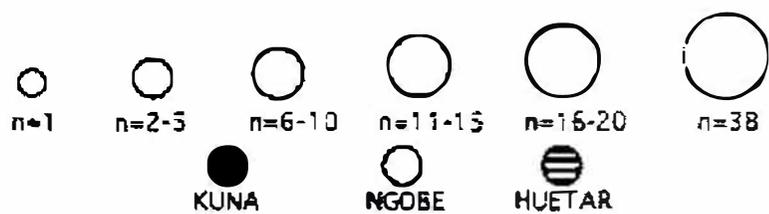
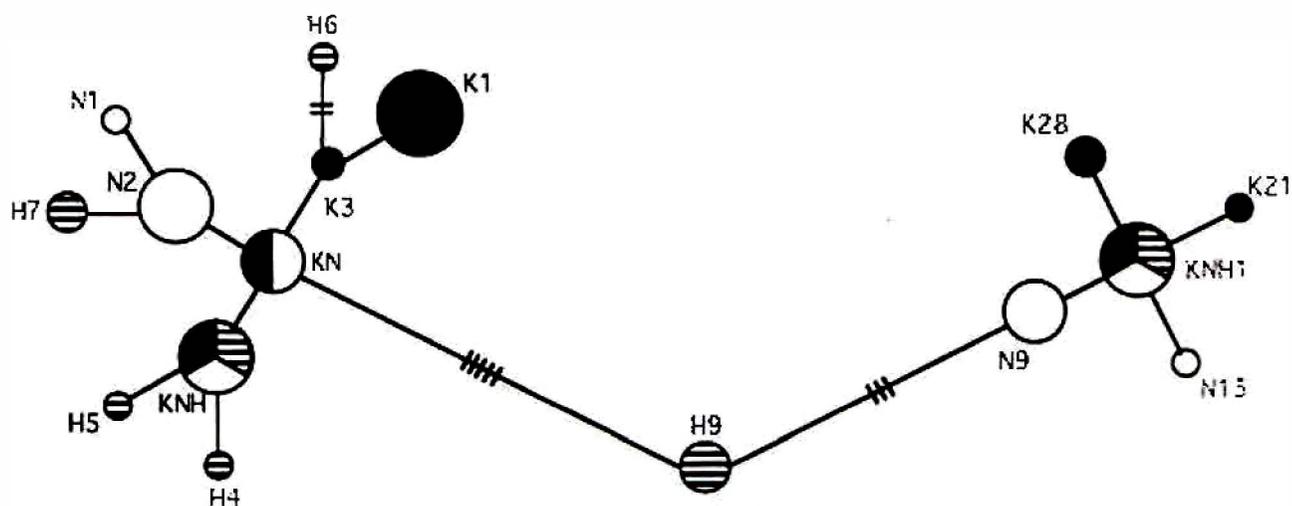
E(V) de acuerdo con Watterson 1975.

### B.2.2 Relaciones filogenéticas.

La red de mínima distancia (Fig. 5), provee un resumen gráfico de las relaciones entre 16 haplotipos de ADNmt de los grupos cuna, ngöbé y huetar. La distribución de los haplotipos fue independiente de su ubicación geográfica. Esta red consta de dos grupos, principalmente, centrados en los haplotipos KN y KNH1 que corresponden a los haplogrupos A y B. H9 es el único grupo que representa el linaje D. Hubo tres haplotipos compartidos por más de un grupo, KNH, KN, KNH1; así como también haplotipos genéticamente distintos dentro de una misma tribu, por ejemplo, K5,K28: cuna; N1,N15: ngöbé; H4,H11: huetar. El número de mutaciones entre la mayoría de pares de haplotipos dentro de un haplogrupo fue la mínima (1) independientemente de la tribu.

La red de mínima distancia mostrada en la figura 6, proporciona un resumen gráfico de las relaciones entre 59 haplotipos pertenecientes a las cinco tribus amerindias: cuna, ngöbé, huetar, nuu chah nulth, mapuche; y la tribu nadené haida. Esta red está formada por cuatro agrupaciones de haplotipos identificados como A, B, C y D, cada una de las cuales está centrada en los haplotipos KNCA, KNEC, CM y CA2, respectivamente. En general, con excepción de los mapuche, el grupo A está integrado por el porcentaje más alto de haplotipos de cada tribu, cuna (71.4%), huetar (70.4%), ngöbé (67.4%), nuu chah nulth (44.4%), mapuche (15.8%) y haida (87.5%). El grupo B está formado por altos porcentajes de haplotipos de las tribus mapuche (39.5%), ngöbé (32.6%) y cuna (28.6%) y por los porcentajes más bajos de las tribus huetar (3.7%) y nuu chah nulth (3.2%). El grupo C está representado por haplotipos de individuos de tres tribus únicamente, los mapuche (21%), los nuu chah nulth (19%) y los haida (7.5%). El grupo D está compuesto por haplotipos de las tribus nuu chah nulth (33%), huetar (25.9%), mapuche (23.7%) y haida (5%). Hubo cuatro haplotipos compartidos por

Figura 5. Red de mínima distancia en la que se ilustran las relaciones entre 16 haplotipos de tres grupos chibchas. El tamaño de cada círculo representa el número de individuos por haplotipo. Los diferentes patrones de círculo representan a los grupos amerindios: cuna, ngöbé y huetaar. Las líneas que conectan los círculos representan una mutación, excepto donde se indica el número de mutaciones por medio de pequeñas líneas. Se incluyen los cuatro haplotipos ngöbé (Kolman et al. en prensa), los cinco huetaar (Santos et al. 1994). Los círculos que contienen diferentes patrones representan haplotipos que fueron encontrados en más de una población. Por ejemplo, KN representa los haplotipos identificados como K4 y N4 (Kolman et al. en prensa), KNH representa los haplotipos identificados como K5, N7 (Kolman et al. en prensa) y H1 (Santos et al. 1994) y KNH1 representa los haplotipos identificados como K7, N13 (Kolman et al. en prensa) y H11 (Santos et al. 1994). Las dos agrupaciones centradas en los haplotipos KN y KNH1 corresponden a los haplogrupos A y B, respectivamente.



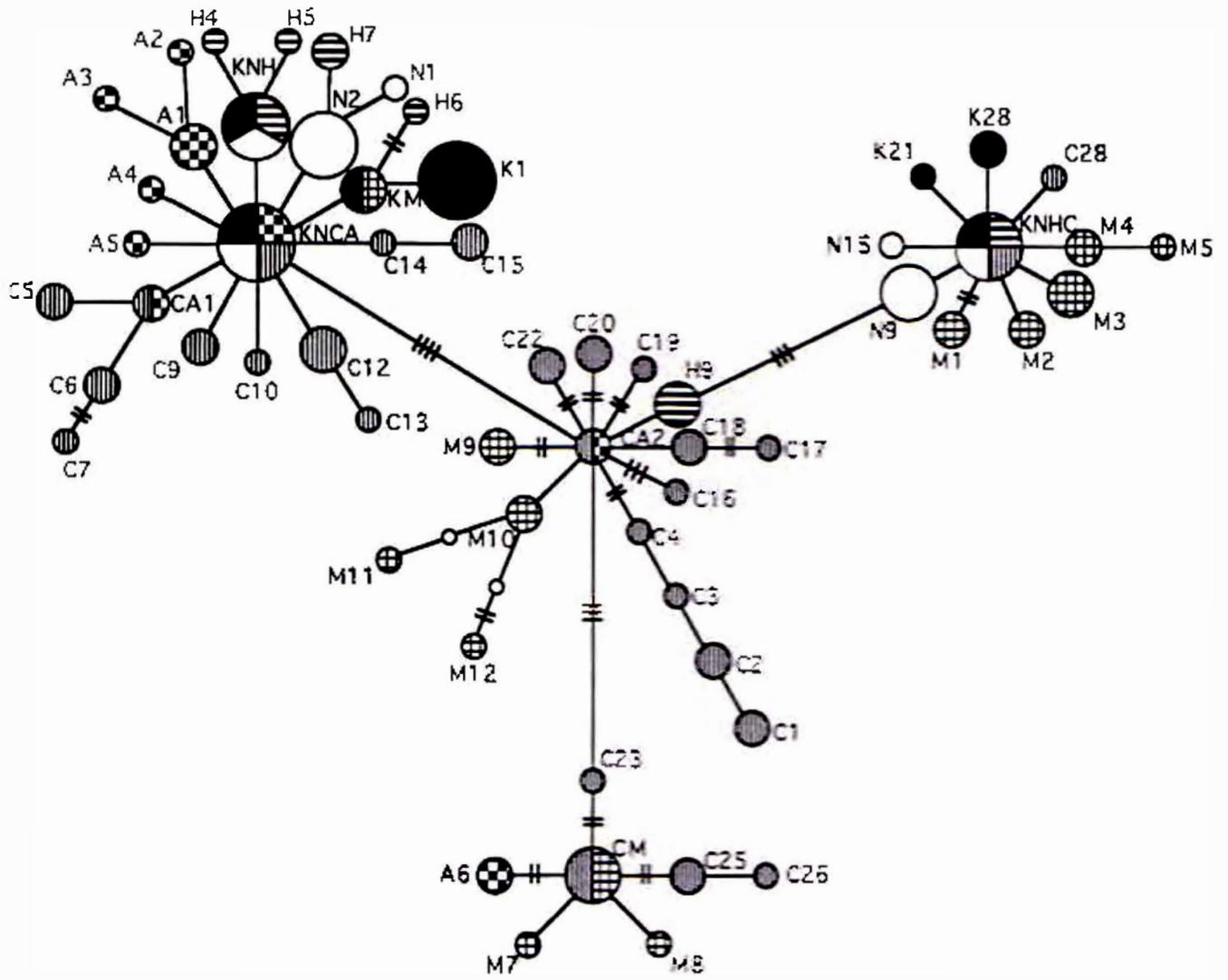
cualquiera de las tribus chibchas, los nuu chah nulth y mapuche, KNC, KM, CM, y KNHC, así como haplotipos completamente diferentes dentro de las tribus. Los haída, a diferencia de los grupos amerindios, no tienen haplotipos ubicados en el grupo B. Tres haplotipos de los haída fueron compartidos con los de los amerindios KNCA, CA1 y CA2. El número de mutaciones entre pares de haplotipos varió de acuerdo con cada grupo. Las diferencias mutacionales son menores entre los haplotipos que integran los grupos A y B y mayores entre las que integran el grupo D.

### B.2.3 Análisis estadístico.

El análisis AMOVA realizado con base en la red de mínima distancia de la figura 6 permitió estimar los valores de variación genética entre las seis tribus de aborígenes americanos, entre regiones lingüísticamente diferentes (na-dene y amerindio), entre tribus amerindias chibchas y no chibchas y entre pares de tribus. Los resultados revelaron diferencia significativa en la variación genética entre las seis tribus consideradas. El 19.98% de la variación se dió entre las tribus y el 80.02% dentro de las tribus, al considerarlas dentro de una región ( $p < .001$ ).

El análisis en el cual se compararon dos regiones, una incluyendo los tres grupos chibchas y la otra los dos grupos amerindios no chibchas indicó un 7.4% de variación genética entre las regiones y 13% de variación dentro de las tribus ( $p < .001$ ). Por otro lado, otros análisis que también involucraron dos regiones, una incluyendo los na-dene, y otra todas las tribus amerindias, no reveló ninguna diferencia significativa ( $p = .34$ ), sin embargo, cuando se agruparon todos los haplotipos de las tribus en un único grupo amerindio y se compararon con la tribu na-dene se obtuvo 11 % de variación entre las poblaciones ( $p < .001$ ).

Figura 6. Red de mínima distancia en la que se ilustra las relaciones entre 59 haplotipos de cinco tribus amerindias y una tribu no-déna. Las indicaciones sobre el tamaño, los patrones de círculo y el número de mutaciones son idénticas a las especificadas en la figura 5. Se incluyen los cuatro haplotipos ngóbé (Kolman et al. en prensa); los cinco huastec (Santos et al. 1994); los 28 muu chah mulch (Ward et al. 1991), los cuales se registran como C1-C28; los 13 mapuche (Ginther et al. 1993), los cuales se registran como M1-M13, además de dos haplotipos documentados por Horal et al. 1992, mostrados como los círculos blancos más pequeños; los nueve haida (Ward et al. 1993), los cuales se registran como A1-A9. Los círculos que contienen varios patrones representan secuencias que fueron encontrados en más de una tribu. Por ejemplo, KN representa los haplotipos identificados como K3 y M13 (los dos últimas secuencias en Ginther et al. 1993); KNCA representa los haplotipos identificados como K4, N4 (Kolman et al. en prensa), 11 (Ward et al. 1991) y A2 (11 en Ward et al. 1993); KNH representa los haplotipos identificados como K5, N7 (Kolman et al. en prensa) y N1 (Santos et al. 1994); CA1 representa los haplotipos identificados como 8 (Ward et al. 1991) y A7 (8 en Ward et al. 1993); CA2 representa los haplotipos identificados como 21 (Ward et al. 1991) y A9 (21 en Ward et al. 1993); CM representa los haplotipos identificados como 24 (Ward et al. 1991) y M6 (secuencias 7 y 8 en Ginther et al. 1993); KNHC representa los haplotipos identificados como K7, N13 (Kolman et al. en prensa), N11 (Santos et al. 1994) y 27 (Ward et al. 1991). Las cuatro agrupaciones centradas en los haplotipos KNCA, KNHC, CM y CA2 corresponden a los haplogrupos A, B, C y D, respectivamente.



Los resultados de los análisis de variación genética entre pares de tribus individuales se muestran en el cuadro 10. Para los análisis cuna/ngöbé y ngöbé/huetar  $p=0.002$  y  $0.012$ , respectivamente, y para los análisis restantes  $p<0.0010$ . Las diferencias entre las tribus oscilan entre 10%, para la comparación de los ngöbé/huetar, y 38% para la comparación de los mapuche/haida. Las comparaciones entre tribus chibchas exhibieron variaciones intertribales escasamente más bajas que otras combinaciones de tribus. Por otro lado, aunque el par de tribus que está geográficamente más distante reveló una variación mayor (mapuche y haida-38%), la distancia geográfica no siempre estuvo correlacionada con la distancia genética. Por ejemplo, la segunda comparación de tribus con distancia geográfica mayor, los nuu chah nulth y mapuche, presentaron uno de los valores de diferencia genética más bajos.

Cuadro 10. Valores de variación genética intertribal para seis tribus americanas.

Combinaciones	Valores de variación entre grupos	(P)
Ngöbé- huetar	9.89	0.0120
Huetar- nuu chah nulth	12.25	<0.0010
Nuu chah nulth- mapuche	13.48	<0.0010
Ngöbé- nuu chah nulth	13.72	<0.0010
Nuu chah nulth- haida	15.27	<0.0010
Cuna- ngöbé	15.88	0.0020
Huetar- haida	16.20	<0.0010
Ngöbé- haida	18.56	<0.0010
Cuna- huetar	20.26	<0.0010
Ngöbé- mapuche	21.19	<0.0010
Cuna- nuu chah nulth	21.27	<0.0010
Cuna- haida	24.77	<0.0010
Cuna- mapuche	26.27	<0.0010
Huetar- mapuche	27.18	<0.0010
Mapuche- haida	38.11	<0.0010

#### **B.2.4 Distribuciones de las diferencias genéticas entre pares de haplotipos.**

Las distribuciones de las diferencias entre pares de haplotipos fueron calculadas para los cuna, ngöbé, huetar, nuu chah nulth y mapuche (Fig. 9 y 10). Todos los grupos incluyendo a los haida presentados en Kolman et al. (en prensa) comparten una cresta que va de 6-9 unidades de tiempo mutacional en sus distribuciones sugiriendo una expansión común hace 84000-56000 años. Una cresta adicional es observada en las distribuciones de los tres grupos chibchas lo cual sugiere una segunda y más reciente expansión. Esta expansión ocurre entre cero y una unidad de tiempo mutacional. Cuando los tres grupos chibchas son agrupados y analizados (Fig. 10), la segunda cresta ocurre en una unidad de tiempo mutacional lo que sugiere una expansión chibcha más reciente, hace aproximadamente 10000 años.

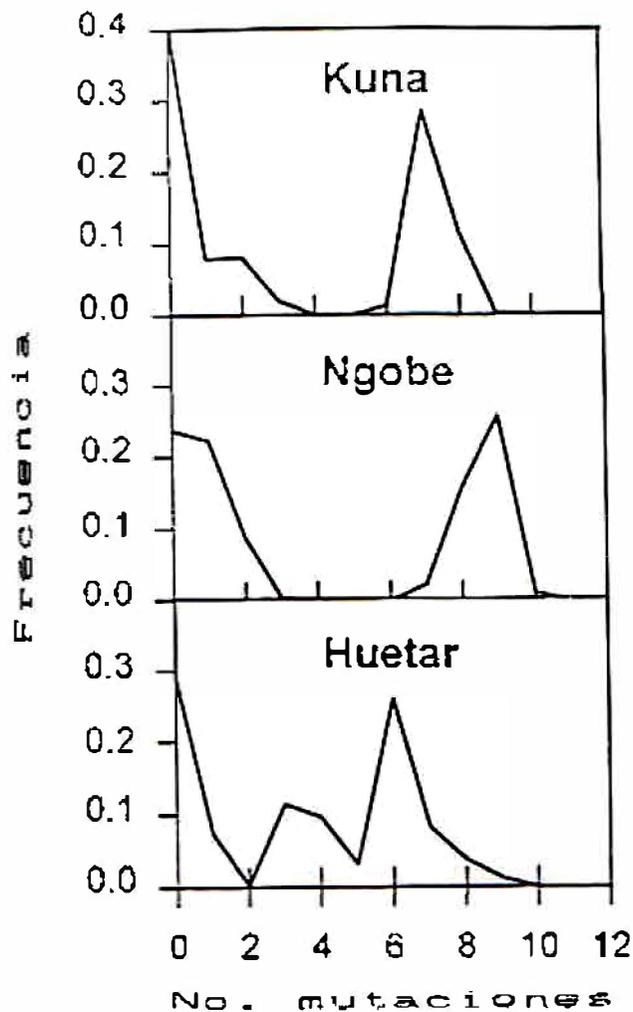


Figura 9. Distribuciones de las diferencias entre pares de haplotipos de los kuna, ngóbé y huetar. En el eje X se muestra el número de las diferencias entre las secuencias y en el eje Y la frecuencia de los pares que exhiben un número dado de diferencias nucleotídicas.

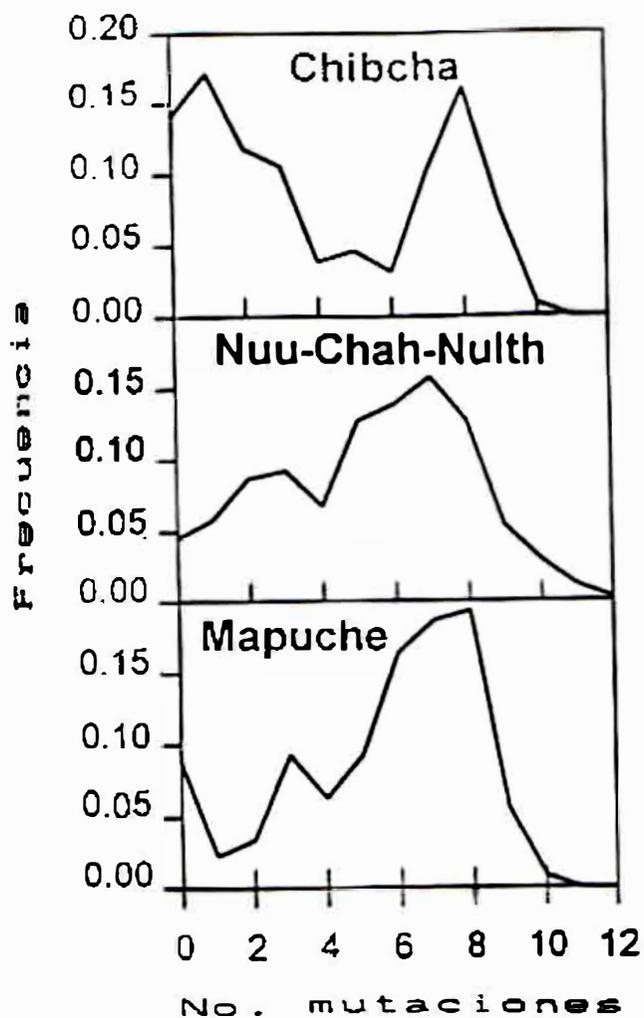


Figura 10. Distribuciones de las diferencias entre pares de haplotipos de tres tribus chibchas (cuna, huetar y ngöbé), de los nuu chah nulth y los mapuche. En el eje X se muestra el número de las diferencias entre las secuencias y en el eje Y la frecuencia de los pares que exhiben un número dado de diferencias nucleotídicas.

## DISCUSION.

Este estudio muestra que en el segmento I de la región control del ADNmt de los cuna, hubo únicamente mutaciones de tipo transición, ocurridas más comúnmente entre pirimidinas que entre purinas, y que la distribución de las mismas no ocurrió al azar. Estas características confirman lo que se ha documentado en otros estudios (Horai y Hayasaka 1990, Santos et al. 1994, Horai et al. 1993, Ginther et al. 1993, Kolman et al. en prensa).

En un estudio previo realizado mediante análisis de restricción en 16 cuna, procedentes exclusivamente de la isla de Río Azúcar, se identificaron únicamente ADNmts pertenecientes al haplogrupo A (Torrioni et al. 1994). Los resultados del presente estudio basados en 63 muestras cuna, procedentes de 17 poblados diferentes, indican que la ausencia de ADNmts pertenecientes al haplogrupo B no fue debido a pérdida por efectos de deriva genética, como lo proponen Torrioni et al. (1994), sino que refleja un muestreo inadecuado en las poblaciones cuna. No obstante, aunque en el presente estudio se incluyeron 63 muestras, éstas podrían no representar la verdadera extensión de la diversidad mitocondrial cuna. Por ejemplo, aunque se identificaron ADNmts pertenecientes al haplogrupo B, éstos estuvieron limitados a sólo cuatro poblaciones isleñas. Una comparación de los resultados de ambos trabajos sugiere que, cuando se intenta caracterizar genéticamente las poblaciones humanas, es necesario realizar muestreos más extensivos, tanto geográfica como numericamente.

Los cuna, al igual que otros grupos chibchas vecinos de Baja Centroamérica como los ngöbé (Kolman et al. en prensa), los huetar (Santos et al. 1994), los cabécar, bribri, bugle y guatuso (Barrantes no publicado), presentaron los valores de

diversidad haplotípica más bajos. La red de mínima distancia de la figura 6, provee un resumen cualitativo de estas diferencias. Los cuna, ngöbé y huetar están representados por solamente 16 de los 59 haplotipos. Además, con excepción de los huetar y boruca, los grupos chibchas presentan haplotipos pertenecientes a sólo dos de los cuatro haplogrupos amerindios, mientras que los maya, macushi (Torróni et al. 1993a), waunáan, emberá (Kolman y Bermingham no publicado), nuu chah nulth (Ward et al. 1991) y mapuche (Ginther et al. 1993) presentan haplotipos pertenecientes a los cuatro haplogrupos (Cuadro 6). De igual manera, en las tribus makiritare y piaroa se identificaron haplotipos pertenecientes a tres haplogrupos en una muestra de sólo 10 individuos (Torróni et al. 1993a). Por otro lado, el hecho que los yanomama se caracterizaron por la presencia de haplotipos pertenecientes a los grupos C y D, y ausencia de haplotipos pertenecientes al grupo A, establece una clara diferencia entre esta tribu y las tribus chibchas de Baja Centroamérica. Las diferencias entre los yanomama y una de las tribus, los guaymí, también fueron notadas por Spielman et al. (1979), mediante la utilización de marcadores proteicos.

La baja diversidad genética de los cuna, también fue evidente a nivel nucleotídico calculada como un valor que mide la variación de las generaciones actuales ( $\pi$ ) y como un valor que mide la diversidad desde hace varias generaciones  $E(v)$ . Los cuna presentaron un valor de  $\pi$  correspondiente al 69% del de los nuu chah nulth y mapuche y un valor de  $E(v)$  correspondiente al 38 y 42% del de los nuu chah nulth y mapuche, respectivamente. Los valores de diversidad genética para las tribus chibchas fue bajo en comparación con los otros grupos amerindios. Los valores de  $E(v)$  reflejan que la diversidad de los grupos chibchas es un hecho que implica una historia larga de reducida diversidad. Por lo tanto, es

difícil especular sobre la constitución genética de los ancestros chibchas antes de su llegada al continente americano.

La baja diversidad en el ADNmt de los cuna y las otras tribus chibchas puede reflejar diferencias culturales entre las tribus. Por ejemplo Barrantes (1993), documentó que la baja microdiferenciación a nivel nuclear en los grupos de Baja Centroamérica puede ser explicada en función del tipo de estructura poblacional. La baja microdiferenciación en los grupos chibchas fue atribuida a patrones de fisión, seguidos por fusión a lo largo de líneas familiares. En las tribus chibchas predominan los clanes matrilineales, con excepción de los guaymí cuya estructura es patrilineal (Barrantes 1993). Estas diferencias implican que a nivel de ADNmt, los ngöbé podrían tener valores de diversidad genética mayores que los otros grupos chibchas. Nuestros resultados indican que los ngöbé, al igual que las otras tribus chibchas, presentan bajos valores de diversidad haplotípica (Cuadro 7). Al parecer, las diferencias en las estructuras poblacionales de los ngöbé y los otros grupos chibchas, no se manifiestan a nivel del ADNmt, al menos hasta la fecha. Tampoco se debe ignorar que los buglé presentaron un valor más alto de diversidad haplotípica, con respecto, a los otros grupos chibchas. Esta situación invita a realizar una revisión más exhaustiva de su estructura poblacional, pues hay que recordar que tanto los ngöbé como los buglé eran denominados guaymí, y es posible que exista confusión sobre las estructuras poblacionales de estas dos tribus.

La baja diversidad de las tribus chibchas, también puede reflejar una disminución en sus tamaños de población por efectos de la conquista europea. Las poblaciones amerindias de Centroamérica disminuyeron drásticamente después de la conquista (Newson 1986). Durante la primera mitad del siglo

XVI, los cambios en la cultura de los grupos amerindios fueron el producto directo de la conquista española y el resultado indirecto de una disminución en el tamaño de las poblaciones. Los cambios fueron grandes, pero hubo variaciones regionales en el grado de aculturación y despoblamiento, los cuales estuvieron relacionados con la distribución de las actividades españolas, la ubicación geográfica de los grupos indígenas y la naturaleza de cada grupo.

La presencia definitiva de los cuna en Panamá, es documentada por un grupo de misioneros en el siglo XVII (Howe 1986). Sin embargo, es posible que a finales del siglo XVI, existieron algunos poblados cuna en Panamá (Torres de Araúz 1981). También, Romoli (1987) afirma que los cuna aparecieron 70 años después de la extinción de los cueva, ocurrida aproximadamente a mediados del siglo XVI. Según estos documentos, los cuna parecen no haber tenido un contacto tan directo con los españoles durante el siglo XVI, y es posible que su tamaño de población no fue tan afectado como ocurrió en otras tribus. Aunque no existe un censo confiable antes de 1950 (Howe 1986), a mediados del siglo XX los cuna contaban con una población que oscilaba, aproximadamente entre los 20000 y 30000 habitantes incluyendo los trabajadores inmigrantes (Stout 1947, Howe 1986). En la actualidad han alcanzado una población aproximada de ~48000 habitantes (censo de 1990)

Los guaymí ubicados en las montañas permanecieron aislados y relativamente poco afectados, debido a la ausencia de colonización, misioneros y otras formas de contacto directo prolongado en esas áreas (Young 1970). Un documento español de 1709, indicó que los guaymí (entre ellos ngöbé y buglé) sumaban 8,000 en aquel tiempo. En el siglo XX, las poblaciones ngöbé se han expandido rápidamente desde 20,000-

40,000 en 1940 (Gjording 1991, citado por Kolman et al. en prensa) hasta - 125,000 individuos en 1990 (censo de 1990).

Los teribe y huetar fueron más afectados. La población de los teribe fue dividida por los misioneros españoles en el siglo XVII y trasladada una parte a Costa Rica, con un seguimiento de varias enfermedades que contribuyeron a disminuir su tamaño de población notablemente (Barrantes 1993). Los huetar constituían el grupo más numeroso y poderoso, desde el punto de vista político y económico, a la llegada de los españoles (Constenla 1984), pero su población se ha reducido hasta ~855 habitantes (Tenorio 1988). Es un grupo con mucha aculturación e hibridación con grupos no indígenas, situación que podría reflejar el grado de despoblamiento y debilitamiento en la estructura poblacional causada por la conquista española y sus efectos. Otros grupos talamanqueños, los cabécar y los bribri, al igual que los cuna y los guaymí, se mantuvieron en las partes altas del bosque tropical húmedo de topografía accidentada, donde las misiones tuvieron poco o ningún éxito. Estas tribus tuvieron una disminución de sus poblaciones, relativamente baja, y a partir del siglo XIX iniciaron un crecimiento demográfico apreciable (Barrantes 1993).

Una comparación de los chibchas con las tribus vecinas waunán y emberá, ofrece un panorama más claro. La existencia de las tribus chocó se documenta desde el siglo XVI y XVII. Una revisión de Matson y Swanson (1965b), cita un escrito de Johnson (1948), según el cual los chocó ofrecieron considerable resistencia a Balboa y a otros conquistadores, quienes hicieron una serie de exploraciones en el área. Bray (1984), sugiere que los chocó pudieron haber jugado un papel de enorme importancia en el intercambio de influencias culturales entre Panamá y Colombia durante tiempos precolombinos. La existencia de los chocó en Darién, para el

tiempo de la conquista europea, conduce a la idea de que éstos, al igual que las tribus chibchas, debieron estar sometidos a presiones causadas por la presencia de los europeos en el área, al menos enfermedades. Actualmente, las tribus chocó de Panamá son menos numerosas que las tribus cuna y ngöbé, y es posible que también lo fueron para el tiempo de la conquista. El hecho de que estos grupos mantienen una diversidad mitocondrial alta, a pesar de tener poblaciones con tamaños inferiores a los ngöbé y cuna, no favorece la idea de que las poblaciones chibchas pasaron por cuellos de botella causados por el efecto de la conquista europea. Por el contrario, apoya la idea de que la diversidad genética baja de los grupos chibchas precedió a la conquista europea.

En resumen, es posible que la disminución en los tamaños de las poblaciones de las tribus chocó y chibchas, no fueron lo suficientemente bajos que facilitaran la pérdida de diversidad genética por efectos aleatorios. Por lo tanto, es necesario ser cautelosos al pensar en cuellos de botella causados por la conquista europea como una alternativa posible para explicar la baja diversidad mitocondrial de los chibchas.

Aunque no hay que ignorar el efecto de la conquista, es necesario recurrir a otro argumento que permita explicar porque las tribus chibchas, afectadas en forma diferente por la conquista europea, presentan genomas mitocondriales pertenecientes mayoritariamente, a los haplogrupos A y B. Pues los huetar y boruca, además presentan un número bajo de ADNmt pertenecientes al haplogrupo D. El hecho de que las ocho tribus chibchas estudiadas, presentan un bajo grado de diversidad mitocondrial sugiere la ocurrencia de un origen o causa simultánea que dieron como resultado esta baja diversidad genética. La etnogénesis de las tribus chibchas de

Baja Centroamérica a partir de una pequeña población fundadora, surge como la explicación más pertinente. Es posible que la baja diversidad en el ADNmt de las tribus chibchas, refleje un muestreo pequeño de la gran onda de migración amerindia y de los ADNmts que dieron lugar a los haplogrupos característicos de éstos. El origen a partir de una pequeña población, también implica una pérdida más rápida de haplotipos por deriva genética a nivel del ADNmt, debido a su forma de herencia uniparental.

El análisis de las distribuciones de las diferencias entre pares de haplotipos, provee un estimado para el tiempo de expansión de las poblaciones chibchas, la cual es probable que ocurriera después de la separación del grupo proto-chibcha del resto de los amerindios. La distribución de las diferencias genéticas de los cuna, ngöbé, nuu chah nultu y mapuche (Fig. 9 y 10), comparten una cresta que se extiende desde 6 a 9 unidades de tiempo mutacional, equivalentes a una expansión antigua, ocurrida presumiblemente en Asia, hace 84000-56000 años. Esta se corresponde muy bien con los estimados de la primera gran expansión de los grupos humanos hace 80000 a 30000 años (Harpending et al. 1993).

La distribución de las diferencias entre pares de haplotipos de los tres grupos chibchas (Fig. 9), reveló una segunda cresta que se extiende entre cero y una unidad de tiempo mutacional. La ocurrencia de esta cresta en los tres grupos chibchas sugiere que el origen de estas tribus, a partir de una pequeña población fundadora, ocurrió simultáneamente. Un análisis agrupado de los cuna, huetar y ngöbé (Fig. 10), provee un estimado de hace aproximadamente 10000 años, para la expansión de estos tres grupos chibchas. Este número acarrea un error grande, pero indeterminado, y debido a que este análisis es relativamente nuevo, éstos resultados deberían interpretarse con cautela (Marjoram y

Donnelly 1994). No obstante, es importante notar, que el tiempo se ubica dentro del propuesto para la etnogénesis del tronco lingüístico chibcha, hace 10,000-7,000 años, el cual fue estimado con base en información genética, lingüística y arqueológica (Barrantes et al. 1990, Constenla 1991, Cooke y Ranere 1992).

En la distribución de los na-dene haida, también se observó una segunda cresta entre una y dos unidades de tiempo mutacional (Kolman et al. en prensa), lo cual sugiere que los na-dene experimentaron una reducción reciente en su tamaño de población y una expansión comparable a la de los grupos chibchas. Es interesante notar que los haida y las tribus chibchas, además de una segunda cresta, también comparten los niveles más bajos de diversidad genética documentados para los grupos indígenas del nuevo mundo.

#### **Ancestría cuna.**

La evidencia mitocondrial sugiere con firmeza que los cuna son de origen chibcha y no son el resultado de una mezcla de tribus lingüísticamente diversas. Los grupos vecinos chocó, a diferencia de los grupos chibchas, exhiben niveles altos de diversidad mitocondrial y ADNmt pertenecientes a los cuatro haplogrupos (Kolman y Bermingham no publicado). Por consiguiente, la evidencia de ADNmt desaprueba la sugerencia de Howe (1978), según la cual, los cuna se formaron a partir de grupos remanentes de habla chocó, que habitaron en Darién y el norte de Colombia durante un período después de la conquista. Sin embargo, aún queda la posibilidad que los cuna representan una aglomeración de varios grupos de lenguaje chibcha. La información de ADNmt provee evidencia de la ancestría chibcha de los cuna, sólo por vía femenina. La cercanía geográfica de los cuna a los chocó, en el pasado y el presente, deja abierta la posibilidad que en los cuna se puedan identificar orígenes no

chibchas a nivel nuclear. Se hace necesario la realización de análisis nucleares para experimentar la hipótesis de Howe (1978)

#### **Desarrollo in situ de los chibchas en Centroamérica.**

Nuestros resultados muestran que las ocho tribus chibchas presentaron, mayoritariamente, haplotipos del grupo A y B, con excepción de los huetar y boruca que además, presentaron ADNmts pertenecientes al haplogrupo D. Estas dos últimas tribus pudieron adquirir estos ADNmts por mezcla con grupos amerindios no chibchas. Sin embargo, el lenguaje es una barrera que impide la adquisición de nuevas constituciones genéticas, tal como lo propuso Neel (1980) con base en estudios genéticos de varias tribus de Suramérica. Por lo tanto, parece ser más probable que los grupos chibchas estudiados hasta la fecha han perdido ADNmts de los haplogrupos C y D por efectos de deriva genética.

El hecho de que se identificaron genomas mitocondriales pertenecientes al haplogrupo C y D en las tribus amerindias cercanas a los chibchas de Baja Centroamérica (maya, waunán, emberá, piaroa, macushi, makiritare y yanomama), y en las tribus distantes a éstos (nuu chah nulth y mapuche), además de mostrar ausencia de mezcla materna en las muestras cuna, refleja una ausencia de flujo génico mitocondrial entre los chibchas y todas estas tribus. Por consiguiente, nuestros resultados no apoyan la hipótesis de que el istmo centroamericano ha constituido un puente por tiempos prolongados para culturas procedentes de Norte o Suramérica. Por el contrario, favorecen la hipótesis de un desarrollo in situ de los grupos chibchas de Baja Centroamérica.

La singularidad del grupo chibcha es una situación planteada en estudios genéticos, lingüísticos

arqueológicos, en los cuales se sugirió un desarrollo *in situ* de los grupos chibchas de Centroamérica y su origen a partir de una pequeña población fundadora.

Los estudios de naturaleza genética, a partir de los análisis cuantitativos basados en dermatoglifos, permitieron la identificación de características propias de los grupos chibcha. Entre éstas, valores demasiado bajos en la zona hipotenar y en el recuento total de las líneas digitales (Barrantes 1993). En los análisis cualitativos basados en isoenzimas, se demostró que los chibchas tienen altas frecuencias de algunas variantes, cinco polimorfismos privados mencionados en la introducción y ausencia del antígeno Di-a (Barrantes et al. 1990). A nivel de ADNmt se identificó la delección huetar, asociada al haplogrupo A (Santos 1992) en los cuna, en los ngöbé (Kolman et al. en prensa), en los bribri, cabécar y boruca (Barrantes no publicado). El estudio de Torroni et al. (1993a), en los boruca, bribri/cabécar, guaymí, cuna y otras tribus no chibchas, corroboró la presencia de esta delección en grupos chibchas únicamente, mediante la identificación de la ausencia del sitio MspI en posición 104. Esta delección también fue encontrada por Merriwether (1993), en dos personas de la tribu Aymará de Suramérica, pero relacionada con el haplogrupo D. La ocurrencia de la mutación en contextos diferentes, sugiere una ocurrencia en forma independiente, pero no descarta la posibilidad de que pueda ser encontrada en otras tribus amerindias. No obstante, la consistencia y alta frecuencia de la delección huetar en todas las tribus chibchas de Baja Centroamérica, permiten que se utilice como una característica propia de éstas tribus.

Por otro lado, los estudios comparativos y lexicoestadísticos efectuados sobre las lenguas de las familias chibcha (Constenla 1981, 1985) llevan a la

conclusión de que en general, la permanencia de los pueblos chibchas en los territorios que ocupaban a la llegada de los españoles data de épocas muy antiguas y que no hay indicios de grandes movimientos migratorios, por lo menos recientes. De igual manera, los arqueólogos han defendido la idea de que el istmo centroamericano no debe verse como una simple válvula entre Norte y Suramérica. El modelo propuesto por Cooke (1986), "patrones de aglutinación y fisión en una población antigua y distribuida a lo largo de la región", es el predominante en la actualidad. Este modelo da un papel menos decisivo a los contactos, que de hecho existieron por vía terrestre como marítima, con las civilizaciones de áreas vecinas. De acuerdo con Bray (1984) los dos hechos que le llamaron más la atención al llevar a cabo su examen arqueológico y etnohistórico de las relaciones entre Colombia y el sur de Centroamérica, fueron la estabilidad del área y el tipo de mecanismo predominante de difusión cultural. Con relación al primer aspecto este autor anota: en primer lugar, las fronteras entre las provincias culturales discretas permanecen constantes por períodos muy largos. Un milenio no es cosa poco común... No sugiero que nunca hubiera habido cambios en la fronteras (claramente los hubo), sino que la estabilidad, en vez de la fluctuación continua, fue el estado normal de las cosas". En cuanto a lo segundo, hace la siguiente caracterización: "...la estabilidad no significa aislamiento. Cada área comerciaba con sus vecinos y, por una especie de ósmosis cultural, las técnicas y las ideas eran absorbidas de una área a otra. Este tipo de filtración funcionaba en todas direcciones. Aunque la difusión de ciertos rasgos (como la metalurgia, por ejemplo) fuera unidireccional, la pauta general no justifica ninguna división simplista en culturas donantes y recipientes." Como consecuencia de estos dos hechos, los principales estímulos de la tradición cultural de las regiones en cuestión habrían sido "la adaptación y adaptabilidad locales", y no los

contactos con grupos procedentes de otras áreas, pues de todos modos, "los indicios sugieren que las migraciones a gran escala y las invasiones fueron acontecimientos escasos y que gran parte del contacto de intercambio fue de tipo indirecto".

#### **Hipótesis sobre el número de migraciones a América.**

La determinación de una diversidad reducida en el ADNmt de ocho grupos amerindios lingüísticamente relacionados, permite discutir la utilidad que tienen las medidas de diversidad genética en la determinación del número de eventos de migración ocurridos hacia el Nuevo Mundo. Con base en evidencias lingüísticas, dentales y genéticas, se propuso que tres ondas de migración fundaron las tres mayores divisiones de los grupos contemporáneos del Nuevo Mundo, los amerindios, na-dene y eskimo-aleut (Greenberg et al. 1986). La hipótesis de tres migraciones recibió apoyo reciente proveniente de estudios de ADNmt, según los cuales, las diferencias en la diversidad del ADNmt de los na-dene y amerindios es un indicativo de que estos grupos provienen de dos migraciones diferentes (Torroni et al. 1992, Torroni et al. 1993a). Sin embargo, las conclusiones basadas únicamente en medidas de diversidad de ADNmt pueden ser mal interpretadas. Por ejemplo, los resultados del AMOVA presentados aquí, sugieren que las tribus más distantes geográficamente, los nuu chah nulth y mapuche, están entre las más relacionadas genéticamente. Una consideración de la ubicación geográfica de las tribus estudiadas y de los haplotipos que contribuyen a los valores de sus diversidades genéticas, sugiere que es más probable que la pérdida de ADNmts pertenecientes a los haplogrupos C y D en los chibchas, crean una relación artificial entre los mapuche y los nuu chah nulth.

Al parecer un exceso de simplificación de los valores de diversidad mitocondrial fue utilizada para apoyar la hipótesis de tres migraciones. En el pasado, el subjuogo de ADNmts pertenecientes a los haplogrupos amerindios que portan las tribus se ha utilizado, para identificar la onda de migración a la cual pertenecen. Por ejemplo, la observación que los na-dene presentan haplogrupos de ADNmt A y B (Wallace y Torroni 1992) o, más recientemente, sólo ADNmts del haplogrupo A (Torroni et al. 1993a) fue ofrecido como evidencia que los na-dene llegaron en una migración diferente a la de los amerindios, quienes portaron haplogrupos de ADNmt A, B, C y D. Sin embargo, las tribus cuna, ngóbé, guatuso, bribri y cabécar también portan únicamente haplogrupos de ADNmt A y B, y no hay duda de su ancestría amerindia. Tal como se documentó anteriormente (Kolman et al. en prensa), la evidencia motocndrial sugiere que los na-dene y los chibchas pueden representar simplemente un muestreo más pequeño de la migración proveniente de Asia, y que los na-dene no necesariamente representan un evento de migración independiente.

## BIBLIOGRAFIA

- Adovasio, J.M., Donahue J., Cushman K., Carlisle R.C., Stuchenrath R., Gunn J.D. y Johnson W. C. 1983. Evidence from Meadowcroft Rockshelter, p: 163-189. In R. Shutler, JR. (ed.) Early Man in the New World. Sege, Beverly Hills.
- Anderson S.A., Bankier A.T., Barrell B.G., de Bruijn M.H.L, Coulson A.R., Droulin J., Eperon I.C., Nierlich D.P., Roe B.A., Sanger F., Schreier P.H., Smith A.J.H., Staden R. y Young I.G. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome, *Nature*, 290:457-465.
- Aquadro C.F. y Greenberg B.D. 1983. Human mitochondrial DNA variation and evolution: analysis of nucleotide sequences from seven individuals, *Genetics*, 103:287-312.
- Attardi G. 1985. Animal mitochondrial DNA: An extreme example of genetic economy, *International review of cytology*, 93:93-145.
- Bada J.L. y Gillespie R., Gowlett J.A.J. y Hedges R.E.M. 1984. Accelerator mass spectrometry radiocarbon ages of amino acid extracts from California Paleoindian skeletons, *Nature*, 290:457-465.
- Bailliet G., Rothhammer F., Carnese F.R., Bravi C.M. y Bianchi N.O. 1994. Founder mitochondrial haplotypes in amerindian populations, *Am. J. Hum. Genet.*, 55:27-33.
- Barrantes R., Smouse P.E., Neel J.V., Mohrenweiser H.W. y Gerhowitz H. 1982. Migration and genetic infrastructure of the Central American guaymí and their affinities with other tribal groups, *Am. J. Phys. Anthropol.*, 58:201-214.
- Barrantes, R., Smouse P.E., Mohrenweiser H.W., Gerhowitz H., Azofeifa J., Arias T.D. y Neel J.V. 1990. Microevolution in Lower Central America: Genetic characterization of the chibchas-speaking groups of Costa Rica and Panama, and consensus taxonomy based on genetic and linguistic affinity. *Am. J. Hum. Genet.*, 46:63-84.
- Barrantes R. 1993. Evolución en el Trópico: Los amerindios de Costa Rica y Panamá, edit. Universidad de Costa Rica.
- Bray W. 1984. Across de Darien gap: A colombian View of Isthmian archaeology. In Lange y Stone (ed.) The archaeology of lower Central América, p: 305-338.

- Brown W., George M. y Wilson A.C. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA and human evolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:1967-1971.
- Brown G.G. y Simpson M.V. 1982. Novel features of animal mtDNA evolution as shown by sequences of two cytochrome oxidase subunit II genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:3246-3250.
- Cann R.L. y Wilson A.C. 1983. Length mutations in human mitochondrial DNA, *Genetics*, 106: 479-499.
- Cann R.L., Brown W.M. y Wilson A.C. 1984. Polymorphic sites and the mechanism of evolution in human mitochondrial DNA, *Genetics*, 106:479-499.
- Cann R.L., Brown W.M. y Wilson A.C. 1987. Mitochondrial DNA and human evolution, *Nature*, 325:31-36.
- Cavalli-Sforza L.C., Piazza A., Menozzi P y Mountain J. 1988. Reconstruction of human evolution: Bringing together genetics, archaeological and linguistic data, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:6002-6006.
- Censos Nacionales de Población y Vivienda. 1990. Contraloría General de la República, Dirección de Estadística y Censo, p: 249-254.
- Constenla U.A. 1981. "Comparative chibchan phonology". Tesis doctoral. Universidad de Pensilvania.
- Constenla U.A. 1984. El huetar. Observaciones sobre los materiales disponibles para su estudio y sobre las hipótesis en torno a sus afinidades lingüísticas. *Rev. de Filo. y Lingüf.*, 10(2): 3-18.
- Constenla U.A. 1985. Las lenguas dorasque y chánguena y sus relaciones genealógicas. *Rev. de Filo. y Lingüf.*, 11 (2):81-92.
- Constenla U.A. 1991. Las Lenguas del Area Intermedia: Introducción a su Estudio Areal (Editorial de la Universidad de Costa Rica, San José), p: 34-51.
- Cooke R. 1986. "La arqueología del Panamá precolombino y su importancia para los estudios de los pueblos de habla chibcha", p: 81-95. In: Barrantes, R., Bozzoli M.E. y Gudiño P. (compiladores). *Memorias del Primer Simposio Científico sobre Pueblos Indígenas de Costa Rica*, Instituto Geográfico de Costa Rica, San José.

- Cooke G. R. y Ranere A.J. 1992. The origin of wealth and hierarchy in the central region of Panamá (12000-2000 BP), with observations on its relevance to the history and phylogeny of chibchan-speaking polities in Panamá and elsewhere, p: 243-315. In F.W. Lange (ed.). *Wealth and hierarchy in the intermediate area*, Dumbarton Oaks research library and collection, Washington, D.C.
- Costello R.W. 1983. Congreso politics in an urban setting: A study of cuna political process, p: 91-100. In Bort J.R. y Helms M. (ed.). *Local reactions to development policies*, Dpto de Anthropology University of Missouri, Columbia.
- Dillehay T.D. y Collins M.B. 1988. Early cultural evidence from Monte Verde in Chile, *Nature*, 332:150-152.
- Excoffier L., Smouse P.E. y Quattro J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data, *Genetics*, 131:479-491.
- Excoffier L. y Langaney A. 1989. Origin and differentiation of human mitochondrial DNA, *Am. J. Hum. Gen.*, 44: 73-85.
- Giles R.E., Blanc H., Cann H.M. y Wallace D.C. 1980. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:6715-6719.
- Gray M. W. 1989. Origin and evolution of mitochondrial DNA. *Ann. Rev. Cell Biol.*, 5:25-50.
- Greenberg J.H., Turner II C.H. y Zegura S.L. 1986. The settlement of the Americas: A comparison of the linguistic, dental, and genetic evidence, *Current Anthropology*, 27(5):477-497.
- Greenberg J.H. 1987. *Language in the Americas*. Stanford University Press, p:379-387.
- Guidon, N. y G. Delibrias. 1986. Carbon-14 dates point to man in the Americas 32000 years ago, *Nature*, 321:769-771.
- Ginther C., Corach D., Penacino G.A., Rey J.A., Carnese F.R., Hutz M.H., Anderson A., Just J., Salzano M.F. y King M.C. 1993. Genetic variation among the mapuche indians from the patagonian region of Argentina: mitochondrial DNA sequence variation and allele frequencies of several nuclear genes, p: 211-219. In Pena S.D.J. Chakraborty R., Epplen J.T. y Jeffreys A.J.

- (ed.). DNA fingerprinting: State of the science. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland.
- Harpending H.C., Sherry S.T., Rogers A.L. y Stoneking M. 1993. The genetic structure of ancient human populations, *current anthropology*, 34(4):483-496.
- Herzberg M., Mickelson K.N.P., Serjeantson S.W., Prior J.F. y Trent R.J. 1989. An Asian-specific 9-base pair deletion of mitochondrial DNA is frequently found in Polynesians, *Am. J. Hum. Genet.*, 44:504-510.
- Higuchi R. G. y H. Ochman. 1989. Production of single stranded DNA templates by exonucleasa digestion following polymerasa chain reaction, *Nuclei Acids*, 17: 5865.
- Horai S. y Matsunaga E. 1986. Mitochondrial DNA polymorphism in Japanese. II. Analysis with restriction enzymes of four of five base pair recognition, *Hum. Gen.*, 72:105-117.
- Horai S. y Hayasaka K. 1990. Intraespecific nucleotide sequence differences in the major noncoding region of human mtDNA, *Am. J. Hum. Gen.*, 46:828-842.
- Horai S., Kondo R., Nakagawa-Hattori Y., Hayashi S., Sonoda S. y Tajima K. 1993. Peopling of the Americas, founded by four major lineages of mitochondrial DNA, *Mol. Biol. Evol.*, 10 (1): 23-47.
- Howe, J. 1974. Village Political Organization among the San Blas cuna. Dissertation doctoral. University of Pennsylvania.
- Howe, J. 1986. The cuna gathering: Contemporary village politics in Panama. Latin American Monographs, No.67. University of Texas Press, Austin.
- Howe, J. 1978. Algunos problemas no resueltos de la etnohistoria del este de Panamá. *Revista Panameña de Antropología* 2:30-47.
- Hrdlicka A. 1926. The indians of Panama. Their phisical relation of the Mayas, *Am. J. Phys. Anthropol.*, 9:1-15.
- Kolman C.J., R. Ward, T. Arias y E. Bermingham. Strikingly low Genetic Diversity exhibited by the Ngöbe amerinds of Panamá, en prensa.
- Kunkel T.A. y Loeb E.A. 1981. Fidelity of mammalian DNA polymerases, *Science*, 213:765-767.

- Marjoram P. y Donnelly P. 1994. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in subdivided populations and implications for early human evolution, *Genetics*, 136:673-683.
- Matson, G. A., y Swanson J. 1965a. Distribution of hereditary bloods antigens among Indians in middle America. In Costa Rica. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 23:107-122.
- Matson, G.A., y Swanson J. 1965b. Distribution of hereditary bloods antigens among indians in middle America. In Panama, *Am. J. Phys. Anthropol.*, 23:413-426.
- Matson A.G., Sutton H.E., Swanson J. y Robinson A.R. 1965. Distribution of haptoglobin, transferrin and hemoglobin types among indians of middle América, *Am. J. Phys. Anthropol.*, 23:123-130.
- Meltzer, D.J. 1993. Pleistocene peopling of the Americas, *Evolutionary Anthropology*, 1(6):157-169.
- Merriwether D.A. (1993) Mitochondrial DNA variation in South American indians, Ph.D. dissertation, Univ. of Pittsburgh.
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G. y Erlich H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polimerasa chain reaction, *Cold Spring Harbor Symp., Quant.Biol.*, 51: 263-273.
- Mullis K.B. y Faloona F.A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polimerasa-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.*, 155:335-350.
- Neel J.V., Tanis R.J., Migliazza E.C., Spielman, R.S., Salzano F.M., Oliver W.J. y Morrow M. 1977. Genetic studies of the Macushi and Wapishana Indians. I. Rare genetic variants and a "private Polymorphism" of esterasa, *A. Hum. Gen.*, 36:81-107.
- Neel J.V. 1980. "Isolates and private polymorphisms", p:173-193. In A.W. Eriksson (Ed.). Population structure and genetic disorders. Academic press: London.
- Nei, M. y Roychoudhury, A.K. 1974. Sampling variance of heterozygosity and genetic distance, *Genetics*, 76:379-390.
- Nei, M. y Tajima, F. 1981. DNA Polymorphism detectable by restriction endonucleases, *Genetics*, 97:145-163.

- Nei M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*, Columbia University Press, New York.
- Nelson D.E., Morlan R.E., Southon J.R. y Harrington C.R. 1986. New dates on northern Yukon artifacts: Holocene not upper pleistocene, *Science*, 232:749-751.
- Newson, L. 1986. *In the cost of conquest: indian decline in Honduras under spanish rule* (Westview Press, Boulder).
- Raymond J.M. y Lawrence A.L. 1985. Nucleotide sequence preservation of human mitochondrial DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:2895-2899.
- Rienzo A. y Wilson C.A. 1991. Branching pattern in the evolutionary tree for human mitochondrial DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:1597-1601.
- Rogers A. R. y Harpending H.C. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences, *Mol. Biol. Evol.* 9(3):552-569.
- Romoli K. 1987. *Los de la lengua cueva*, ediciones Tercer Mundo, Colombia.
- Saiki, R.D. 1990. Amplification of Genomic DNA. PCR Protocols, p: 13-20. In Michael A. I., David H. G., Sninsky J.J. y White T.J. *A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, Inc., p:13-20.
- Santos M. 1992. Análisis de la variación genética del ADNmt y nuclear de una población amerindia huetar, tesis de maestría, Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica, San José.
- Santos M., Ward R.H. y Barrantes R. 1994. mtDNA variation in the chibcha amerindian huetar from Costa Rica, *Human Biology*, 66(6):963-977.
- Schurr T.G., Ballinger S.W., Gan Y.Y., Hodge J.A., Merriwether D.A., Lawrence D.N., Knowler W.K., Weiss K.M., y Wallace D.C. 1990. Amerindian mitochondrial DNAs have rare asian mutations at high frequencies, suggesting they derived from four primary maternal lineages, *Am. J. Hum. Genet.*, 46:613-623.
- Spielman R.S., Migliazza E.C., Neel V.J., Gershowitz H. y Torres R. 1979. The evolutionary relationships of two populations: A study of the guaymí and the Yanomama. *Current Anthropology*, 20(2):377-388.

- Stephen C., Ojala D., Posakony J., Nishiguchi J. y Attardi G. 1979. Nucleotide sequence of a region of human mitochondrial DNA containing the precisely identified origin of replication, *Nature*, 277:192-198.
- Stier F.R. 1979. The effect of demographic change on agriculture en San Blas, Ph. D. Dissertation, University Microfilms, Ann Arbor.
- Stoneking M., Hedgecock D., Higuchi G. R., Vigilant L. y Henry A. E. 1991. Population variation of human mtDNA control region sequences detected by enzymatic amplification and sequence specific oligonucleotide probes, *Am. J. Hum. Genet.*, 48:370-382.
- Stout, D. 1947. San Blas cuna acculturation: An introduction. Viking fund publication in anthropology N° 9. New York.
- Summers K.M. 1987. DNA polymorphisms in human population studies: a review, *Annals of Human Biology.*, 14(3):203-217.
- Swadesh M. 1955. Towards greater accuracy in lexicostatistic dating, *J. Am. Linguistics*, 21:121-137.
- Szathmary E.J.E. 1993. Genetical of aboriginal North Americans, *Evolutionary Anthropology*, 1(6):202-220.
- Tanis R.J., Neel J.V. y Torres de Araúz R. 1977. Two more "private" polymorphisms of Amerindian tribes: LDH GUA-I and ACP B GUA-1 in the Guaymi of Panama, *Am. J. Hum. Genet.*, 29: 419-430.
- Tenorio L.A. 1988. Reservas indígenas de Costa Rica. San José: Imprenta Nacional.
- Torres de Araúz R. 1981. Panamá Indígena, impresora de la Nación, INAC, Panamá.
- Torrioni A., Schurr T.G., Yang C.C., Szathmary E.J.E., Williams R.C., Schanfield M.S., Troup G.A., Knowler W.C., Lawrence D.N., Weiss K.M., y Wallace D.C. 1992. Native American mitochondrial DNA analysis indicates that the Amerind and the Nadene populations were founded by two independent migrations, *Genetics*, 130:153-162.
- Torrioni A., Schurr T.G., Cabell F.M., Brown M.D., Neel V.J., Larsen M., Smith D.G., Vullo C.M. y Wallace D.C. 1993a. Asian affinities and continental radiation of the four founding Native American mtDNAs, *Am. J. Hum. Genet.*, 53:563-590.

- Torrioni A., Sukernik R.I., Schurr T.G., Starikovskaya Y.B., Cabell M.F., Crawford M.H., Comuzzie A.G. y Wallace D.C. 1993b. mtDNA variation of aboriginal Siberians reveals distinct genetic affinities with Native Americans, *Am. J. Hum. Genet.*, 53:591-608.
- Torrioni, A., Neel J.V., Barrantes R., Schurr T.G. y Wallace D.C. 1994. A mitochondrial DNA "clock" for the amerindian and its implications for timing their entry into north América, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:1158-1162.
- Vigilant L.R., Pennington H., Harpending T.D. Kocher T.D. y Wilson A.C. 1989. Mitochondrial DNA secuencias in single hairs from a southern African populations, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA 86:9350-9354.
- Wallace, D.C., K. Garrison, y W.C. Knowler. 1985. Dramatic founder effects in amerindian mitochondrial DNAs, *Am. J. Phys. Anthropol.*, 68:149- 155.
- Wallace, D.C., y A. Torrioni. 1992. American indian prehistory as written in the mitochondrial DNA: A review, *Human Biology.*, Vol. 64(3):403-416.
- Wali Alaka. 1983. The Bayano corporation and social change: The regional consequences of macrodevelopment, p: 103-127. In Bort J.R. y Helms M. (ed.). Local reactions to development policies, Dpto. de Anthropology University of Missouri, Columbia.
- Ward R.H., L.B. Frazier, K. Dew-Jager, y S. Pääbo. 1991. Extensive mitochondrial diversity within a single amerindian tribe, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA 88:8720-8724.
- Ward R.H., Redd A., Valencia D., Barbara F. y Pääbo S. 1993. Genetic and linguistic diferentiation in the Americas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 90:10663-10667.
- Watterson, G.A. 1975. On the number of segregating sites ingenetical models without recombination, *Theor. Popul. Biol.*, 7:256-276.
- Wrischnik L.A., Russell H.G., Stoneking M., Erlich H.A., Arnheim N. y Wilson A.C. 1987. Length mutations in human mitochondrial DNA: direct sequencing of enzymatically amplified DNA, *Nucleic Acids Research*, 15(2): 529-541.
- Young P. D. 1970. Notes on the ethnohistorical evidence for structural continuity in guaymí society, *Ethnohistory*, 17:11-29.