

ARTÍCULO ORIGINAL

Diversidad del ADN mitocondrial en restos óseos prehispánicos asociados al Templo del Sol en los Andes orientales colombianos

Andrea Casas-Vargas¹, Liza M. Romero¹, William Usaquén¹, Sara Zea¹, Margarita Silva², Ignacio Briceño^{3,4}, Alberto Gómez³, José Vicente Rodríguez⁵

¹ Grupo de Genética de Poblaciones e Identificación, Instituto de Genética, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

² Museo Parque Arqueológico de Sogamoso, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Sogamoso, Colombia

³ Instituto de Genética Humana, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia

⁴ Facultad de Medicina, Universidad de La Sabana, Chía, Colombia

⁵ Laboratorio de Antropología Física, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. El ADN antiguo que se extrae de los restos óseos humanos permite analizar la composición genética de las poblaciones precolombinas y determinar las dinámicas poblacionales que dieron origen a la diversidad de las poblaciones contemporáneas.

Objetivo. Determinar la diversidad genética y la relación con otras comunidades contemporáneas y antiguas de América, de los restos óseos asociados al Templo del Sol en Sogamoso, Colombia.

Materiales y métodos. Se analizaron 13 individuos pertenecientes al periodo precolombino muisca (siglos IX-XVI d. C.), provenientes de los alrededores del Templo del Sol en Sogamoso, Boyacá, Andes orientales colombianos. Se amplificó el ADN mitocondrial (ADNmt) y se determinaron los polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, RFLP) para los cuatro haplogrupos amerindios (A, B, C y D). Además, se amplificaron y analizaron los marcadores autosómicos, incluida la amelogenina, y los marcadores de los polimorfismos de repeticiones cortas en tándem (*Short Tandem Repeat*, STR) del cromosoma Y.

Resultados. El haplogrupo A fue el linaje mitocondrial más frecuente en esta población, seguido de los haplogrupos B y C; no se detectó el haplogrupo D. Los análisis de variación genética indicaron una diversidad semejante a la de las poblaciones pertenecientes a la familia lingüística chibcha, contemporánea en Colombia y Centroamérica. Se logró hacer la determinación molecular del sexo de los individuos estudiados y compararla con los datos osteológicos. Con una sola excepción, los datos bioantropológicos y moleculares concordaron.

Conclusiones. Estos resultados aportan nuevos elementos a la hipótesis del origen centroamericano de los grupos chibchas del altiplano cundiboyacense con base en marcadores genéticos, y permitieron establecer el sexo y las relaciones de parentesco.

Palabras clave: ADN; ADN mitocondrial; amelogenina; cromosoma Y; Colombia.

doi: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3377>

Mitochondrial DNA diversity in prehispanic bone remains on the eastern Colombian Andes

Introduction: DNA extracted from ancient human bones allows to analyze the genetic makeup of pre-Columbian populations and to determine the dynamics that gave rise to the diversity of contemporary populations.

Objective: To determine the genetic diversity of skeletal remains associated with the *Templo del Sol* (Sun Temple) and their relationship with other contemporary and ancient communities of America.

Materials and methods: We analyzed 13 individuals belonging to the pre-Columbian Muisca Period (IX-XVI centuries AD) from the vicinities of the *Templo del Sol* (Sun Temple) (Sogamoso, Boyacá) in

Contribución de los autores:

Andrea Casas-Vargas: obtención de las muestras, análisis estadístico y análisis de resultados

Liza Romero: extracción de ADN y análisis molecular

William Usaquén: obtención de las muestras, análisis de datos y discusión

Sara Zea: cálculos estadísticos de paternidad

Margarita Silva: obtención de las muestras

Ignacio Briceño: análisis de resultados y discusión

Alberto Gómez y José Vicente Rodríguez: diseño y supervisión del estudio, contextualización bioantropológica y arqueológica, análisis de datos y discusión

Todos los autores participaron en la escritura del manuscrito.

the eastern Colombian Andes. Mitochondrial DNA was amplified and RFLPs were performed in order to type the four traditional Amerindian haplogroups (A, B, C and D). In addition, autosomal markers including amelogenin and Y-chromosome STRs were amplified.

Results: Among the observed mitochondrial lineages, haplogroup A was the most frequent, followed by haplogroups B and C; no evidence of haplogroup D was found. The genetic variation analysis indicated a similar diversity of pre-Columbian

Muiscas to that of contemporary populations belonging to the Chibcha linguistic family from Colombia and Central America. Molecular sexing was accomplished and it was compared to osteological data. With only one exception, anthropological and molecular data were consistent.

Conclusions: Our results contribute new genetic elements supporting the hypothesis of Central American origin of the Chibcha groups of the Cundiboyacense plateau, and allowed sex typing and kinship evaluations.

Key words: DNA; DNA, mitochondrial; amelogenin; Y chromosome; Colombia.

doi: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3377>

El estudio de la dinámica del poblamiento americano ha sido de gran interés para los investigadores por su utilidad para establecer las rutas de entrada al continente. La mayoría de los estudios genéticos se han basado principalmente en marcadores uniparentales, como el ADN mitocondrial (ADNmt) (1-3). Los genes mitocondriales se heredan exclusivamente por línea materna, y se asume que la recombinación es nula; además, son muy polimorfos, con una tasa de mutación más alta que la del ADN nuclear, lo cual resulta en una mayor resolución en escalas amplias de tiempo (4,5). Estas características permiten evaluar la relación genética entre individuos y poblaciones diferentes.

En las poblaciones nativas americanas se han descrito cinco haplogrupos mitocondriales principales: A, B, C, D y X, este último circunscrito únicamente a Norteamérica. Estos linajes se caracterizan por una o más sustituciones exclusivas que los distinguen de otros haplogrupos en el mundo (6). Asimismo, los marcadores mitocondriales han permitido hacer inferencias sobre el origen y el tiempo de divergencia de la población ancestral, y establecer la presentación de eventos particulares, tales como cuellos de botella, efectos fundadores o deriva génica (7,8).

En estudios previos, los haplogrupos de ADNmt se caracterizaron mediante las enzimas de restricción, de la siguiente manera: el haplogrupo A presenta la particularidad de un sitio de restricción de la enzima *HaeIII* en la posición 663; el haplogrupo B,

la delección de 9 pb en *COII/tARNIlys*; el haplogrupo C, la pérdida del sitio de *HincII* en la posición 13.259 pb, y el haplogrupo D se caracteriza por la pérdida del sitio de restricción *AluI* en la posición 5.176 (9-12).

La mayoría de los estudios poblacionales de América se han realizado en comunidades contemporáneas. Sin embargo, los estudios en poblaciones precolombinas se han incrementado en el continente y han permitido conocer los diferentes procesos locales y regionales de microevolución mediante el uso de los métodos paleogenéticos (2,13,14).

A pesar de que Colombia presenta una gran diversidad de evidencias arqueológicas, los estudios sobre la diversidad genética de las comunidades prehispánicas son muy escasos. Una de las zonas que ha permitido evidenciar los primeros asentamientos humanos en Colombia corresponde a los Andes orientales, específicamente el altiplano cundiboyacense, donde se han planteado diferentes hipótesis de poblamiento.

Varios investigadores concuerdan en que los diferentes periodos en que las poblaciones humanas ocuparon esta cordillera en tiempos precolombinos, son tres: precerámico (hasta el segundo milenio a. C.); formativo o Herrera (primer milenio a. C. a siglo VIII d.C.), y muisca o de comunidades pertenecientes a la familia lingüística chibcha (siglos IX-XVI d.C.). Estos periodos de poblamiento, según algunos autores, tienen orígenes diferentes producto de varias oleadas migratorias y de procesos estocásticos y adaptativos durante los cuales se desplazaron o absorbieron los grupos antecesores (15,16). Por el contrario, en los estudios bioantropológicos se ha sugerido que la población de esta región se remonta al periodo precerámico y que, posiblemente, hubo continuidad de linajes a partir de este tiempo hasta el periodo muisca, y se

Correspondencia:

Andrea Casas-Vargas, Grupo de Genética de Poblaciones e Identificación, Instituto de Genética, Universidad Nacional de Colombia, Carrera 30 N° 45-03, edificio 426, oficina 101, Bogotá, D.C., Colombia

Teléfono: (571) 316 5000, extensión 11635

lacasasv@unal.edu.co

Recibido: 29/07/16; aceptado: 01/03/17

ha evidenciado que no se presentaron procesos migratorios masivos tardíos de pueblos foráneos, sino procesos de microevolución (17).

En el Museo Arqueológico de Sogamoso se encuentra una de las más grandes colecciones de restos óseos precolombinos provenientes de varios sitios de Boyacá, excavados en el transcurso de 50 años de investigaciones del profesor Eliécer Silva Celis. En esta colección, se encontraron individuos provenientes del municipio de Floresta con características morfológicas de paleoamericanos (dolicocefalos) y con procesos de mineralización que evidencian una gran antigüedad y han sido datados en 7.950 ± 40 antes del presente (AP), tiempo calibrado entre 7.040 y 6.680 a. C. (beta-299693) (17).

En los restos provenientes del Templo del Sol de Sogamoso se han obtenido dos dataciones: la primera, de 310 años d. C., proveniente de maíz carbonizado asociado a los enterramientos, y la segunda, de hueso humano datado en 190 ± 40 años d. C. (calibrada entre 155 y 390) (beta-129230), es decir, 1.826 ± 40 AP, lo cual sugiere que el poblamiento de la zona en la que se halló esta estructura ritual presenta actividad humana por lo menos desde el periodo formativo (18).

En la última década, se han empleado herramientas genéticas que permiten inferir los procesos evolutivos en el tiempo real en el que sucedieron, tales como los estudios en ADN antiguo (ADNa). En Colombia, se han hecho varios estudios con ADN mitocondrial (ADNmt) de restos precolombinos de varios grupos étnicos de periodos arqueológicos diferentes (precerámico; formativo o Herrera; muisca o chibcha) y, principalmente, los correspondientes al periodo chibcha (guane, muisca, lache, chitarero). Al comparar los datos genéticos de los tres periodos arqueológicos, se ha evidenciado una continuidad genética en estas poblaciones de la Cordillera Oriental (19-22).

El propósito del presente estudio fue analizar genéticamente muestras provenientes de los alrededores del Templo del Sol en Sogamoso, el cual hacía parte de uno de los principales centros religiosos muisca pertenecientes a la confederación del Sugamuxi (figura 1) (16,17). En el estudio, se analizaron 13 muestras de restos óseos antiguos encontrados en los alrededores de dicho templo, con el fin de determinar su diversidad genética y su relación con otras comunidades colombianas, así como su posible origen poblacional.

Materiales y métodos

Muestras

La colección del profesor Eliécer Silva del Museo Arqueológico de Sogamoso incluye una amplia muestra ósea proveniente de varias regiones de Boyacá. A pesar de no contar con un contexto funerario sistemático de estos restos, en estudios previos se han reportado análisis bioantropológicos de la colección orientados a establecer su variabilidad biológica y las prácticas funerarias asociadas (18), en los cuales se pudo determinar el sexo y la edad de cada individuo, empleando los estándares internacionales (18).

De esta colección se seleccionaron 13 individuos adultos, de los cuales se obtuvieron muestras de dientes y huesos largos. Los individuos, cuyos restos se excavaron en la vereda de Monquirá, en los alrededores del Templo del Sol, se clasificaron según el periodo arqueológico al que pertenecían (cuadro 1), es decir, el periodo muisca, con base en el material cerámico asociado característico de este periodo.

Precauciones para evitar la contaminación

Para garantizar la fidelidad de los resultados, se adoptaron los criterios recomendados para los análisis en ADN antiguo (ADNa) por Cooper, *et al.*, y por Gilbert, *et al.* (23,24), para evitar la contaminación.



Figura 1. Mapa de Colombia con la localización del territorio ocupado por la comunidad muisca en el tiempo de la conquista española

Cuadro 1. Descripción de los individuos analizados

Individuo	Cementerio arqueológico	Edad antropológica (años)	Sexo antropológico	Biotipo	Cronología
SM27	MAS*	Adulto (40-50)	Femenino	Braquicéfalo	Siglos IX-XVI d. C.
SM30	MAS*	Adulto (40-50)	Femenino	Braquicéfalo	Siglos IX-XVI d. C.
SM31	MAS*	Adulto (40-50)	Femenino	Braquicéfalo	Siglos IX-XVI d. C.
SM39	MAS*	Adulto (30-40)	Femenino	Braquicéfalo	Siglos IX-XVI d. C.
SM43	MAS*	Desconocida	Femenino	Braquicéfalo	Siglos IX-XVI d. C.
SM44	MAS*	Adulto (40-50)	Femenino	Braquicéfalo	Siglos IX-XVI d. C.
SM47	MAS*	Adulto (40-50)	Femenino	Braquicéfalo	Siglos IX-XVI d. C.
SM50	MAS*	Adulto (40-50)	Femenino	Braquicéfalo	Siglos IX-XVI d. C.
SM61	MAS*	Desconocida	Femenino	Braquicéfalo	Siglos IX-XVI d. C.
SM67	MAS*	Adulto (30-40)	Femenino	Braquicéfalo	Siglos IX-XVI d. C.
SM68	MAS*	Adulto (50-60)	Femenino	Braquicéfalo	Siglos IX-XVI d. C.
SM104	MAS*	Desconocida	Masculino	Braquicéfalo	Siglos IX-XVI d. C.
SM109	MAS*	Adulto (40-50)	Masculino	Braquicéfalo	Siglos IX-XVI d. C.

* MAS: Museo Arqueológico de Sogamoso, Templo del Sol

La extracción y la amplificación del ADN de los huesos se hicieron en un laboratorio exclusivo para dicho análisis en el Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, donde se dispone de áreas separadas para la extracción y la amplificación del ADN.

Antes de usar cada área, se hacía una limpieza con hipoclorito de sodio al 5 % y se irradiaba con luz ultravioleta durante toda la noche, en tanto que las cabinas de flujo se irradiaban durante una hora antes de su uso. El material (pipetas, material de plástico, anaqueles, guantes, batas, tapabocas y gorros) se irradiaba con luz ultravioleta durante una hora. El personal que realizaba el procedimiento de extracción empleaba traje especial desechable (tipo Tivek®), con el fin de cubrir todas las partes del cuerpo y evitar la contaminación.

Para detectar la posible contaminación con ADN moderno, se realizaban controles negativos en cada proceso (extracción, amplificación). Además, se hicieron múltiples extracciones y amplificaciones, con el fin de confirmar cada resultado. Asimismo, los investigadores involucrados en los procesos fueron tipificados.

Aislamiento y cuantificación del ADN

La descontaminación de las muestras esqueléticas se hizo removiendo completamente la capa externa del hueso con un 'mototool' DREMEL® sobre una superficie estéril, procedimiento que no es necesario en las piezas dentales. Posteriormente, las muestras se lavaron con hipoclorito al 5 % durante 10 minutos y con etanol al 70 % durante 5 minutos; por último, se expusieron a luz ultravioleta por cada uno de los lados durante 15 minutos. A continuación,

se obtuvieron en promedio dos gramos de material pulverizado de hueso o diente, dependiendo del caso, usando un molino MN400 de Restsh®.

Aproximadamente, un gramo del material pulverizado se incubó a 56 °C durante 18 horas en una solución de 15 ml que contenía EDTA 0,5 M, N-Lauroilsarcosina al 1 %, y proteinasa-K (20 mg/ml). Posteriormente, se procedió extraer el ADN empleando el estuche comercial Qiaquick PCR Purification® (Qiagen), según las recomendaciones del fabricante y las modificaciones introducidas por la *International Commission on Missing Persons*, ICMP (25,26).

Este proceso se repitió dos veces con algunas de las muestras escogidas al azar y en momentos separados, para confirmar los resultados. Los aislamientos de ADN obtenidos se cuantificaron empleando el fluorómetro Qubit 2.0® de Invitrogen, según las recomendaciones del fabricante.

Análisis de haplogrupos de ADNmt mediante PCR-RFLP

Las muestras se amplificaron mediante PCR para cuatro fragmentos de tamaños entre los 102 y 182 pb (cuadro 2). En la amplificación se utilizó la mezcla maestra GoTaqHot Start® de ADN polimerasa (Qiagen) 2X, 1X de potenciador (Epicentre), 100 µg de albúmina de suero bovino (BSA, Roche), y 0,8 µM de cada cebador.

El programa de PCR utilizado incluyó una desnaturación inicial a 94 °C durante 15 minutos, 50 ciclos a 94 °C durante 45 segundos, y un anillamiento de 45 segundos a una temperatura entre 55 y 58 °C según los iniciadores utilizados (cuadro 2) (11,12,27); además, una extensión a 72 °C durante 45 segundos, y otra final a 72 °C durante 3 minutos.

Cuadro 2. Cebadores o iniciadores para la extracción de ADN mitocondrial

Marcador o región blanco	Secuencia	Temperatura de anillamiento	Referencia
mtDNA haplogrupo A (+ <i>HaeIII</i> 663)	606–626/ACACTGAAAATGTTTAGACGG 689–708/GGGGATGCTTGCATGTGTAA	55 °C	(11)
mtDNA haplogrupo B (delección 9 pb)	8.196-8.214/ACAGTTTCATGCCCATCGTC 8.316-8.297/ ATGCTAAGTTAGCTTTACAG	54 °C	(27)
mtDNA haplogrupo C (+ <i>AluI</i> 13262)	13.237–13.256/ATCGTAGCCTTCTCCACTTC 13.397-13.419/TCCTCCTATTTTTCGAATATCTT	55 °C	(12)
mtDNA haplogrupo D (– <i>AluI</i> 5176)	5.101-5.120/TAACTACTACCGCATTCTTA 5.149-5.129/ AAAGCCGGTTAGCGGGGGCA	55 °C	(27)

Los productos amplificados se analizaron mediante la digestión de enzimas de restricción. Para establecer el haplogrupo A, se empleó la enzima de restricción *HaeIII*, cuyo sitio de restricción se localiza en la posición 663; el haplogrupo B presenta la delección de 9 pb en COII/tARNlys; el haplogrupo C, la pérdida del sitio de *HincII* en la posición de 13.259 pb, y el haplogrupo D se caracteriza por la pérdida del sitio de restricción *AluI* en la posición 5.176 (9-12). Los productos de las digestiones se analizaron en geles de agarosa al 2 %. La delección de 9 pb, característica del haplogrupo B, se evidenció en gel de poliacrilamida.

Amplificación del ADN para marcadores autosómicos y amelogénina

La amplificación se hizo con el estuche comercial multiplex AmpFiSTR SEfiler™ (Applied-Biosystems), el cual cuenta con 11 marcadores de STR autosómicos (D2S1338, D3S1358, D8S1179, D16S539, D18S51, D19S433, D21S11, FGA, SE33, TH01, vWA) y el marcador sexual amelogénina.

En un volumen final de 25 µl, se mezclaron los siguientes componentes: mezcla de reacción para PCR (AmpFiSTR SEfiler™ mix: MgCl₂, dNTP, 10 µl de albúmina de suero bovino en solución tampón con azida de sodio al 0,05 %; set de iniciadores (hacia adelante e inversos), 5 µl; 0,5 µl de enzima de ADN polimerasa (Amplitaq Gold DNA Polimerase 5 U/µl™); 5 µl de ADN (1,0-2,5 ng/µl), y 4,5 µl de agua destilada desionizada. La PCR se llevó a cabo en un termociclador Thermal Cycler PCR System 2720® de Applied-Biosystems, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Análisis de filiación

Para establecer las relaciones de parentesco entre todos los individuos, se usaron los análisis estadísticos empleados por el programa Familias, versión 3.0 (28). Todos los cálculos se basaron en las frecuencias alélicas de la población de los Andes colombianos (29).

Amplificación del ADN para marcadores del cromosoma Y

El estuche AmpFiSTR Yfiler PCR Amplification® (Applied Biosystems) se usó para amplificar 17 loci de STR (DYS19, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS385ab, DYS437, DYS438, DYS439, DYS448, DYS456, DYS458, DYS635 y GATA H4). Las condiciones de amplificación se ajustaron a las instrucciones del fabricante.

Tipificación de los polimorfismos del ADN

Se utilizó un analizador genético ABI PRISM 310® (Applied-Biosystems) para la tipificación molecular, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se empleó el programa GeneMapper ID®, versión 3.2, el cual analiza el estándar de tamaño de control interno con el GeneScan-500 LIZ® en cada muestra y en la escalera alélica, para garantizar la precisión en cada inyección del capilar.

La asignación alélica se hizo por comparación de los fragmentos obtenidos en pares de bases para cada pico del alelo de las muestras analizadas, con los picos de la escalera alélica provista por la casa comercial Applied-Biosystems para los estuches AmpFiSTR SEfiler® y AmpFiSTR1 Y-filer™ Yfiler® (Applied-Biosystems, Foster City, CA).

Análisis de datos

Con el fin de elucidar la relación biológica entre los individuos precolombinos muiscas y 43 comunidades nativas americanas contemporáneas, y comparar cuatro poblaciones precolombinas antiguas (3,19-22,27,30-47) (cuadro 3), se calculó la frecuencia de los haplogrupos por conteo directo.

La diversidad genética se calculó como $(n/(n-1))(1-\sum p_i^2)$, donde n es el tamaño de la muestra y p_i es la frecuencia del haplogrupo estimada para cada haplogrupo i (48).

Las distancias genéticas se estimaron con base en las frecuencias de cada haplogrupo del ADNmt,

calculando los datos del índice de fijación (F_{ST}) con el programa Arlequin® (49).

Los datos de las frecuencias de los haplogrupos de ADNmt de otras poblaciones americanas contemporáneas y actuales, se obtuvieron de las reportadas en otros trabajos (3,19 20,22,27,30-47) (cuadro 3).

Se compararon las poblaciones por medio del análisis de correspondencias múltiples y el escalamiento multidimensional basado en los datos del F_{ST} con el programa MVSP®, versión 3.1(50).

Resultados

ADN mitocondrial

Las 13 muestras pertenecientes al periodo muisca presentaron los siguientes haplogrupos: nueve individuos presentaron el sitio de restricción +HaeIII 643 y se clasificaron en el haplogrupo A; tres presentaron la delección de 9 pb en COII/tARN^{lys}, característica del haplogrupo B, y en una muestra se evidenció el sitio de restricción +AluI 13.262 correspondiente al haplogrupo C (34). Se encontró una elevada frecuencia del haplogrupo A (69 %),

Cuadro 3. Distribución de frecuencias de los haplogrupos de ADN mitocondrial en América ordenada de mayor a menor diversidad poblacional

Población ^a	n	A	B	C	D	Otro	h	Ranking h	Referencia
Chibcha ^{COL}	15	0,40	0,13	0,27	0,13	0,07	0,78095	1	(41)
Cubeo ^{COL}	24	0,33	0,08	0,29	0,25	0,04	0,76449	2	(41)
Páez 2 ^{COL}	36	0,28	0,08	0,28	0,33	0,03	0,74762	3	(41)
Mapuche ^{SA}	39	0,15	0,38	0,21	0,26	0,00	0,73954	4	(43)
Desano ^{COL}	20	0,15	0,15	0,45	0,25	0,00	0,72632	5	(41)
Curripaco ^{COL}	22	0,05	0,41	0,36	0,14	0,05	0,70996	6	(41)
Wayuu ^{COL}	30	0,27	0,27	0,43	0,00	0,03	0,69195	7	(31,38,40)
Guane ^{COL-ANT}	17	0,35	0,41	0,00	0,24	0,00	0,69118	8	(40)
Waunana ^{COL}	40	0,05	0,47	0,28	0,18	0,03	0,68205	9	(27)
Ingano ^{COL}	48	0,40	0,35	0,23	0,02	0,00	0,67908	10	(41)
Yungay ^{SA}	20	0,05	0,50	0,25	0,20	0,00	0,67895	11	(39)
Tule-Cuna ^{COL}	30	0,50	0,27	0,20	0,00	0,03	0,65977	12	(27,33)
Tucano ^{COL}	14	0,07	0,21	0,07	0,57	0,07	0,65934	13	(41)
Embera ^{COL}	21	0,10	0,52	0,29	0,10	0,00	0,65714	14	(41)
Antioquia ^{COL}	38	0,47	0,26	0,00	0,26	0,00	0,65434	15	(3)
Maya ^{CA}	27	0,53	0,23	0,16	0,08	0,00	0,65231	16	(33)
Embera ^{COL}	21	0,34	0,49	0,07	0,10	0,00	0,64737	17	(27)
Tatuyo ^{COL}	10	0,40	0,00	0,50	0,10	0,00	0,64444	18	(41)
Zenu ^{COL}	34	0,15	0,32	0,50	0,03	0,00	0,64171	19	(27)
Agroalfarero ^{COL-ANT}	24	0,54	0,25	0,17	0,04	0,00	0,64130	20	(19,20,22)
Puinave ^{COL}	61	0,08	0,51	0,33	0,07	0,02	0,63333	21	(41)
Quechua ^{SA}	23	0,09	0,57	0,30	0,04	0,00	0,60474	22	(44)
Yanomami ^{SA}	53	0,00	0,09	0,58	0,28	0,05	0,59259	23	(34)
Zoro ^{SA}	29	0,21	0,00	0,14	0,62	0,03	0,57143	24	(45)
Ciboney ^{CA}	15	0,07	0,00	0,60	0,33	0,00	0,56190	25	(36)
Cauca ^{COL}	60	0,19	0,08	0,63	0,08	0,02	0,56045	26	(3)
Páez 1 ^{COL}	31	0,58	0,06	0,36	0,00	0,00	0,55054	27	(27)
Guane-Butar ^{COL}	33	0,12	0,64	0,00	0,24	0,00	0,53788	28	(27,30)
Muisca ^{COL-ANT}	13	0,69	0,23	0,08	0,00	0,00	0,50000	29	PS
Boruca ^{CA}	14	0,21	0,72	0,00	0,07	0,00	0,47253	30	(34)
Huetar ^{CA}	27	0,70	0,04	0,00	0,26	0,00	0,45299	31	(46)
Ngöbe ^{CA}	46	0,67	0,33	0,00	0,00	0,00	0,44928	32	(35)
Guambiano ^{COL}	80	0,06	0,07	0,74	0,13	0,00	0,43639	33	(3,27,41)
Arsario ^{COL}	28	0,71	0,00	0,29	0,00	0,00	0,42328	34	(38)
Kuna ^{COL}	63	0,71	0,29	0,00	0,00	0,00	0,41475	35	(47)
Tainos ^{CA}	19	0,00	0,00	0,79	0,21	0,00	0,35088	36	(36)
Kogui ^{COL}	21	0,81	0,00	0,19	0,00	0,00	0,32381	37	(32,38)
Xavante ^{SA}	24	0,17	0,83	0,00	0,00	0,00	0,28986	38	(45)
Arhuaco ^{COL}	21	0,90	0,05	0,05	0,00	0,00	0,18571	39	(41)
Ijka ^{COL}	31	0,90	0,04	0,06	0,00	0,00	0,18495	40	(38)
Chimila ^{COL}	56	0,90	0,02	0,02	0,04	0,02	0,17441	41	(27,41)

^a Ubicación geográfica: (COL) Colombia; (COL-ANT) Colombia-Antiguas; (CA) Centroamérica; (SA) Suramérica
h: diversidad de haplogrupo

seguida por la del haplogrupo B (23 %), una baja frecuencia del haplogrupo C (8 %) y ausencia del haplogrupo D.

Los índices de diversidad genética (cuadro 3) revelaron que la diversidad del grupo de individuos muisca era mayor a la encontrada en 12 poblaciones de 41 grupos analizados integrados por más de 10 individuos. De estas, solo tres comunidades correspondían a reportes de grupos precolombinos con diversidades entre 0,5 y 0,69 (muisca, 0,5; agroalfarero, 0,64, y guane, 0,69).

Al construir un dendrograma UPGMA basado en las frecuencias de los haplogrupos de las diferentes poblaciones amerindias de Centroamérica, Suramérica y Colombia (figura 2), y analizar el total de poblaciones, incluidas las de Centroamérica y Suramérica, así como poblaciones colombianas contemporáneas y antiguas, se observó que los individuos muisca estudiados (Muis) se encontraban en un mismo agrupamiento con las poblaciones ngöbe y kuna de Centroamérica (figura 2). Al hacer este mismo análisis solo con las poblaciones colombianas, se observó un agrupamiento con las poblaciones ingano (Región Amazónica), agroalfarero (población precolombina de los Andes orientales) y tule-cuna (istmo de Panamá) (figura 3).

Se construyó, asimismo, una matriz de distancias a partir de datos del F_{ST} y se analizaron los componentes principales (PCA), observándose grupos conformados por los individuos del estudio (Muis), y por poblaciones arhuaco (Arh), agroalfarero (Agro), y embera-Antioquia (Ant) (figura 4). Otros grupos fuertemente relacionados, tanto genética como geográficamente, fueron los de la Sierra Nevada de Santa Marta (ijka, kogui, arsario).

Marcadores autosómicos y amelogenina

Se tipificaron los marcadores autosómicos de las 13 muestras de huesos analizadas con el estuche comercial multiplex AmpFiSTR SEfiler™ (Applied-Biosystems). Se obtuvo el perfil completo de dos muestras y siete perfiles parciales; en las seis restantes no se obtuvo amplificación debido al estado de degradación del ADN, lo cual es característico de las muestras antiguas (cuadro 4).

El análisis estadístico para establecer la relación de parentesco entre los individuos analizados, reveló que no estaban estrechamente emparentados. En efecto, al hacer la comparación entre las muestras, no se observaron perfiles genéticos relacionados, es decir, con algún grado de parentesco, y sí,

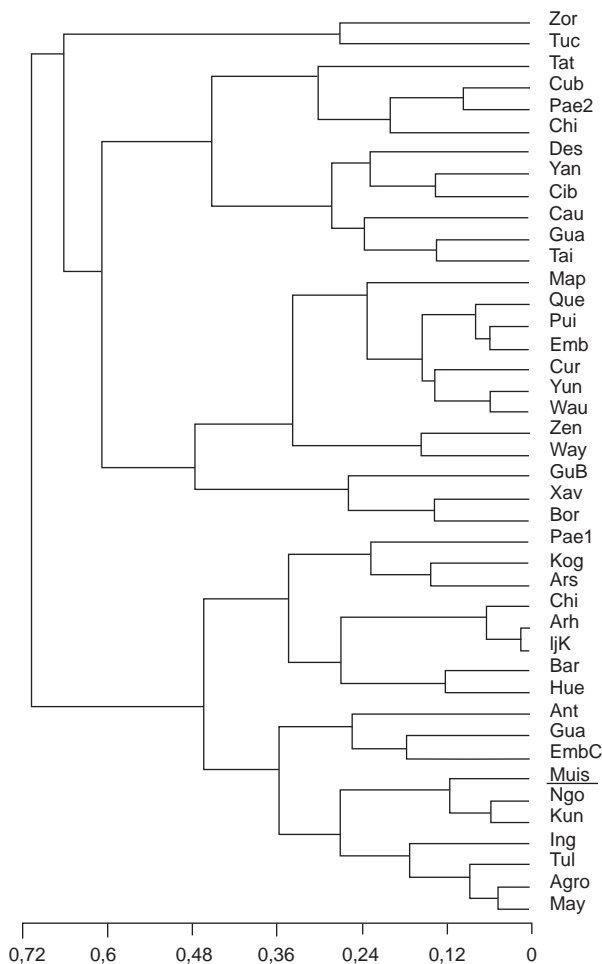


Figura 2. Dendrograma UPGMA basado en las frecuencias de haplogrupo de las diferentes poblaciones amerindias de Centroamérica, Suramérica y Colombia.

Los nombres clave de las abreviaturas están indicados en paréntesis: Chib (Chibcha), Cub (Cubeco), Pae2 (Páez 2), Map (Mapuche), Des (Desano), Cur (Curripaco), Way (Wayuu), Gua (Guane), Wau (Wauana), Ing (Ingano), Yun (Yungay), Tul (Tule-Cuna), Tuc (Tucano), Emb (Embera), Ant (Antioquia), May (Maya), Emb (Embera), Tat (Tatuyo), Zen (Zenu), Agro (Agroalfarero), Pui (Puinave), Que (Quecua), Yan (Yanomami), Zor (Zoro), Cib (Ciboney), Cau (Cauca), Pae1 (Páez 1), GuB (Guane-Butar), Muis (Muisca), Bor (Boruca), Hue (Huetar), Ngö (Ngöbe), Gua (Guambiano), Ars (Arsario), Kun (Kuna), Tai (Tainos), Kog (Kogui), Xav (Xavante), Arh (Arhuaco), IjK (Ijka), Chi (Chimila).

exclusiones en algunos sistemas, en tanto que en los análisis de razón de verosimilitud (*likelihood ratio*, LR) asumiendo las hipótesis de la probabilidad de filiación padre-hijo, madre-hijo y hermanos, no se obtuvieron datos significativos.

Mediante la determinación del sexo con el marcador de la amelogenina, se comparó la evidencia genética molecular con los datos arqueológicos según sus características morfológicas (cuadro 5).

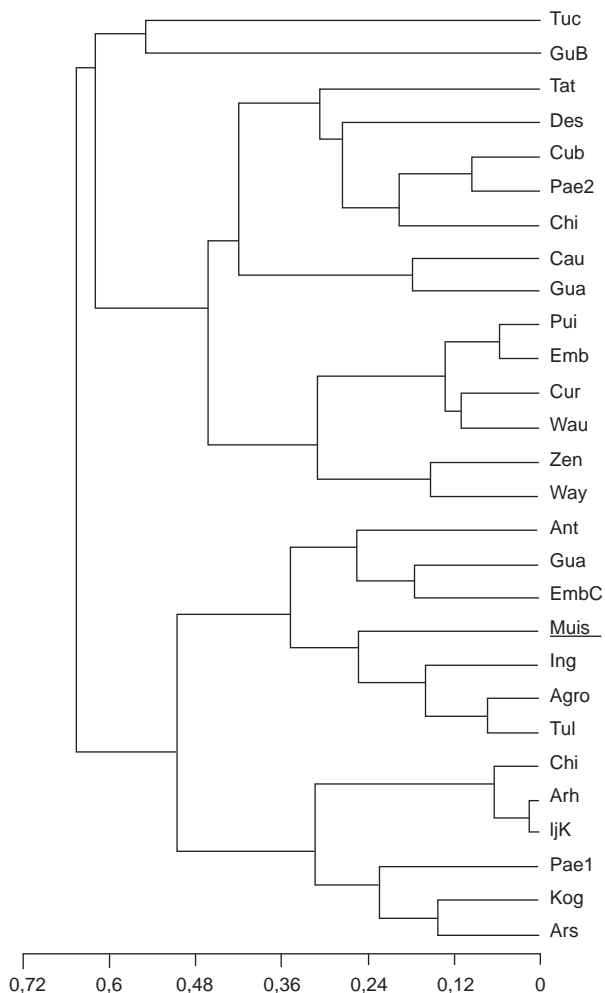


Figura 3. Dendrograma UPGMA basado en las frecuencias de haplogrupo de las diferentes poblaciones amerindias de Colombia. Los nombres claves de las abreviaciones están indicados en paréntesis: Chib (Chibcha), Cub (Cubeo), Pae2 (Páez2), Des (Desano), Cur (Curripaco), Way (Wayuu), Gua (Guane), Wau (Waunana), Ing (Ingano), Yun (Yungay), Tul (Tule-Cuna), Tuc (Tucano), Emb (Embera), Ant (Antioquia), Tat (Tatuyo), Zen (Zenu), Agro (Agroalfarero), Pui (Puinave), Cau (Cauca), Pae1 (Páez 1), GuB (Guane-Butar), Muis (Muisca), Gua (Guambiano), Ars (Arsario), Kog (Kogui), Xav (Xavante), Arh (Arhuaco), IjK (Ijka), Chi (Chimila).

Los datos genéticos y antropológicos concordaron, excepto en la muestra SM 68, identificada antropológicamente como “adulto femenino”, aunque se tipificó genéticamente en el presente trabajo como perteneciente al sexo masculino, es decir, XY (cuadro 5).

Cromosoma Y

En las cuatro muestras asignadas al sexo masculino mediante el marcador amelogenina, se pudieron amplificar los marcadores del cromosoma Y solo en dos de las muestras y con perfiles parciales.

Al comparar los perfiles, en seis casos no hubo concordancia. En consecuencia, se trataba de individuos no relacionados directamente en sus linajes paternos (cuadro 6).

Discusión

ADN mitocondrial

En este estudio se hicieron los análisis genéticos del ADNmt de restos óseos antiguos provenientes de los Andes orientales colombianos, específicamente del departamento de Boyacá, municipio de Sogamoso, donde se encuentra uno de los grandes cementerios muisca en los alrededores del Templo del Sol. Según dos dataciones obtenidas por radiocarbono, la ocupación de este territorio se habría iniciado durante el periodo Herrera o formativo. Infortunadamente, no existe una información más detallada de las excavaciones de la década de 1940 que permita diferenciar las ocupaciones de los periodos formativo y muisca (17,51,52).

Los resultados de este estudio constituyen información adicional sobre los haplogrupos de ADNmt de estos individuos precolombinos que complementan los estudios previos (19-22,40). El haplogrupo A presenta mayores frecuencias, entre 40 y 90 %, en Norteamérica y Centroamérica; asimismo, en Colombia se observa un gradiente en las frecuencias de este haplogrupo, con altas frecuencias en poblaciones del norte, como las de la Sierra Nevada de Santa Marta (70-90 %), en tanto que en el sur del país se presentan bajas frecuencias (7-10 %).

De las 13 muestras analizadas y clasificadas en el periodo muisca, se encontró una alta frecuencia del haplogrupo A (69 %), seguido por el haplogrupo B (23 %), con una baja frecuencia del haplogrupo C (8 %) y ausencia del haplogrupo D. El patrón de distribución de frecuencias de la población precolombina muisca de Sogamoso es muy similar al patrón encontrado en otros estudios en comunidades precolombinas pertenecientes al periodo muisca, en los cuales se ha reportado una alta frecuencia del haplogrupo A, seguido del B, y una baja frecuencia de los haplogrupos C y D (54, 25, 17 y 4 %, respectivamente). Otra población contemporánea similar es la tule-cuna, del occidente del país, en la que no se ha encontrada el haplogrupo D (cuadro 3).

Por otro lado, algunos investigadores han observado que las poblaciones de lengua chibcha presentan altas frecuencias del haplogrupo A, lo cual puede ser resultado de un flujo génico reciente; según

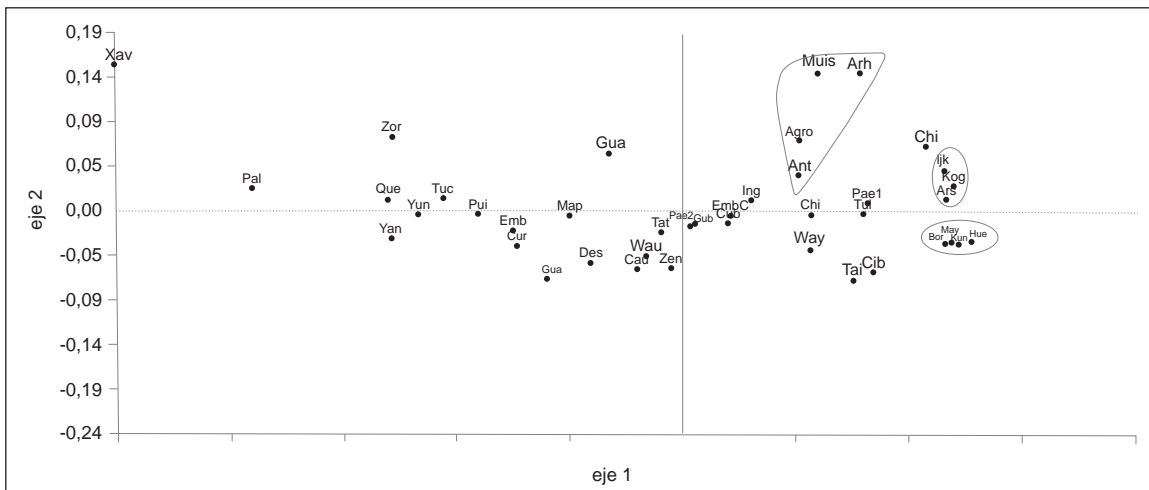


Figura 4. Análisis de los componentes principales (PCA) basado en datos del F_{ST} de poblaciones de Colombia, Centroamérica y Suramérica para haplogrupos de ADNmt.

Los nombres claves de las abreviaturas están indicados en paréntesis: Chib (Chibcha), Cub (Cubeo), Pae2 (Páez 2), Map (Mapuche), Des (Desano), Cur (Curripaco), Way (Wayuu), Gua (Guane), Wau (Waunana), Ing (Ingano), Yun (Yungay), Tul (Tule-Cuna), Tuc (Tucano), Emb (Embera), Ant (Antioquia), May (Maya), Emb (Embera), Tat (Tatuyo), Zen (Zenú), Agro (Agroalfarero), Pui (Puinave), Que (Quecua), Yan (Yanomami), Zor (Zoro), Cib (Ciboney), Cau (Cauca), Pae1 (Páez 1), GuB (Guane-Butar), Muis (Muisca), Bor (Boruca), Hue (Huetar), Ngö (Ngöbe), Gua (Guambiano), Ars (Arsario), Kun (Kuna), Tai (Tainos), Kog (Kogui), Xav (Xavante), Arh (Arhuaco), ljk (Ijka), Chi (Chimila).

Cuadro 4. Resultados y perfiles de amplificación de STR autosómicos empleando el estuche AmpFiSTR SEfiler™

Individuo	SM27	SM31	SM39	SM43	SM44	SM47	SM68	SM104	SM109
D3S1358	16/18	14/15	15/18	15/16	16	16	15	15	15/16
VWA	14/16	16/17	a	a	16/19	15	16	a	16
D16S539	10/12	12	a	5	11/12	a	a	a	11/12
D2S1338	17	22/23	a	a	22	a	a	a	18
Amelogenina	X	X	X	X	X	X	X/Y	X/Y	X/Y
D8S1179	14	12/13	13	a	11/14	13	13/14	12/13	13
SE33	19/28.2	19/29.2	a	a	a	a	a	a	14/17
D19S433	13/15	13.2/14	a	a	13/15	14/14.2	13.2/14	14/15	13/15
TH01	7/9	7	a	a	6/7	7/9	7	a	6/7
FGA	22/27	19/25	a	a	24/26	a	a	a	23/24
D21S11	31/31,2	30,2/32,2	a	a	28/33.2	30	30	a	28/32,2
D18S51	a	13/14	a	a	a	a	a	a	14/16

^a Ausencia de resultado

varios trabajos preliminares, la presencia de los haplogrupos B y C podría representar una oleada migratoria anterior (21,40,53).

En estudios previos se ha observado que las poblaciones contemporáneas colombianas muestran una gran frecuencia de los haplogrupos A y C y baja frecuencia del haplogrupo D, sobre todo en las poblaciones del norte de Colombia (27,38,41,42).

Cuando se analizaron los componentes principales a partir de los datos del F_{ST} se observó que en un mismo conjunto aparecían agrupadas las poblaciones arhuaco, agroalfarero y Antioquia (embera); estas comunidades pertenecen al grupo lingüístico

chibcha, lo cual respalda la hipótesis sobre el posible origen ancestral común de la población muisca, ya que se considera que esta comunidad prehispánica también habría pertenecido a este grupo lingüístico (17). Esta coincidencia es interesante, pues también se ha reportado en otros estudios en comunidades contemporáneas de la familia lingüística chibcha (38,41).

Por otro parte, la población denominada agroalfarera corresponde a un grupo de muestras precolombinas provenientes de diferentes zonas de los Andes orientales colombianos que fueron clasificadas en el último periodo precolombino

Cuadro 5. Comparación de los resultados del sexo molecular con respecto al sexo antropológico

Individuo	Edad antropológica (años)	Sexo molecular	Sexo antropológico
SM27	Adulto (40-50)	Femenino	Femenino
SM30	Adulto (40-50)	Femenino	Femenino
SM31	Adulto (40-50)	Femenino	Femenino
SM39	Adulto (30-40)	Femenino	Femenino
SM43	Desconocida	Femenino	Femenino
SM44	Adulto (40-50)	Femenino	Femenino
SM47	Adulto (40-50)	Femenino	Femenino
SM68	Adulto (50-60)	Masculino	Femenino
SM104	Desconocida	Masculino	Masculino
SM109	Adulto (40-50)	Masculino	Masculino

Cuadro 6. Resultados y perfiles de amplificación de STR del cromosoma Y con el estuche AmpFISTR Yfiler™

Individuo	SM68	SM109
DYS456	14	16
DYS3891	13	14
DYS390	24	24
DYS389II	a	a
DYS458	15	16
DYS19	a	a
DYS385	a	a
DYS393	15	13
DYS391	10	6
DYS439	a	a
DYS635	22	22
DYS392	a	a
GATA H4	11	12
DYS437	14	14
DYS438	a	a
DYS448	a	19

^a Ausencia de resultado

correspondiente a los siglos IX-XVI d. C., y se caracterizaron por cacicazgos y una cultura agrícola (17). Las similitudes encontradas son, en todo caso, importantes, ya que se observó un patrón similar entre individuos pertenecientes al mismo periodo, lo cual demuestra que en las poblaciones precolombinas el haplogrupo A era el más frecuente, seguido por el haplogrupo B.

En los dendrogramas correspondientes, se evidenció que el patrón de distribución de haplogrupos también presentaba similitud con poblaciones de Centroamérica (ngöbe y kuna), lo cual corrobora el posible tronco común ancestral de las comunidades contemporáneas centroamericanas y las comunidades precolombinas de Colombia, tal y como se ha observado en otros estudios de poblaciones indígenas de Panamá (53) y la costa norte de Colombia (46).

Estos datos concordarían con los datos arqueológicos que han servido para determinar las sucesivas rutas del poblamiento colombiano, como se enumera a continuación.

Los primeros pobladores, que consistían en bandas trashumantes de cazadores recolectores, habrían atravesado el istmo de Panamá por la serranía del Darién a finales del pleistoceno, cuando no existía el bosque tropical sino llanuras.

Desde allí se habrían desplazado al interior del país por el occidente (Costa Pacífica, cordilleras Occidental, Central y valle del río Cauca), el centro (valle del río Magdalena, cordillera Oriental) y por el oriente (Llanos Orientales).

La región central de los Andes orientales pudo haber sido ocupada por pobladores provenientes de dos rutas: por el norte (valle de los ríos Magdalena, Sogamoso y Opón), se extendieron por los departamentos de Santander, Norte de Santander y Boyacá, y por el valle del río Bogotá, al sur, se dispersaron por la región del altiplano cundiboyacense (54).

Marcadores autosómicos, amelogenina y cromosoma Y

El objetivo inicial al emplear el estuche comercial multiplex AmpFiSTR SEfiler™ (Applied-Biosystems) era, principalmente, amplificar la amelogenina para determinar el sexo de los individuos. Al obtener los resultados de las muestras, se lograron perfiles completos y, para los otros marcadores autosómicos, perfiles parciales. Además, el análisis de parentesco de las muestras obtenidas mediante el cálculo del LR no arrojó ninguna relación familiar. Lo mismo ocurrió cuando se analizaron los marcadores del cromosoma Y, con lo cual se obtuvieron dos perfiles parciales sin ninguna relación entre ellos.

Estos hallazgos son importantes a nivel arqueológico, y demuestran que estas metodologías mejoran los métodos de extracción al emplear estuches comerciales para marcadores autosómicos con fragmentos más cortos de amplificación, con lo que se logran perfiles completos en estas muestras antiguas. De esta manera, se podrían dilucidar las relaciones familiares y complementar las hipótesis arqueológicas basadas en contextos funerarios que sugieren posibles parentescos, tal y como ha ocurrido en estudios previos (55-57).

Con respecto a la amelogenina, los datos antropológicos y moleculares concordaron con una sola excepción. El individuo SM68 se clasificó

antropológicamente como femenino, pero en la amplificación para el cromosoma Y se reclasificó como de sexo masculino. Así, estos resultados permiten contrastar y corregir la asignación de sexo basada exclusivamente en datos antropológicos. Al comparar los datos moleculares y antropológicos, ya se han observado inconsistencias en otros estudios con poblaciones antiguas (55,58).

Los datos del presente estudio subrayan la importancia de la contribución del ADN antiguo en los estudios arqueológicos, pues constituyen una primera aproximación a la distribución de los haplogrupos mitocondriales encontrados en la población muisca del Templo del Sol. Según estos resultados, es posible que estos pobladores precolombinos de los Andes orientales provinieran de Centroamérica después de atravesar el istmo de Panamá y se establecieron en el altiplano cundiboyacense, lo cual significa que comparten ancestros comunes con las poblaciones pertenecientes a la familia lingüística chibcha.

Los resultados también indican la utilidad de la determinación del sexo mediante métodos moleculares en aquellos casos en los cuales las evidencias antropológicas no sean suficientes, como es el caso de los restos óseos infantiles. Además, los perfiles de los marcadores autosómicos pueden arrojar luces sobre las hipótesis de los arqueólogos, principalmente en el caso de las hipótesis de parentesco, las cuales deben confirmarse mediante marcadores moleculares que abarquen regiones más informativas con respecto al ADNmt y permitan establecer los haplogrupos secundarios de esta población. Asimismo, es necesario ampliar el tamaño de la muestra e incorporar otros marcadores nucleares.

Con esta nueva información se podrán corroborar las hipótesis formuladas en el presente artículo y profundizar en el conocimiento de las rutas migratorias y las relaciones entre los grupos precolombinos que habitaron esta región.

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento especial al Museo Arqueológico de Sogamoso de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia por facilitar el acceso a las muestras que hicieron posible este trabajo, así como al Instituto Colombiano de Antropología e Historia, por autorizar el acceso a los restos óseos (N° ICAHN-132) en el marco del proyecto financiado por Colciencias (ref. 110156934771). La primera autora agradece a Colciencias la beca doctoral (Convocatoria 528) otorgada con este mismo propósito.

Conflicto de intereses

Los autores declaramos que durante la realización de este estudio no tuvimos ningún conflicto de intereses que pudiera afectar los resultados.

Financiación

Este trabajo fue financiado por Colciencias (ref. 110156934771) mediante la beca doctoral de la primera autora (Convocatoria 528), y con recursos propios del Instituto de Genética Humana de la Facultad de Medicina en la Pontificia Universidad Javeriana, de la Facultad de Medicina en la Universidad de la Sabana, así como del Grupo de Genética de Poblaciones e Identificación del Instituto de Genética y del Laboratorio de Antropología Física de la Universidad Nacional de Colombia.

Referencias

1. **De Saint Pierre M, Gandini F, Perego U, Bodner M, Gómez-Carballa A, Corach D, et al.** Arrival of Paleo-Indians to the southern cone of South America: New clues from mitogenomes. *PLoS One*. 2012;7:e51311. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051311>
2. **Chatters JC, Kennett DJ, Asmerom Y, Kemp BM, Polyak V, Blank AN, et al.** Late Pleistocene human skeleton and mtDNA link Paleoamericans and modern native Americans. *Science*. 2014;344:750-4. <https://doi.org/10.1126/science.1252619>
3. **Xavier C, Builes JJ, Gomes V, Ospino JM, Aquino J, Parson W, et al.** Admixture and genetic diversity distribution patterns of non-recombining lineages of native American ancestry in Colombian populations. *PLoS One*. 2015;10:e0120155. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120155>
4. **Pakendorf B, Stoneking M.** Mitochondrial DNA and human evolution. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2005;6:165-83. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.6.080604.162249>
5. **Chen XJ, Butow RA.** The organization and inheritance of the mitochondrial genome. *Nat Rev Genet*. 2005;6:815-25. <https://doi.org/10.1038/nrg1708>
6. **O'Rourke DH, Raff JA.** The human genetic history of the Americas: The final frontier. *Curr Biol*. 2010;20:R202-7. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.11.051>
7. **Schurr TG, Sherry ST.** Mitochondrial DNA and Y chromosome diversity and the peopling of the Americas: Evolutionary and demographic evidence. *Am J Hum Biol*. 2004;16:420-39. <https://doi.org/10.1002/ajhb.20041>
8. **Achilli A, Perego U, Lancioni H, Olivieri A, Gandini F, Hooshiar Kashani B, et al.** Reconciling migration models to the Americas with the variation of North American native mitogenomes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110:14308-13. <https://doi.org/10.1073/pnas.1306290110>
9. **Torrioni A, Schurr G, Yang C, Williams RC, Schanfield MS, Troup GA, et al.** Native American mitochondrial DNA analysis indicates that the Amerind and the Nadene populations were founded by two independent migrations. *Genetics*. 1992;130:153-62.

10. **Torróni A, Sukernik RI, Schurr TG, Starikorskaya YB, Cabell MF, Crawford MH, et al.** mtDNA variation of aboriginal Siberians reveals distinct genetic affinities with Native Americans. *Am J Hum Genet.* 1993;53:591-608.
11. **Bolnick DA, Bonine HM, Mata-Míguez J, Kemp BM, Snow MH, Leblanc SA.** Nondestructive sampling of human skeletal remains yields ancient nuclear and mitochondrial DNA. *Am J Phys Anthropol.* 2012;147:293-300. <https://doi.org/10.1002/ajpa.21647>
12. **Parr R, Carlyle SW, O'Rourke DH.** Ancient DNA analysis of Fremont Amerindians of the Great Salt Lake wetlands. *Am J Phys Anthr.* 1996;99:507-18.
13. **García F, Moraga M, Vera S, Henríquez H, Llop E, Aspillaga E, et al.** mtDNA microevolution in Southern Chile's archipelagos. *Am J Phys Anthropol.* 2006;129:473-81. <https://doi.org/10.1002/ajpa.20297>
14. **Fehren-Schmitz L, Warnberg O, Reindel M, Seidenberg V, Tomasto-Cagigao E, Isla-Cuadrado J, et al.** Diachronic investigations of mitochondrial and Y-chromosomal genetic markers in pre-Columbian Andean highlanders from South Perú. *Ann Hum Genet.* 2011;75:266-83. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1809.2010.00620.x>
15. **Lleras R.** Diferentes oleadas de poblamiento en la prehistoria tardía de los Andes Orientales. *Boletín Museo del Oro.* 1995;38:39:3-11.
16. **Langebaek C.** Mercados, poblamiento e integración étnica entre los Muiscas del siglo XVI. Bogotá: Banco de la República; 1987.
17. **Rodríguez JV.** Los chibchas: hijos del sol, la luna y los Andes. Orígenes de su diversidad. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2011.
18. **Buitrago LM, Rodríguez O.** Estudio bioantropológico de la colección Eliécer Silva Celis, Museo Arqueológico de Sogamoso. En: Rodríguez JV, editor. *Los Chibchas: adaptación y diversidad en los Andes Orientales de Colombia.* Bogotá: Editora Guadalupe Ltda.; 1999. p. 217-36.
19. **Fernández C.** La arqueología molecular aplicada a la solución de problemas prehistóricos: análisis de ADN mitocondrial en momias y restos óseos prehispánicos (tesis). Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 1999.
20. **Monsalve MV, Cárdenas F, Guhl F, Delaney AD, Devine DV.** Phylogenetic analysis of mtDNA lineages in South American mummies. *Ann Hum Genet.* 1996;60:293-303. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1809.1996.tb01193.x>
21. **Silva A, Briceño I, Burgos J, Torres D, Villegas V, Gómez A, et al.** Análisis de ADN mitocondrial en una muestra de restos óseos arcaicos del periodo Herrera en la sabana de Bogotá. *Biomédica.* 2008;28:569-77. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v28i4.62>
22. **Sánchez C.** Secuenciación de ADN mitocondrial a partir de fragmentos óseos prehispánicos hallados en el sector de Candelaria La Nueva en Bogotá. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana; 2007.
23. **Cooper A, Poinar HN.** Ancient DNA: Do it right or not at all. *Science.* 2000;289:1139. <https://doi.org/10.1126/science.289.5482.1139b>
24. **Gilbert MT, Hofreiter M, Barnes I.** Assessing ancient DNA studies. *Trends Ecol Evol.* 2005;20:541-4. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.07.005>
25. **Huel R, Amory S, Bilic A, Vidovic S, Jasaragic E, Parsons T.** DNA extraction from aged skeletal samples for STR typing by capillary electrophoresis. *Methods Mol Biol.* 2012;830:185-98. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-461-2_13
26. **Huffine E, Crews J, Kennedy B, Bomberger K, Zinbo A.** Mass identification of persons missing from the break-up of the former Yugoslavia: Structure, function, and role of the International Commission on Missing Persons. *Croat Med J.* 2001;42:271-5.
27. **Keyeux G, Rodas C, Gelvez N, Carter D.** Possible migration routes into South America deduced from mitochondrial DNA studies in Colombian Amerindian Populations. *Hum Biol.* 2002;74:211-33.
28. **Egeland T, Mostad P, Mevag B, Stenersen M.** Beyond traditional paternity and identification cases. Selecting the most probable pedigree. *Forensic Sci Int.* 2000;110:47-59. [https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(00\)00147-X](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(00)00147-X)
29. **Paredes M, Galindo A, Bernal M, Ávila S, Andrade D, Vergara C, et al.** Analysis of the CODIS autosomal STR loci in four main Colombian regions. *Forensic Sci Int.* 2003;14:67-73. [https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(03\)00271-8](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(03)00271-8)
30. **Shields GF, Schmiechen AM, Frazier BL, Redd A, Voevoda MI, Reed JK, et al.** mtDNA sequences suggest a recent evolutionary divergence for Beringian and northern North American populations. *Am J Hum Genet.* 1993;53:549-62.
31. **Ward RH, Redd A, Valencia D, Frazier B, Pääbo S.** Genetic and linguistic differentiation in the Americas. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993;90:10663-7.
32. **Ward RH, Frazier BL, Dew-Jager K, Pääbo S.** Extensive mitochondrial diversity within a single Amerindian tribe. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88:8720-4.
33. **Schurr TG, Ballinger SW, Gan YY, Hodge JA, Merriwether DA, Lawrence DN, et al.** Amerindian mitochondrial DNAs have rare Asian mutations at high frequencies, suggesting they derived from four primary maternal lineages. *Am J Hum Genet.* 1990;46:613-23.
34. **Torróni A, Schurr TG, Cabell MF, Brown MD, Neel JV, Larsen M, et al.** Asian affinities and continental radiation of the four founding Native American mtDNAs. *Am J Hum Genet.* 1993;53:563-90.
35. **Kolman CJ, Bermingham E, Cooke R, Ward RH, Arias TD, Guionneau-Sinclair F.** Reduced mtDNA diversity in the Ngöbé Amerinds of Panamá. *Genetics.* 1995;140:275-83.
36. **Lalueza-Fox C, Calderón FL, Calafell F, Morera B, Bertranpetit J.** MtDNA from extinct Tainos and the peopling of the Caribbean. *Ann Hum Genet.* 2001;65:137-51. <https://doi.org/10.1017/S0003480001008533>
37. **Lalueza-Fox C, Sampietro ML, Gilbert MT, Castri L, Facchini F, Pettener D, et al.** Unravelling migrations in the steppe: Mitochondrial DNA sequences from ancient central Asians. *Proc Biol Sci.* 2004;271:941-7. <https://doi.org/10.1098/rspb.2004.2698>
38. **Melton PE, Briceño I, Gómez A, Devor E, Bernal JE, Crawford MH.** Biological relationship between Central and South American Chibchan speaking populations: Evidence from mtDNA. *Am J Phys Anthropol.* 2007;770:753-70. <https://doi.org/10.1002/ajpa>

39. **Lewis CM, Lizárraga B, Tito RY, López PW, Lannacone GC, Medina A, *et al.*** Mitochondrial DNA and the peopling of South America. *Hum Biol.* 2007;79:159-78. <https://doi.org/10.1353/hub.2007.0031>
40. **Casas-Vargas A, Gómez A, Briceño I, Díaz-Matallana M, Bernal JE, Rodríguez JV.** High genetic diversity on a sample of pre-Columbian bone remains from Guane territories in northwestern Colombia. *Am J Phys Anthropol.* 2011;146:637-49. <https://doi.org/10.1002/ajpa.21626>
41. **Usme-Romero S, Alonso M, Hernández-Cuervo H, Yunis EJ, Yunis JJ.** Genetic differences between Chibcha and non-Chibcha speaking tribes based on mitochondrial DNA (mtDNA) haplogroups from 21 Amerindian tribes from Colombia. *Genet Mol Biol.* 2013;36:149-57. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572013005000011>
42. **Torres MM, Bravi CM, Bortolini MC, Duque C, Callegari-Jacques S, Ortiz D, *et al.*** A revertant of the major founder native American haplogroup C common in populations from northern South America. *Am J Hum Biol.* 2006;18:59-65. <https://doi.org/10.1002/ajhb.20461>
43. **Ginther C, Corach D, Penacino G, Rey J, Carnese F, Hutz M, *et al.*** Genetic variation among the Mapuche indians from the Patagonian region of Argentina: Mitochondrial DNA sequence variation and allele frequencies of several nuclear genes. En: Peña S, Chakraborty R, Epplen J, Jeffreys A, editors. *DNA finger- printing: State of the science.* First edition. Basel: Birkhäuser; 1993. p. 211-9.
44. **Wang S, Lewis CM, Jakobsson M, Ramachandran S, Ray N, Bedoya G, *et al.*** Genetic variation and population structure in native Americans. *PLoS Genet.* 2007;3:e185. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030185>
45. **Ward R, Salzano F, Bonatto S, Hutz M, Coimbra JC, Santos R.** Mitochondrial DNA polymorphism in three Brazilian tribes. *Am J Hum Biol.* 1996;8:317-23. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6300\(1996\)8:3<317::AID-AJHB2>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6300(1996)8:3<317::AID-AJHB2>3.0.CO;2-X)
46. **Santos M, Ward R, Barrantes R.** mtDNA variation in the Chibcha Amerindian Huetar from Costa Rica. *Hum Biol.* 1994;66:963-77.
47. **Batista O, Kolman C, Bermingham E.** Mitochondrial DNA diversity in the Kuna Amerinds of Panamá. *Hum Mol Genet.* 1995;4:921-9.
48. **Nei M.** Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics.* 1978;89:583-90.
49. **Excoffier L, Laval G, Schneider S.** Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online.* 2005;1:47-50.
50. **Kovach W.** MVSP - A MultiVariate Statistical Package for Windows. ver. 3.1. Pentraeth, Wales, U.K: Kovack Computing Services; 2007.
51. **Rodríguez JV.** Craneometría de la población prehispánica de los Andes Orientales de Colombia: diversidad, adaptación y etnogénesis. Los Chibchas: adaptación y diversidad en los Andes Orientales de Colombia. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, Colciencias; 2001. p. 250-310.
52. **Silva CE.** Investigaciones arqueológicas en Villa de Leiva. *Boletín del Museo del Oro.* 1981;10:1-18.
53. **Perego U, Lancioni H, Tribaldos M, Angerhofer N, Ekins JE, Olivieri A, *et al.*** Decrypting the mitochondrial gene pool of modern Panamanians. *PLoS One.* 2012;7:e38337. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038337>
54. **Rodríguez JV.** La diversidad poblacional de Colombia en el tiempo y el espacio. *Rev Acad Colomb Cienc.* 2007;31: 321-46.
55. **Gamba C, Fernández E, Tirado M, Pastor F, Arroyo-Pardo E.** Ancient nuclear DNA and kinship analysis: The case of a medieval burial in San Esteban Church in Cuéllar (Segovia, Central Spain). *Am J Phys Anthropol.* 2011;144:485-91. <https://doi.org/10.1002/ajpa.21451>
56. **Bentley R, Layton R, Tehrani J.** Kinship, marriage, and the genetics of past human dispersals wave of advance model. *Hum Biol.* 2009;81:159-80. <https://doi.org/10.3378/027.081.0304>
57. **Vanek D, Saskova L, Koch H.** Kinship and Y-chromosome analysis of 7th century human remains: Novel DNA extraction and typing procedure for ancient material. *Croat Med J.* 2009;50:286-95. <https://doi.org/10.3325/cmj.2009.50.286>
58. **Bauer CM, Niederstätter H, McGlynn G, Stadler H, Parson W.** Comparison of morphological and molecular genetic sex-typing on mediaeval human skeletal remains. *Forensic Sci Int Genet.* 2013;7:581-6. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2013.05.005>