



**Universidad de Chile**

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

## **“Análisis exploratorio de linajes mitocondriales amerindios de un conjunto de individuos que se auto adscriben al pueblo Pikunche”**

Memoria para optar al título profesional de  
Bioquímica

**Camila Meylin Álvarez González**

**Director**

**Dr. Mauricio Moraga**

Programa de genética humana, ICBM

Facultad de Medicina

Universidad de Chile

**Patrocinante**

**Dr. Sergio Álvarez**

Dpto. Bioquímica y Biología Molecular

Facultad Ciencias Químicas y

Farmacéuticas

Universidad de Chile

**Enero, 2024**

*A mi mamá, por demostrarme que nada es imposible y siempre inculcarme perseguir mis sueños.*

*Te amo y te admiro todos los días...*

## **i. Agradecimientos**

Primero, agradecer profundamente a los 109 participantes del estudio, por su disposición y confianza en este proyecto, y por sobre todo a los participantes que nos ayudaron activamente con la toma de muestra, fueron una pieza fundamental del estudio.

Este trabajo se pudo llevar a cabo gracias al financiamiento del proyecto FONDECYT 1181889, a cargo del Doctor Mauricio Moraga. Agradecer infinitamente a él, mi profesor tutor, por todo el apoyo y confianza puesta en mí desde la Unidad de Investigación hasta el final de mi Memoria, y por todos los conocimientos entregados, comentarios y correcciones durante este período. También a todo el equipo del Laboratorio de Genética de Poblaciones y Evolución Humana, por todas las risas y cariño compartido dentro y fuera del laboratorio, durante los procesos más tediosos de todos. En especial a Michael Orellana, por estar disponible desde el primer día para ayudarme y explicarme todo, una y otra vez.

Gracias a cada profesor/a, compañero/as y amigo/as que pasaron por mi vida durante la carrera, y también a los que ya no están. Sin ustedes, mi vida universitaria no hubiese sido la misma, gracias por hacer de todos estos años caóticos, pero los más lindos de recordar. También agradecer a mis amigas de mi carrera paralela, la danza, por escucharme y distraerme en los momentos más estresantes.

A mi familia por cuidarme y siempre hacer que todo sea un poquito más fácil. A Meylin González, mi mamá, por dar la vida por mí siempre, apoyarme incansablemente y por siempre hacerme sentir valiosa. A mi mejor amiga de la vida, Ariam, por estar conmigo en todas y a toda hora desde pequeñas, y recordarme día a día de lo que soy capaz. Y a mi pareja, Ignacio Alfaro, por inspirarme siempre a ser mejor, apoyarme en los momentos más difíciles y hacer que nunca deje de creer en mí, les amo.

Finalmente, agradecer nuevamente a los participantes del estudio, por compartir su conocimiento para la realización de la memoria, por la traducción, la ayuda en la afinación de los detalles, y por su compromiso y preocupación con el estudio.

## ii. Índice de contenido

i.	Agradecimientos .....	ii
iii.	Índice de tablas y figuras .....	v
iv.	Abreviaturas .....	vii
v.	Resumen .....	viii
vi.	Abstract.....	x
vii.	Pichilkaelchi killka .....	xi
1.	Introducción .....	1
1.1	Poblamiento de Sudamérica.....	2
1.2	Chile central, imperio Inka y conquista europea .....	3
1.2.1	Pueblo Pikunche .....	5
1.3	DNA mitocondrial .....	5
1.3.1	Herencia materna .....	6
1.3.2	Estudio genético de poblaciones humanas .....	7
2.	Propósito del estudio .....	10
3.	Objetivos: general y específicos .....	10
4.	Materiales y métodos.....	11
4.1	Obtención de las muestras .....	11
4.2	Extracción DNA y Amplificación D-loop .....	12
4.3	Análisis de secuencias y asignación de Haplogrupos.....	14
4.4	Índice de diversidad genética .....	15
4.5	Análisis estadísticos y de estructura poblacional .....	15
5.	Resultados.....	17
5.1	Caracterización de la muestra .....	17
5.2	Extracción DNA, Amplificación y Secuenciación de región D-loop.....	19
5.3	Composición genética del conjunto de individuos que se auto adscriben al pueblo Pikunche .....	22
5.4	Índices de diversidad genética estándar.....	24
5.5	Estructura Poblacional.....	26
5.5.1	Estadístico F (Fst) y Dendrograma de Neighbour-Joining.....	26
5.5.2	Análisis de componentes principales .....	32
5.5	Redes de Haplotipos .....	38
6.	Discusión .....	42
7.	Conclusiones .....	50
8.	Referencias .....	52

9. Anexo ..... 57

### iii. Índice de tablas y figuras

Tabla 1. Partidores utilizados para la amplificación de la región D-loop del DNA mitocondrial.....	14
Tabla 2. Partidores utilizados para la secuenciación de la región D-loop del DNA mitocondrial.....	14
Tabla 3. Proporción de linajes mitocondriales encontrados en el conjunto de individuos que se auto adscriben al pueblo Pikunche.....	23
Tabla 4. Índices de diversidad genética estándar del conjunto de individuos que se auto adscriben al pueblo Pikunche y poblaciones de referencia.....	25
Figura 1. DNA mitocondrial humano.....	7
Figura 2. Mapa referencial de la toma de muestra.....	12
Figura 3. Gráficos informativos sobre ascendencia, identidad y pertenencia de cada individuo del conjunto que se auto adscriben al pueblo Pikunche.....	18
Figura 4. DNA genómico de muestras epiteliales bucales de individuos que se auto adscriben pueblo Pikunche.....	19
Figura 5. Amplificación región D-loop de muestras de individuos que se auto adscriben al pueblo Pikunche.....	20
Figura 6. Análisis de secuencias de la región D-loop de los individuos que se auto adscriben al pueblo Pikunche.....	21
Figura 7. Fst y dendrograma de Neighbour-joining de Pikunche y las poblaciones de referencia.....	27
Figura 8. Fst y dendrograma de Neighbour-joining de Pikunche Norte y Pikunche Sur, con las poblaciones de referencia.....	29
Figura 9. Fst y dendrograma de Neighbour-joining de Pikunche Norte, Pikunche Centro y Pikunche Sur, con las poblaciones de referencia.....	31
Figura 10. Análisis de componentes principales entre Pikunche y las poblaciones de referencia.....	33
Figura 11. Análisis de componentes principales entre Pikunche Norte, Pikunche Sur y las poblaciones de referencia.....	35
Figura 12. Análisis de componentes principales entre Pikunche Norte, Pikunche Centro, Pikunche Sur y las poblaciones de referencia.....	37

Figura 13. Red de haplotipo de macrohaplogrupo B2.....	39
Figura 14. Red de haplotipo de macrohaplogrupo C1.....	40
Figura 15. Red de haplotipo de macrohaplogrupo D1.....	41

#### **iv. Abreviaturas**

CO: Cytochrome C oxidase  
CYT b: Cytochrome b  
D-loop: Displacement loop  
DNA: Deoxyribonucleic acid  
HVS I: Hipervariable segment I  
HVS II: Hipervariable segment II  
HVS III: Hipervariable segment III  
LASER\_COQ: La Serena / Coquimbo  
mtDNA: Mitochondrial DNA  
NA: No Amerindio  
ND: NADH dehydrogenase  
OH: Origin of heavy strand  
OL: Origin of light strands  
PC1: Principal component 1  
PC2: Principal component 2  
PH: Heavy-strand promoter  
PIK: Pikunche  
PIK\_C: Pikunche centro  
PIK\_N: Pikunche norte  
PIK\_S: Pikunche sur  
PL: Light-strand promoter  
RNA: Ribonucleic acid  
rRNA: Ribosomal RNA  
SF\_LA: San Felipe Los Andes  
SNP: Single nucleotide polymorphism  
tRNA: Transfer RNA

## v. Resumen

### **“Análisis exploratorio de linajes mitocondriales amerindios de un conjunto de individuos que se auto adscriben al pueblo Pikunche”**

Desde antes del contacto con los europeos, en el actual territorio del Estado de Chile han convivido diferentes etnias originarias descendientes de los primeros habitantes del continente. En la zona central del país, se identifica a los Pikunche, un pueblo agroalfarero que originalmente ocupaba una vasta porción de este territorio. Algunos autores plantean que a la llegada de los españoles y tras largos años de conflictos y enfrentamientos, una parte de los Pikunche migraron hacia el sur, mientras que la parte restante fue agrupada en reducciones indígenas llamadas Pueblos de Indios y sometida al sistema de encomiendas, lo que provocó una aculturación forzosa. Estos fenómenos contribuyeron a la invisibilización del componente Pikunche presente en la población de la zona central del país y motivaron probablemente que el Estado de Chile no los reconociera dentro de las etnias indígenas de Chile al dictarse la ley indígena en 1993.

El DNA mitocondrial es uno de los marcadores uniparentales más importantes en el estudio de poblaciones humanas. Debido a su forma de herencia, la ausencia de recombinación y su alta tasa de mutación, resulta un muy buen marcador para el seguimiento de linajes maternos a través de las generaciones. El estudio de haplogrupos mitocondriales en poblaciones antiguas y actuales de América, ha ayudado a proporcionar nuevas perspectivas sobre el origen e historia de los primeros pobladores del continente, así como de los procesos de diferenciación poblacional al interior de Sudamérica.

En esta memoria se analizaron los haplogrupos mitocondriales de un grupo de 109 individuos que se auto adscriben al pueblo Pikunche, distribuidos entre las regiones de Coquimbo y el Maule. Los resultados arrojaron que el 89% de los individuos presentan un linaje mitocondrial amerindio, siendo la mayoría linajes restringidos al Cono Sur de Sudamérica: Entre ellos destacan B2i2 (19,3%), C1b13 (18,3%) y D1g (22,9%). Al comparar al grupo en estudio con poblaciones de referencia nativas y mestizas del país, resulta evidente que Pikunche comparte haplogrupos y posee frecuencias semejantes a las de Mapuche, Pehuenche y Huilliche, así como a las de poblaciones mestizas de la zona centro-sur de Chile. Sin embargo, al subdividirlos en base al lugar de residencia de la madre, las subpoblaciones resultantes presentan una distribución de linajes similar a las poblaciones mestizas de la región de donde provienen las muestras, lo que sugiere que los individuos no constituyen necesariamente una entidad poblacional única.

Los linajes mitocondriales y las frecuencias determinadas en esta memoria constituyen un aporte al conocimiento de las poblaciones originarias y mestizas de Chile central, sin necesariamente confirmar o cuestionar la identidad de los individuos que basados en su origen ancestral o su adscripción cultural se consideran parte del pueblo Pikunche.

**vi. Abstract**

**“Amerindian mitochondrial lineages’ exploratory analysis of a group of individuals who self-ascribe to Pikunche people”**

Different indigenous ethnicities, descendants of the continent's first inhabitants, coexisted in the current territory of the State of Chile before the contact with Europeans. In the central zone of the country, Pikunche are identified as an agro-potter people who originally occupied a vast portion of this territory. Some authors suggest that upon the arrival of the Spanish and after long years of conflicts and confrontations, a part of Pikunche migrated south, while the remaining part was grouped into indigenous reductions called "Pueblos de Indios" and subjected to the “encomienda” system, leading to forced acculturation. These phenomena contributed to the invisibility of the Pikunche component in the population of the central zone of the country and probably motivated the State of Chile not to recognize them as indigenous ethnicities of Chile when the indigenous law was enacted in 1993.

Mitochondrial DNA is one of the most important uniparental markers in the study of human populations. Due to its mode of inheritance, absence of recombination, and high mutation rate, it is a very good marker for tracking maternal lineages through generations. The study of mitochondrial haplogroups in ancient and current populations of the Americas has helped provide new perspectives on the origin and history of the continent's first inhabitants, as well as on the processes of population differentiation within South America.

This study analyzed the mitochondrial haplogroups of a group of 109 individuals who self-identify as Pikunche, distributed between the Coquimbo and Maule regions. The results showed that 89% of the individuals exhibit an Amerindian mitochondrial lineage, with the majority having lineages restricted to the Southern Cone of South America. Notable among them are B2i2 (19.3%), C1b13 (18.3%), and D1g (22.9%). When comparing the study group with native and mestizo reference populations in the country, it's evident that Pikunche shares haplogroups and has similar frequencies to Mapuche, Pehuenche, Huilliche, as well as mestizo populations in the Central-Southern region of Chile. However, when subdividing them based on the mother's place of residence, the resulting subpopulations show a lineage distribution similar to mestizo populations from the region where the samples come from, suggesting that individuals do not necessarily constitute a unique population entity.

Mitochondrial lineages and frequencies determined in this study contribute to the knowledge of the indigenous and mestizo populations of central Chile, without necessarily confirming or questioning the identity of individuals who, based on their ancestral origin or cultural affiliation, consider themselves part of the Pikunche people.

## vii. Pichilkaelchi killka

### “Lelilelituelchi ñuke künga yüka ñi nieetew pu che küpalungün tayno pu Pikunche mo”.

Pu wingka ñi akuponom ula, vachi mapu mo, Chile mapu ñi pietew pu wingka, kuyvi kütü müllewuyeyngün walte anüm pu tavche, llitu pu che küpalungün. Pikun mapu mo mungenke ngewuyeyngün pu Pikunche, widüvoe ngelungün, ketavoe ngelungün kay, ngenpikunmapuvulungün kay. Udañ pu nütamvoe veypikeyngün: Akulungün pu wingka, dew avlu ula weychan kay, udañ tayno pu Pikunche ñullingün willi mapu mo, welu ñullnoluchi pu che tapümkünoeyew pichikaelchi mapu yüka mo, *Pueblos de Indios* pikeel, tavaykokünoeyew eyechi tokilelchi dúngu, *Encomienda* pikeel kay, vemngechi pu Pikunche ñi admongen, admapu kay apüm-maeyew, pikeyngün. Vachi küwün dúngu yüka kelluküloyngün ta ñi pevalnoam pu Pikunche ñi admongen, müllepulu pu che mo ngewpolungün Pikun mapu. Vemngechi *Estado de Chile* veypikey: Dew ngewpawelayngün pu Pikunche, vey ta ñi tokilelchi dúngu mo, entuvilu 1993 tipantu mo, *Ley Indígena* pikeel.

*mDNA* kotü ngünelkey ta ad küpan ñuke püle, ño ngevalkey killkatuaviüm pu tavche. Ñi elungen mo, ñi reyvülnon mo kay, vey ta ñi mü yüngeyeküwmen mo kay, kotüy lle may ñi ad küpan ngen inapünoaviüm kuyvi ñuke küpan. *Haplogrupo mitocondrial* yüka ñi killkatungen kuyvi pu tavche mo, ado müllewluchi pu tavche mo kay machi vükañma mapu mo, *América* pikeel, kimelkakülowyey llitu pu che ñi tuwün mo, ñi nütam mo kay, chumngechi ñi yüngekünowün mo kay *Sudamérica* pikeelchi mapu mo.

Vachi küdaw mo lelilelitungey *haplogrupo mitocondrial* yüka ñi nieetew 109 che, küpalungün tayno pu Pikunche mo, va müllewlungün *Coquimbo* mapu kütü, *Maule* mapu kütü. Vachi küdaw veypi: 89% ngeluchi pu che nieyngün *mitocondrial* küpan tuwlu *América* mo, yod alüllewluchi küpan tuwingün *Cono Sur* pikeelchi mapu mo, willi *América* mo: Mü küpan yüka ta B2i2 (19,3%), C1b13 (18,3%) kay, D1g (22,9%) kay. Kintumüngengetyüm vachi küdaw ñi küpan yüka mo, yüngeluchi küpan yüka mo, reyvü mollvün ngelu ve, reyvü mollvün ngenolu ve kay, pepi veypingey: Pikunche küpan, Pewenche küpan kay, Williche küpan kay trüringün *haplogrupo* yüka mo, ñi chunten ngen mo kay, vemngechi trüri reyvü mollvün pu che müllewpolungün Pikun mapu mo, Rangin mapu mo kay. Welu tapümngesyüm küpan yüka chew ñi müllewmom pu ñuke, veychi tapümelchi küpan yüka udamkünongeyngün chumngechi reyvü küpan yüka udamkünongeyngün ñi tuwün mo. Va veypiavuy: Veychi pu Pikunche kiñedke mollvün ngelayavuyngün.

## 1. Introducción

Tras la salida de África, unos noventa mil años atrás, los humanos modernos se expandieron, avanzando a través de Asia y Europa hasta ocupar los cinco continentes, siendo América el último territorio en ser poblado, lo que marcaría el fin del proceso de expansión fuera de África (Skoglund & Reich, 2016). Durante este periodo, las distintas poblaciones de *Homo sapiens* modernos experimentaron diversos eventos que generaron cambios en la estructura y fluctuaciones en el tamaño poblacional, debidos a migraciones, el aislamiento geográfico y el flujo genético diferencial entre las poblaciones. Por otra parte, los nuevos ambientes que experimentaron los humanos modernos implicaron desafíos evolutivos importantes respecto a temperatura, humedad, radiación solar y dieta, exposición a patógenos, entre otros. Esto, sumado a la tasa de mutación genética y los eventos de recombinación, contribuyeron a la diversidad genética y fenotípica en y entre las diferentes poblaciones (Herrera-Paz, 2013; Tishkoff & Verrelli, 2003).

Durante años, estudios arqueológicos han postulado que el poblamiento de América tuvo lugar a finales del Pleistoceno, unos dieciocho mil años atrás, cuando las poblaciones humanas situadas al noreste de Asia cruzaron a Norteamérica a través del Puente Terrestre de Bering, que se encontraba expuesto durante el Último Máximo Glacial (Llamas et al., 2016). Sin embargo, en ese momento América del Norte se encontraba cubierta por capas de hielo, Cordillerana y Laurentide, bloqueando el acceso desde Beringia. No fue hasta aproximadamente 17.000 años atrás, que la capa de hielo comenzó a retroceder, habilitando una posible ruta costera (Llamas et al., 2016; Taylor et al., 2014); mientras que, una ruta alternativa a través de un corredor interno libre de hielo, no estuvo disponible hasta la desglaciación entre las dos capas de hielo, hace aproximadamente 11.500 años antes del presente (siendo el “presente” el año 1950) (Mandryk et al., 2001).

Junto con la evidencia arqueológica, los estudios genéticos de poblaciones indígenas americanas proporcionan otras perspectivas sobre la historia y el origen de los primeros pobladores de América. Hallazgos a partir de estudios realizados con diferentes marcadores moleculares, como DNA genómico, DNA mitocondrial y cromosoma Y, estimaron que los Nativos Americanos se separaron de las poblaciones de Siberia y del Este asiático, hace aproximadamente  $25.000 \pm 1100$  años atrás, y que en algún momento, entre 22.000 y 18.000 años atrás, este linaje fundador se dividió entre Nativos Americanos y Antiguos Beringianos (Moreno-Mayar et al., 2018; Raghavan et al., 2015; Waters, 2019). Posteriormente, los Nativos Americanos se dividieron entre los Nativos Americanos del

Norte, y los Nativos Americanos del Sur, hace aproximadamente 17.000 a 14.600 años atrás (Moreno-Mayar et al., 2018).

### **1.1 Poblamiento de Sudamérica**

El descubrimiento de sitios y artefactos Clovis, datados por radiocarbono entre 13.000 y 12.700 años atrás, hicieron que este fuese considerado el complejo arqueológico más antiguo definido en América del Norte (Rasmussen et al., 2014). Sin embargo, durante las últimas décadas, investigaciones tanto en América del Norte como América del Sur, revelaron hallazgos de ocupaciones más antiguas, pre-Clovis, que además concuerdan con el rango de estimaciones realizadas por análisis genéticos (Prates et al., 2020).

Uno de los eventos más controversiales para los arqueólogos norteamericanos del siglo XX fueron los hallazgos arqueológicos en Monte Verde, ubicado a 28 kilómetros de la ciudad de Puerto Montt, Chile, fechados entre 14.100-14.600 años antes del presente, aún más antiguo que Clovis. Este descubrimiento favoreció la hipótesis de una entrada temprana a América del Sur, por una ruta costera a lo largo del Océano Pacífico (De Saint Pierre, 2017; Dillehay et al., 2015). Luego de Monte Verde, otros sitios arqueológicos tanto en América del Norte como en América del Sur fueron datados pre-Clovis, apoyando también la hipótesis previamente mencionada (De Saint Pierre, 2017). Asimismo, dataciones arqueológicas en la Patagonia apoyan que esta fue poblada tempranamente, partiendo por Monte Verde y Arroyo Seco 2 (14.100 años antes del presente), siguiendo con el resto de la Patagonia (12.900 años antes del presente), y Tierra del Fuego (9.000 años antes del presente), cronología que concuerda con análisis genéticos basados en los estudios de linajes mitocondriales, que también han contribuido a la hipótesis de entrada a Sudamérica pre-Clovis (De Saint Pierre, 2017; Bodner et al., 2012).

## **1.2 Chile central, imperio Inka y conquista europea**

Estos primeros pobladores de América eran grupos de cazadores-recolectores que se fueron expandiendo por el territorio, logrando ciertos niveles de domesticación de los recursos naturales, que permitieron la permanencia de estos grupos en el territorio. En el tiempo, este proceso se traduciría en asentamientos humanos que, junto con procesos complejos de transformación social y diversificación, dieron origen a lo que hoy conocemos como pueblos indígenas que habitan el territorio geopolítico de Chile (Bengoa, 2000).

En los valles que comprenden la zona de Chile Central existían diversos desarrollos culturales que convivían entre ellos y se caracterizaban por la fabricación de alfarería y el trabajo agrícola (Merino, 2020; Sanhueza & Falabella, 2012). Estos debieron estar organizadas en pequeños grupos familiares que se desplazaban libremente por el territorio, sustentándose tanto de recursos animales como vegetales (Merino, 2020). Al ser una zona intermedia, la población de Chile central generó vinculaciones con grupos de los valles nortinos y con la zona sur de Chile, además de grupos transandinos del noroeste y centro-oeste de Argentina. Es más, análisis de los diseños de las cerámicas evidencian los estilos particulares de las diferentes culturas, como los contactos entre ellas y/o con otras, como por ejemplo con los Inka (Merino, 2020; Bengoa, 2000).

A mediados del siglo XV, al norte de Chile existía un poderoso imperio, cuya capital se encontraba establecida en Cuzco. Este imperio, conocido como el Imperio Inka, logró extender sus dominios en una vasta porción del continente Sudamericano. Chile no fue la excepción, y según diferentes autores, la resistencia puesta por los nativos hizo que la ocupación del país fuese un proceso lento y gradual, heterogéneo e incluso con diferentes intensidades a nivel regional, lo cual originó diversas zonas de integración que se extendieron de norte a sur y probablemente de la costa a Los Andes (Solis LL, 1983). Al cabo de años los Inka habían dominado amplias regiones y establecido lazos cooperativos y políticos con los grupos locales, desde lo que en la actualidad es el Norte de Chile, hasta el límite definitivo de su conquista, que, según algunos, habría sido el río Maule o incluso el río Bío Bío. Así, a la llegada de Diego de Almagro y Pedro de Valdivia, la Zona norte y centro del País, se encontraba organizada y estructurada bajo este Imperio (Solis LL, 1983; Bengoa, 2000).

Al llegar los españoles al territorio chileno, lo hicieron acompañados de yanaconas, o “indios amigos” del Cuzco, lo que facilitó notablemente la comunicación con las poblaciones locales, ya que, según los cronistas, en el territorio que comprendía la zona norte y central de Chile, había algunos individuos que hablaban la lengua quechua. Según lo descrito por

Gerónimo de Bibar (Jerónimo de Vivar), una de las primeras resistencias con las que Pedro de Valdivia y sus tropas se encontraron fue la medioambiental, ya que tuvieron que enfrentarse a una zona desértica, carente de agua y vegetación, en los Valle de Tarapacá y Atacama. Dada la enorme ventaja que las armas de hierro y de fuego les daban a los españoles, la defensa indígena estuvo basada principalmente en ocultar sus alimentos, para provocar una falla total de recursos a los invasores, seguido de series de ataques con el fin de debilitar a los mismos. Esto no impidió que los españoles siguieran avanzando, aprovechando las disputas que existían o se iban generando entre las comunidades locales (Vargas, 2011). Estos conflictos entre comunidades facilitaron a Valdivia la entrada a los valles de Chile central, sin gran oposición por parte de los indígenas, donde incluso algunos grupos les entregaban alimentos a los españoles, con el fin de establecer alianzas. Sin embargo, autores mencionan que la tensión que surgió con los planes de colonización de lo que hoy conocemos como Santiago, por parte de Valdivia, generó que estas comunidades resolvieran sus diferencias y se unieran contra el enemigo común de manera estratégica. Pero, luego de las primeras derrotas, la resistencia generalizada se volvió más localizada y de pequeños grupos de carácter comunitario (Solis LL, 1985). En consecuencia, en los primeros años de la época colonial, cuando la población hispana se estableció de forma permanente en territorios de los valles de Chile Central y fundaron el centro comercial y administrativo de la Ciudad de Santiago, los habitantes originarios fueron agrupados en reducciones llamadas Pueblos de Indios, que originalmente eran territorios ocupados naturalmente por los habitantes nativos, pero luego fueron paulatinamente modificados por los encomenderos (Bengoa, 2004). Todo este proceso provocó la aculturación forzosa y, consecuentemente, un proceso de mezcla genética entre los diversos grupos étnicos que habitaban el Valle Central en ese momento. Otros habitantes se dispersaron, migrando hacia las tierras “libres de enemigos” en el sur. Hasta ese entonces, los pueblos indígenas que habitaban la zona centro y centro/sur del país eran los Pikunche, Mapuche, Pehuenche y Huilliche, de los cuales la mayoría se conservan hasta la actualidad. Otros autores plantean que algunos de estos grupos disminuyeron significativamente con el tiempo e hipotetizan que pudieron desaparecer de los territorios que ocupaban originalmente (Bengoa, 2000; Faron, 1960). Sin embargo, aún faltan estudios de campo que permitan corroborar o desestimar dichas afirmaciones.

### 1.2.1 Pueblo Pikunche

El pueblo Pikunche o “gente del norte” en *Düngun*, era uno de los pueblos sedentarios que habitaban en la zona central de Chile, ocupando el territorio entre el río Limarí (Actual región de Coquimbo) y el río Itata (Actual región de Ñuble). Según dicen los cronistas, su vasta distribución geográfica, sumado al no tan numeroso tamaño poblacional y a los asentamientos dispersos en pequeños grupos, pueden haber sido factores que les impidieron oponer una gran resistencia frente a la llegada de los europeos, generando incluso un intercambio y negociación pacífica con ellos (Faron, 1960). Según Bengoa, esto permitió que tras varios años de conflictos y guerrillas de diversa intensidad, buena parte de los habitantes indígenas de esta zona migraran hacia el sur del país, terminaran confinados en reducciones llamadas Pueblos de Indios o se mezclaran con los españoles y criollos (Bengoa 2000). Hoy en día, el Pueblo Pikunche, producto de los fenómenos de mezcla genética, aculturación e invisibilización durante la colonia y la república, se presume por parte del Estado de Chile como extinto y, por tanto, no cuenta con el reconocimiento de este en la ley 19.253 ni en las modificaciones a ésta (Ley N°21.273).

### 1.3 DNA mitocondrial

Los marcadores uniparentales, como el DNA mitocondrial y el Cromosoma Y, han tenido un rol protagónico en el estudio genético de las poblaciones humanas, proporcionando nuevas perspectivas sobre el origen e historia de los primeros pobladores de América, además de permitir estimaciones de divergencia y migración de diferentes poblaciones a través del tiempo (Berrios S, 2016; Arnaiz Villena et al., 2010; Bisso-Machado et al., 2012). El genoma mitocondrial humano (*Figura 1*) es una molécula circular de doble hebra de aproximadamente 16,6 kb que contiene solo 37 genes: 13 codifican para proteínas necesarias para la fosforilación oxidativa mitocondrial, 2 RNAs ribosomales y 22 RNAs de transferencia (Gustafsson et al., 2016; Zou et al., 2020).

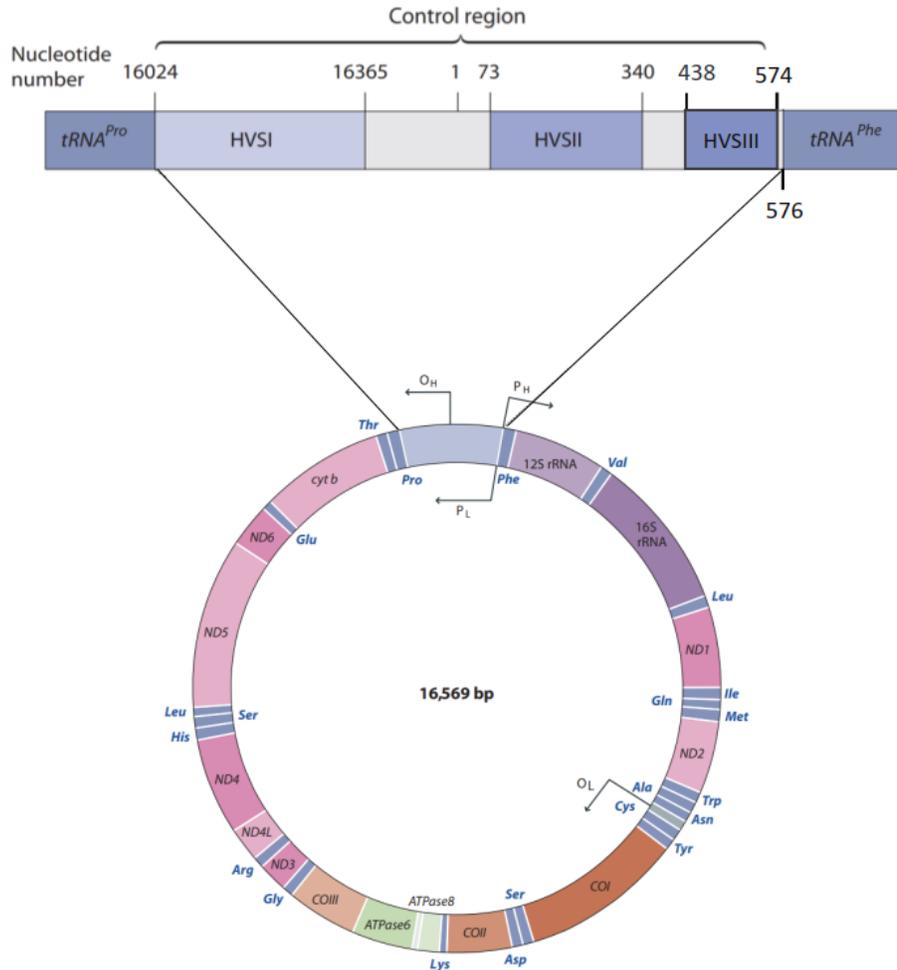
En el genoma mitocondrial, todos los genes carecen de intrones, sin embargo, existe una única larga región no codificante, de aproximadamente 1200 pb, también conocida como región control o Displacement loop, D-loop (Gustafsson et al., 2016). Dentro de esta región se encuentran tres regiones o segmentos hipervariables (HVI, HVII y HVIII), que poseen una tasa de mutación diez veces mayor a la del DNA nuclear (Taanman, 1999), posiblemente debido al daño causado por los altos niveles de especies reactivas de oxígeno, ROS, a los que está expuesto, junto con su alta frecuencia de replicación, en

comparación al DNA nuclear (Mattiuzzi et al., 2004). En la región control también se encuentran los sitios de inicio de replicación de la cadena ligera y pesada del mtDNA, y los principales promotores para la transcripción, por lo que es fundamental para la mantención y funcionamiento del genoma mitocondrial (Li et al., 2020).

### **1.3.1 Herencia materna**

En mamíferos, las mitocondrias paternas se encuentran empaquetadas, en forma de hélice, en la porción media de los espermatozoides, estructura que une la cabeza con el flagelo del mismo (Lehti & Sironen, 2017). Algunas de estas mitocondrias entran al ovocito durante la fecundación, para posteriormente ser eliminadas durante la embriogénesis temprana. Proteínas de membrana mitocondrial presentes en los espermatozoides, son ubiquitinadas previo a la fertilización y, una vez dentro del ovocito, estas mitocondrias paternas son degradadas, mediante proteasoma y/o lisosomas (Punzi et al., 2018; Sato & Sato, 2013; Sutovsky et al., 1999; Zou et al., 2020). Este proceso de degradación activa permite que el mtDNA sea heredado exclusivamente por vía materna, otorgándole la característica de “Herencia materna”.

A diferencia del DNA nuclear, el mtDNA no sufre proceso de recombinación, por lo que su secuencia varía solo a través de la acumulación de las mutaciones maternas, permitiendo un seguimiento de linajes maternos a través de generaciones (Bisso-Machado & Fagundes, 2021).



**Figura 1. DNA mitocondrial humano.** En la figura se ve representado el mtDNA humano, circular cerrado y de doble hebra, con los genes que codifica: rRNA (12S y 16S); CO: subunidades citocromo C oxidasa; CYT b: citocromo b; ND: subunidades de NADH deshidrogenasa, entre otros. Además, se señalan los orígenes de replicación de la cadena pesada y liviana (*O<sub>H</sub>* y *O<sub>L</sub>*), y los promotores de la transcripción (*P<sub>H</sub>* y *P<sub>L</sub>*). En grande se observa la región no codificante o D-loop, los 3 segmentos hipervariables (HVS I, II y III), y posición nucleotídica y los genes que lo delimitan (*tRNA<sup>Pro</sup>* y *tRNA<sup>Phe</sup>*). Modificado de Jobling, M. A., Hurles, M., & TylerSmith, C. (2004).

### 1.3.2 Estudio genético de poblaciones humanas

Las variaciones puntuales que ocurren con una frecuencia mayor al 1% en la población, se denominan polimorfismos. Los SNPs, del inglés single nucleotide polymorphisms, se definen como una sustitución de una base en una posición específica del genoma (Riva & Kohane, 2002). Estas sustituciones pueden ser transiciones, es decir, sustitución de una

base pirimídica por otra pirimídica o una púrica por otra púrica, o transversiones, reemplazo de una base púrica por una pirimídica o viceversa (Taanman, 1999). Las inserciones y deleciones (indels) son variaciones que no se consideran formalmente como SNPs (Brookes, 1999).

Los SNPs son utilizados para el estudio de los linajes maternos. El conjunto de dos o más SNPs a lo largo del mtDNA, que se transmiten por generaciones se conoce como haplotipo, siendo los grupos monofiléticos de estos, es decir, aquellos que provienen de un ancestro común, los denominados Haplogrupos. El estudio de los haplogrupos mitocondriales ha permitido avanzar en el entendimiento de la historia, el origen y migración de diferentes poblaciones, en términos de linajes maternos.

En los años 90, grupos de investigadores revelaron que las poblaciones originarias de América pertenecían a cuatro grandes Haplogrupos (o macro Haplogrupos) distintos, también conocidos como linajes fundadores: A, B, C y D, los cuales pueden ser definidos en base a cambios específicos de ciertos nucleótidos en la secuencia del DNA mitocondrial (Schurr et al., 1990; Torroni et al., 1993;) o del D-loop mitocondrial (Horai, 1994), posteriormente denominados A2, B2, C1 y D1 (Achilli et al., 2008; Bandelt et al., 2003). Estos cuatro linajes presentan un gradiente de frecuencia Norte-Sur a lo largo del continente americano, donde A2 y B2 se encuentran con mayor frecuencia en la zona norte y C1 y D1 en la zona Sur (Lorenz & Smith, 1996; Corella et al., 2007; García et al., 2006; Moraga et al., 2000). Más tarde, se propuso también el haplogrupo X como linaje fundador americano, presente en bajas frecuencias en poblaciones europeas modernas, mientras que en América se restringe a zonas acotadas de Norteamérica (Brown et al., 1998; Forster et al., 1996).

En Chile, estudios en poblaciones indígenas, urbanas y rurales, han resultado en el hallazgo y definición de diversos haplogrupos y haplotipos que derivan de los linajes fundadores, los que se pueden utilizar como marcadores genéticos para el estudio de poblaciones, estos son: A2, A2+(64), B2, B2i2, B2i2a, B2i2b, C1, C1b, C1b13, C1c, C1d, D1, D1g, D1j y D4h3a, entre otros (Crespo et al., 2018; De Saint Pierre et al., 2012 ; Perego et al., 2009). Estudios de poblaciones indígenas de Chile: Aymara, Atacameño, Mapuche, Pehuenche, Huilliche, Yámana y Kawésqar, muestran que el Haplogrupo A2 es más frecuente en las poblaciones del norte del país, llegando al 25% en Atacameño, presentándose en menor frecuencia en las demás poblaciones analizadas. El haplogrupo B2, por su parte, también presenta una mayor frecuencia en las poblaciones de la zona norte, Aymara y Atacameño, disminuyendo considerablemente hacia la zona Sur, donde las poblaciones Kawésqar y Yámana

presentan ausencia completa de este haplogrupo. Caso contrario, los haplogrupos C1 y D1 se encuentran con mayor frecuencia en las poblaciones de la zona sur del país (De Saint Pierre et al., 2012). Interesantemente, dentro de estos estudios, se han podido definir variantes de los haplogrupos B2, C1 y D1 que parecen estar restringidas exclusivamente a poblaciones de la zona sur de Sudamérica. B2i2, inicialmente designado como B2I, C1b13 y D1g, presentan altas frecuencias en las poblaciones indígenas de la zona centro/sur del País: Pehuenche, Mapuche y Huilliche (De Saint Pierre et al., 2012). Además, D4h3a5, variante del macrohaplogrupo D, parece estar restringido a patagones y fueguinos, específicamente Kawésqar y Yámana (Crespo et al., 2018; De Saint Pierre et al., 2012; Perego et al., 2009).

Conforme a lo anterior, otros estudios realizados en poblaciones mestizas actuales de Chile también han demostrado que los linajes B2i2, C1b13 y D1g, están presentes en mayor frecuencia en las poblaciones de la zona centro-sur del País, comparado con otras poblaciones de la zona norte y extremo sur de Chile (Gómez-Carballa et al., 2016; Pezo et al., 2022; Castillo Torres, 2021).

Dada su forma de herencia, el estudio del mtDNA de poblaciones mestizas con conocida ancestría amerindia materna, nos permitiría obtener información respecto de linajes maternos amerindios de poblaciones que hasta hoy se consideraban extintas. Es por esto que, en la presente Memoria de Título se analizó una muestra de individuos que por apellido, costumbres o territorio se adscriben al pueblo Pikunche, quienes provienen de diversos sectores de la zona Central de Chile, distribuidos entre las regiones de Coquimbo y del Maule. Los resultados nos entregarán una aproximación a los linajes maternos presentes en la población Pikunche, lo que permitirá avanzar en la detección de linajes amerindios perdidos desde las poblaciones nativas actuales. Además, al vincularlos con otros linajes presentes tanto en la población chilena actual, como en muestras de poblaciones antiguas Nativas Americanas, podremos contribuir al entendimiento de la genética poblacional prehispánica del territorio de Chile Central, y los procesos demográficos asociados a ella.

## **2. Propósito del estudio**

El **propósito** de la presente Memoria de Título es **explorar los linajes maternos amerindios de un conjunto de individuos chilenos mestizos que se auto adscriben al pueblo Pikunche.**

## **3. Objetivos: general y específicos**

El **objetivo general** de este trabajo recae en analizar, a través del estudio de la región D-loop del DNA mitocondrial, los linajes maternos Amerindios del conjunto de individuos que se auto adscriben al Pueblo Pikunche. Para lograr esto se propusieron los siguientes **objetivos específicos:**

OE1: Caracterizar los linajes maternos Amerindios de un conjunto de individuos que se auto adscriben al pueblo Pikunche.

OE2: Comparar la población de estudio con otras poblaciones ancestrales de la zona norte, centro y sur del país.

## **4. Materiales y métodos**

### **4.1 Obtención de las muestras**

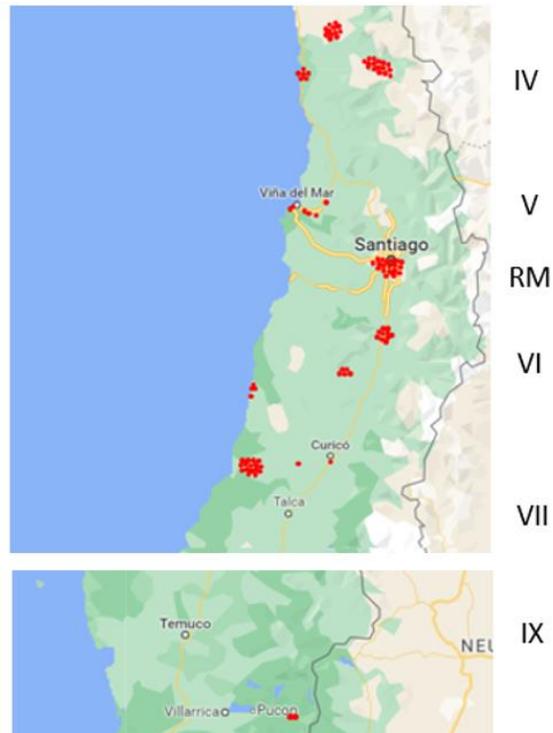
Se recolectaron un total de 109 muestras de individuos que se auto adscriben al pueblo Pikunche, distribuidos en diferentes localidades, en su mayoría, entre la región de Coquimbo y la región del Maule, a excepción de dos muestras que fueron obtenidas de la región de la Araucanía (*Figura 2*). Estas fueron posteriormente filtradas por parentesco directo, es decir, madre-hija/o-hermana/o, resultando un total de 100 muestras no relacionadas. Para la obtención de las muestras se realizó un hisopado bucal, del cual se obtuvo las células epiteliales para la posterior extracción del DNA. Para el hisopado se utilizaron dos collection swab (Cytoswab), uno para cada lado de la boca, los que se frotaron por 15 segundos en la cara interna de cada mejilla y fueron guardados en el mismo envase, en ausencia de un buffer estabilizador. Los Swabs retornaron al laboratorio entre 10 y 25 días después de haberse tomado la muestra.

Previo a la toma de muestra, cada uno de los participantes tuvo la posibilidad de leer detalladamente el consentimiento informado (*Anexo*), donde se explica el objetivo del proyecto, los posibles riesgos y se garantiza la total confidencialidad de los datos personales de cada participante en el estudio. Una vez resueltas las dudas se firmaron dos copias del documento, una de las copias se la quedó el participante y la otra nosotros. El consentimiento utilizado se enmarca en el Fondecyt 1181889, a cargo del Dr. Mauricio Moraga, presentado y aprobado por el Comité de ética de investigación en seres humanos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (acta de aprobación 025 del 12 de junio de 2018).

Es importante señalar que el muestreo fue realizado por algunos de los participantes del estudio, a los cuales se les instruyó sobre la técnica de toma de muestra, los que se repartieron entre las regiones de Coquimbo y el Maule. Para la selección de los participantes se recurrió al conocimiento de los propios colaboradores, aplicando criterios de vinculación territorial, presencia de apellidos indígenas, asociación a pueblos de indios, y características culturales, como la práctica de telar y/o cerámica entre otras. Dada la estrategia de muestreo el conjunto de individuos que se auto adscriben al pueblo Pikunche incluidos en este estudio no son una población biológica como tal, por lo que todos los resultados a nivel genético deben ser considerados con precaución. A pesar de ello, para efectos de los análisis de la presente memoria de título, se les considerará como una población.

Finalmente, los participantes tuvieron que llenar una encuesta (*Anexo*), con sus datos personales, y apellidos, lugar de nacimiento y lugar de residencia de sus padres y abuelos. Además, la encuesta tenía 3 preguntas sobre ascendencia e identificación a Pueblos Originarios.

**Figura 2. Mapa referencial de la toma de muestras.** En la figura se puede observar la posición geográfica de la toma de muestras (puntos rojos), distribuidas desde la región de Coquimbo hasta la región de la Araucanía. El mapa fue colapsado, eliminando la VIII región, para una mejor visualización. En el extremo derecho se señala el número y/o abreviación de las regiones: IV, cuarta región, región de Coquimbo; V, quinta región, región de Valparaíso; RM, región metropolitana; VI, sexta región, región Libertador Bernardo O'Higgins; VII, séptima región, región del Maule; IX, novena región, región de la Araucanía.



#### 4.2 Extracción DNA y Amplificación D-loop

La extracción del DNA se llevó a cabo mediante el kit Quick-DNA™ Miniprep Plus Kit, Zymo Research, siguiendo las instrucciones del fabricante: Primero, se agregó 200 µL de agua bidestilada más el Collection Swab en un tubo Eppendorf de 1,6 ml. Luego se agregó 200 µL de Buffer Red, buffer del kit que se utiliza para fluidos biológicos y células, vortex durante 10 segundos, para finalmente agregar 10 µL de Proteinasa K, mezclar e incubar a 55°C en baño termostático por 10 minutos. Pasado el tiempo, con unas pinzas previamente esterilizadas con etanol, se eliminó el collection swab, se agregó un volumen de Genomic Binding Buffer a la muestra digerida, vortex por 10-15 segundos para ser traspasado a las

columnas de sílica, Zymo-Spin™ IIC-XLR Column, en un tubo colector. Se centrifugó a 13000 rpm por 1 minuto, y se descartó el tubo colector con el contenido en su interior. Luego se agregaron 400 µL de DNA Pre-Wash Buffer a la columna en un nuevo tubo colector, se centrifugó a 13000 rpm por 1 minuto, y el contenido del tubo colector fue vaciado. Posteriormente, se realizaron 2 lavados seguidos con g-DNA Wash Buffer, el primero con 700 µL y el segundo con 200 µL, eliminando el contenido el tubo luego de la centrifugación. En la centrifugación posterior al segundo lavado, se descartó el tubo colector. Se transfirió la columna a un tubo Eppendorf limpio y nuevo, y se agregaron 50 µL de DNA Elution Buffer, se incubó por 5 minutos, y luego fue centrifugado a 13000 rpm por 1 minuto. Finalmente, la columna fue descartada, para posteriormente rotular y guardars a 4°C el contenido eluído en el tubo eppendorf. Los DNAs extraídos fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, en Buffer TAE 1x, teñido con bromuro de etidio.

Para la amplificación de la región D-loop del mtDNA, se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa o PCR convencional (Mullis et al., 1986), con partidores específicos (*Tabla 1*), generando un amplicón de aproximadamente 1500 pb. El medio para cada reacción consistió en agua bidestilada, 5X Green GoTaq® Flexi Buffer, 0,2 mM de dNTPs; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,5 µM de cada partidor y 0,04 u/µL de GoTaq® DNA Polymerase, por 2 µL de DNA. Como control negativo se utilizó el mismo medio de reacción, pero sin agregarle el DNA. El programa de PCR se realizó en las siguientes condiciones: un ciclo inicial de denaturación a 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos a 94°C por 45 segundos, 60 °C por 45 segundos, 72°C por 55 segundos, y un ciclo de extensión final a 72°C por 7 minutos. La amplificación de los fragmentos se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en buffer TAE 1X, utilizando el ladder de 1kb, Thermo Scientific™ GeneRuler™, como estándar de peso molecular y bromuro de etidio para la posterior visualización en el Transiluminador ultravioleta.

Tabla 1. Partidores utilizados para la amplificación de la región D-loop del DNA mitocondrial.

Partidor	Posición	Secuencia	Forward/Reverse	Referencia
<b>F15792</b>	15792-15811	TCA TTG GAC AAG TAG CAT CC	Forward	Reider et al. 1998
<b>M14</b>	708-727	AGG GTG AAC TCA CTG GAA CG	Reverse	Lab Uchile

La secuenciación del producto de PCR se llevó a cabo por Macrogen en Corea del Sur, mediante el método de Sanger (Sanger & Coulson, 1975), utilizando los partidores descritos en la *Tabla 2*.

Tabla 2. Partidores utilizados para la secuenciación de la región D-loop del DNA mitocondrial.

Partidor	Posición	Forward/Reverse	Región D-loop	Secuencia	Tm	Referencia
<b>M1</b>	15978-15997	Forward	HV1	CAC CAT TAG CAC CCA AAG CT	55	Lab Uchile
<b>F16475</b>	16475-16495	Forward	HV2	TAG CTA AAG TGA ACT GTA TCC	NA	Bailliet et al. 1994
<b>M3rev</b>	8-29	Reverse	HV1	GTG GTT AAT AGG GTG ATA GAC C	NA	Lab Uchile
<b>R698</b>	677-698	Reverse	HV2	GCA TGT GTA ATC TTA CTA AGA G	55	Handt et al. 1996
<b>F315</b>	314-333	Forward	HV2	CCG CTT CTG GCC ACA GCA CT	50	Brandstätter et al. 2004
<b>R484</b>	465-484	Reverse	HV2	TGA GAT TAG TAG TAT GGG AG	55	NA
<b>MM4</b>	16218-16237	Reverse	HV1	TGT GTG ATA GTT GAG GGT TG	51	Lab Uchile
<b>MM7</b>	16268-16287	Reverse	HV1	CAC TAG GAT ACC AAC AAA CC	51	Lab Uchile
<b>MM8</b>	16383-16402	Reverse	HV1	TGG TCA AGG GAC CCC TAT CT	51	Lab Uchile

### 4.3 Análisis de secuencias y asignación de Haplogrupos

Las secuencias fueron analizadas y editadas en el programa *Geneious Prime V9.0.2* ([www.geneious.com](http://www.geneious.com)). Las secuencias se alinearon contra la secuencia de referencia de Cambridge, CSR (Andrews et al., 1999), se generaron los contigs y se exportaron en formato FASTA. Se utilizó la plataforma digital *mtDNA profiler* (Yang et al., 2013) para reconocer los polimorfismos correspondientes en cada individuo. Esta plataforma nos genera un archivo .hsd, que se utilizó posteriormente para identificar los haplogrupos correspondientes a cada individuo, en el programa *Haplogrep2 v.2.2* (Weissensteiner et al., 2016). *Haplogrep* genera una clasificación automática de los haplogrupos mitocondriales utilizando como referencia PhyloTree 17 (van Oven & Kayser, 2009; van Oven, 2015). Esta plataforma también nos arroja, en formato PDF, un dendrograma basado en los haplogrupos y haplotipos presentes en las muestras.

Una vez obtenidos los haplogrupos, se calcularon las frecuencias relativas y absolutas de los haplotipos identificados en Haplogrep, y se realizó una tabla con los resultados obtenidos (*Figura 4*).

#### **4.4 Índice de diversidad genética**

Para calcular los índices de diversidad genética, se eliminaron 9 muestras por parentesco directo, y una muestra adicional que no pudo secuenciarse completamente, utilizándose un total de 99 muestras.

Primero, se realizó un alineamiento múltiple en *MEGA X V10.1.8* contra la secuencia de referencia de Cambridge, CRS (Andrews et al., 1999), donde se eliminaron las siguientes posiciones (transiciones, transversiones y/o indels): 16182; 16183; 16192.1C; 19193.1C; 309.1C; 315.1C; 523; 524; 554, sitios de alta variabilidad que no son informativos para los análisis posteriores. Una vez obtenido el alineamiento múltiple, se utilizó el software *DNASp 5.1* (Librado & Rozas, 2009) para determinar los índices de diversidad genética del grupo de estudio, esto es, n: número de individuos; h: número de haplotipos; s: número de sitios polimórficos; Hd: diversidad haplotípica; K: número promedio de diferencias de nucleótidos por pares; Pi ( $\pi$ ): diversidad nucleotídica.

Además, a partir del alineamiento múltiple de las secuencias D-loop del grupo de estudio se construyó un árbol filogenético que relaciona las muestras en base a los polimorfismos presentes en las secuencias (*Anexo*), más no por haplogrupos.

#### **4.5 Análisis estadísticos y de estructura poblacional**

Para los análisis posteriores fueron necesarias las frecuencias de los haplotipos de diferentes poblaciones nativas y mestizas, que se utilizaron como referencia para compararlas con el grupo de estudio. Los datos de poblaciones nativas corresponden a grupos nativos del Norte de Chile: Aymara y Atacameño (De Saint Pierre et al., 2012) y grupos nativos del sur de Chile: Pehuenche y Huilliche (De Saint Pierre et al., 2012). Los datos de las poblaciones mestizas corresponden a San Felipe/Los Andes, Santiago, Concepción (Pezo et al., 2022), San Carlos (Catillo Torres, 2021), y La Serena/Coquimbo al cual se le aplicó un filtro de población rural (Pezo et al., 2022).

Para analizar la estructura poblacional y la diferenciación genética entre el grupo de estudio y las poblaciones de referencia, a partir de las frecuencias relativas de los haplotipos A2; A2+(64); B2; B2i2; B2i2a; B2i2b; C1; C1b; C1b13; C1d; D1; D1g; y D4h3a, se calculó una

matriz de distancia genética entre pares de poblaciones, dejando fuera los haplogrupos No merindios, con el estadístico  $F_{st}$ , a través del programa Arlequín (Excoffier & Lischer, 2010).

A partir de la matriz de  $F_{st}$ , se construyó un dendrograma NeighbourJoining en el software *MEGA X V10.1.8* (Kumar et al., 2018), el cual permitió visualizar de manera gráfica las distancias genéticas entre el grupo de individuos estudiados y las poblaciones de referencia. Luego, con las frecuencias relativas de los linajes previamente nombrados, se aplicó el análisis estadístico, PCA, en el programa *R Studio* (R Studio, 2020), para evaluar y observar de manera gráfica las distancias genéticas del grupo de estudio y las poblaciones de referencia.

Se construyeron redes de haplotipos para los Macrohaplogrupos B, C y D, ya que no existían datos suficientes para el Haplogrupo A. Estas redes se construyeron mediante el software *Network V10.2*, utilizando el algoritmo Median-Joining (Free Phylogenetic Network Software, 2020). Para la construcción de los *networks* o redes de haplotipos, fueron previamente eliminados los sitios 152, 309.1C, 309.2CC, 315.1C, 523d, 524d, 16182, 16183, 16193.1C y 16519, y a los sitios hotspot 146, 195, 16189, 16311 se les bajo el peso molecular a 1, para no perjudicar los resultados (Soares et al., 2009), a excepción del macrohaplogrupo B, que mantuvo el sitio 16193.1C.

Finalmente, se dividió el conjunto de individuos que se auto adscriben al pueblo Pikunche según el lugar de residencia de la madre, generando dos categorías: Pikunche Norte que contempla a los individuos de las regiones de Coquimbo y Valparaíso, y Pikunche Sur, que contempla a los individuos de las regiones Metropolitana, O'Higgins y Maule. A estas nuevas categorías también se les estimó la diferenciación genética y se les realizó el análisis de PCA, con las poblaciones de referencia. Paralelamente, se realizó otra división con el mismo criterio, pero esta vez generando tres categorías: Pikunche Norte, que contempla la región de Coquimbo; Pikunche Centro que contempla la región de Valparaíso, Metropolitana y O'Higgins; y Pikunche Sur que contempla la región del Maule. Se les aplicó los mismos análisis que a las categorías anteriores.

## **5. Resultados**

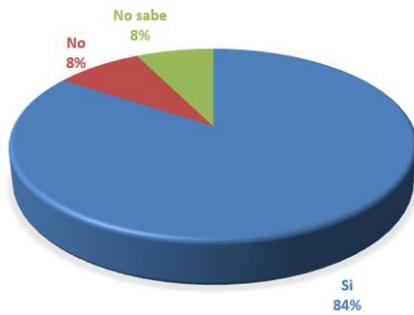
### **5.1 Caracterización de la muestra**

Junto con el consentimiento informado (*Anexo*), se realizó una encuesta a cada individuo involucrado en el estudio (*Anexo*). La encuesta requería de sus datos personales y los de sus padres y abuelos, además de tres preguntas específicas sobre si descienden, se identifican y/o pertenecen a un Pueblo Originario.

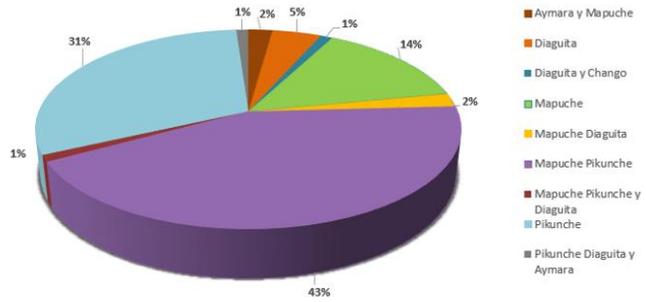
Al analizar las respuestas a las preguntas específicas sobre la identificación con los Pueblos Originarios (*Figura 3*), se obtuvo que el 84% de los encuestados se considera descendiente o tiene algún antepasado perteneciente a algún Pueblo Indígena Originario; mientras que el 16% no, o no tiene conocimiento al respecto (*Figura 3*). De las personas que sí poseen antepasados o son descendientes de algún pueblo, al precisar a qué pueblo en particular pertenecen, la mayoría dice ser descendiente Mapuche-Pikunche, seguido de Pikunche y Mapuche. En cuanto a la identificación con alguna Etnia Indígena, el 88% dice sentirse identificado con alguna; mientras que el 12% no o no lo sabe. Dentro de las Etnias mencionadas por el 88%, la mayoría dice identificarse con Mapuche-Pikunche, Mapuche y Pikunche. Finalmente, de todos los encuestados, solo el 35% dice pertenecer a una comunidad o asociación indígena.

Finalmente, al analizar tanto los apellidos paternos y maternos de los individuos del grupo de estudio, se observó que la mayoría (70% y 78% respectivamente) es de origen Europeo Español. Además, al analizar los dos apellidos de los padres de cada individuo, se encontró que: 30 individuos tienen padres que presentan un apellido indígena Mapuche, 10 que presentan dos apellidos y solo uno que los padres presentan tres apellidos indígenas.

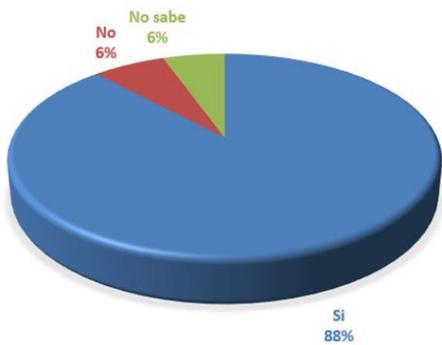
¿ES USTED DESCENDIENTE O TIENE ANTEPASADOS DE ALGÚN PUEBLO INDÍGENA ORIGINARIO?



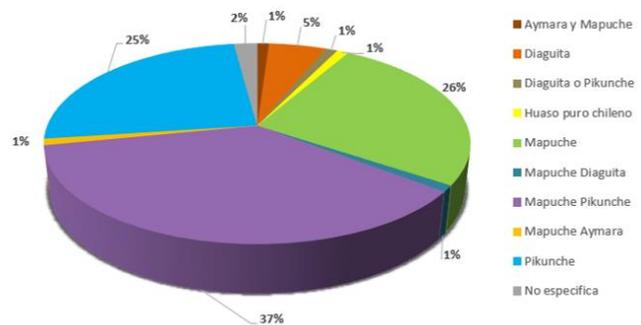
Si, ¿cuál?



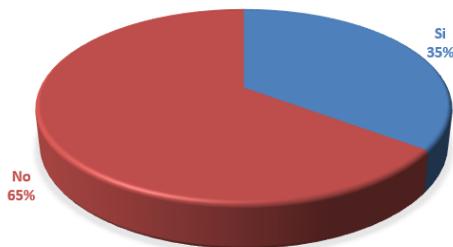
¿SE SIENTE IDENTIFICADO CON ALGUNA ÉTNIA INDÍGENA?



Si, ¿Cuál?



¿PERTENECE A UNA COMUNIDAD O ASOCIACIÓN INDÍGENA?

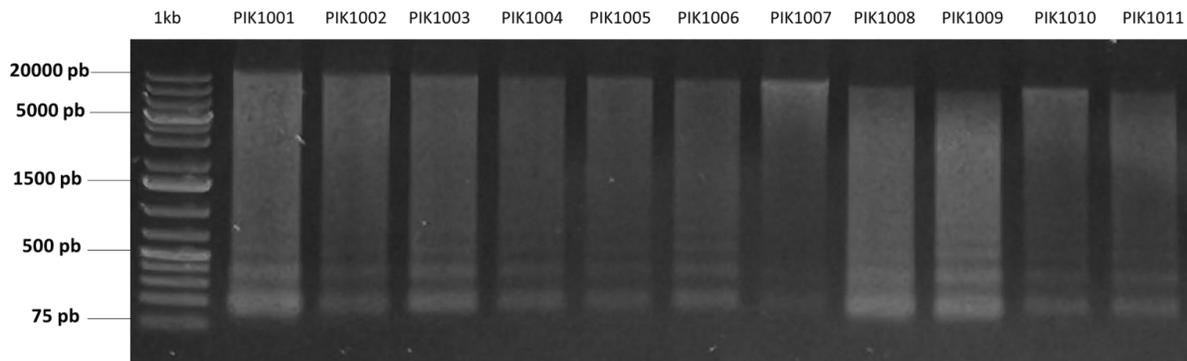


**Figura 3. Gráficos informativos sobre ascendencia, identidad y pertenencia de cada individuo del conjunto que se auto adscribe al pueblo Pikunche.** Cada gráfico representa cada una de las preguntas de la encuesta. Se muestran los porcentajes de las respuestas de los individuos. En los gráficos Si, ¿Cuál?, los diferentes colores representan las categorías de poblaciones a las cuales se sienten identificados y/o son descendientes.

## 5.2 Extracción DNA, Amplificación y Secuenciación de región D-loop

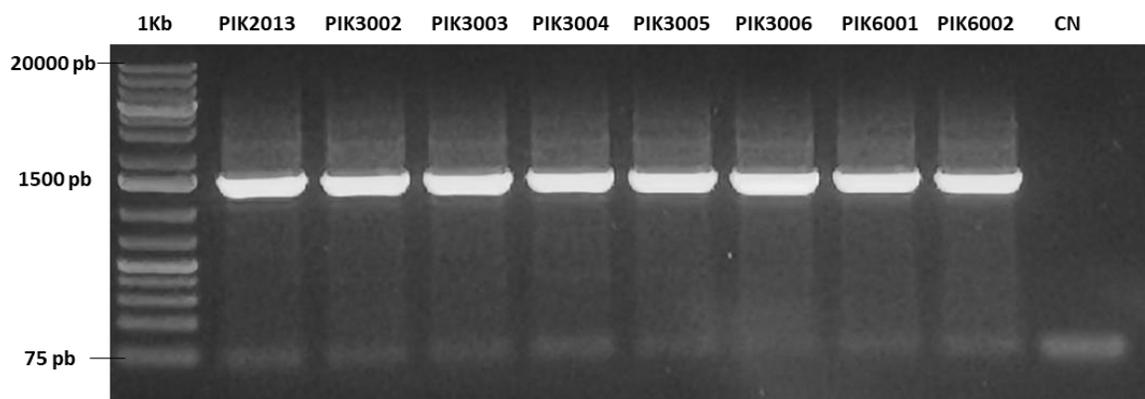
Se extrajo el DNA de las 109 muestras del conjunto de individuos que se auto adscriben al pueblo Pikunche, siguiendo la metodología previamente mencionada. Todas las muestras fueron previamente asignadas con un código de identificación según el lugar de toma de muestra.

En cuanto a la cantidad y calidad de DNA obtenido de las muestras, en la *Figura 4* se observa el perfil electroforético del DNA genómico extraído de 11 de las 109 muestras. Se puede observar que todas las muestras poseen DNA genómico de alto peso molecular, sobre los 5.000 pb; no obstante, se puede observar que la intensidad de esta es variable, es decir, existen muestras como PIK1007, que presentan una mayor intensidad a los 20.000pb; y muestras como PIK1004, que posee una intensidad notoriamente menor. Al observar el perfil electroforético, es posible notar un patrón de bandas de bajo peso molecular, menor a 500 pb, en todas las extracciones, que parece ser independiente de la cantidad y calidad del DNA. Se obtuvo un resultado similar en las 98 muestras restantes.



**Figura 4. DNA genómico de muestras epiteliales bucales de individuos que se auto adscriben al pueblo Pikunche.** Todas las muestras fueron extraídas mediante el Kit Quick-DNA™ Miniprep Plus Kit, Zymo Research. En el primer carril se muestra el Ladder de 1kb, y los 11 carriles restantes corresponden a 11 de las 109 muestras extraídas. Se observan bandas de alto peso molecular correspondientes al DNA genómico, con diferentes intensidades. Se observa un patrón de bandas de bajo peso molecular, entre los 75 y 500pb, presente en todas las muestras extraídas.

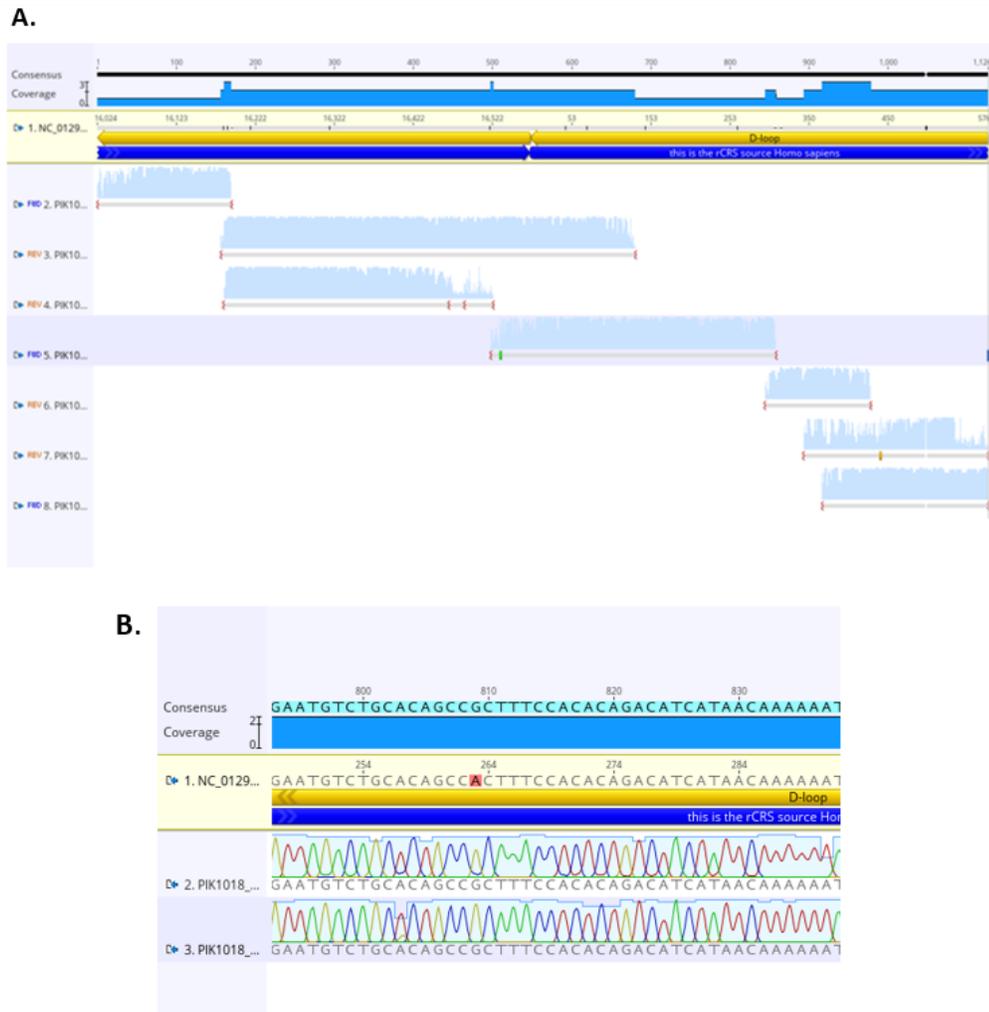
Se amplificó la región D-loop del DNA mitocondrial de las 109 muestras. La *Figura 5* muestra la amplificación de 8 de las 109 muestras analizadas, siguiendo la metodología previamente mencionada. Las 109 muestras fueron amplificadas de manera exitosa, resultando en un amplicón de aproximadamente 1500 pb. El control negativo no amplificó, por lo que solo se observa una banda de bajo peso molecular, al igual que en el resto de las muestras, que corresponde muy probablemente a dímeros de partidores.



**Figura 5. Amplificación región D-loop de muestras de individuos que se auto adscriben al pueblo Pikunche.** En el primer carril se muestra el Ladder de 1kb, mientras que los siguientes 8 carriles muestran la exitosa amplificación de la región D-loop del DNA mitocondrial en 8 de las 109 muestras, de 1500 pb. CN corresponde al control negativo.

Posterior a la secuenciación de la región D-loop de los 109 individuos, las secuencias fueron analizadas mediante el software Geneious prime v9.0.2 ([www.geneious.com](http://www.geneious.com)), como se mencionó en el apartado 4.3 de materiales y métodos. La Figura 6A muestra, a modo de ejemplo, la elaboración del contig de una de las muestras más complejas. Para este caso en particular, la muestra tuvo que ser secuenciada con siete partidores diferentes, forward y reverse, para poder cubrir la región d-loop completa, debido a la presencia de una zona Poli C, es decir varias citocinas seguidas y/o dos o tres inserciones simultaneas en las posiciones 309.1C, 309.2CC y 315.1C, lo que dificulta la actividad de la polimerasa, afectando la secuenciación, o disminuyendo la calidad de la secuencia. No todas las secuencias analizadas tuvieron que ser secuenciadas con tantos partidores, algunas solo necesitaron dos. En la figura 6B, se puede observar también a modo de ejemplo, un polimorfismo en la posición 263. La primera secuencia muestra que en esa posición el

individuo posee una guanina (G) en vez de una adenina (A), presente en la secuencia de referencia; sin embargo, esa secuencia presentó un poco de ruido, por lo que la segunda secuencia confirma, limpia y claramente, la existencia de la transición.



**Figura 6. Análisis de secuencias de la región D-loop de los individuos que se auto adscriben al pueblo Pikunche. A.** Elaboración del contig. En amarillo, se observa la secuencia de referencia. Debajo se observan las secuencias generadas por diferentes partidores, forward y reverse, que fueron necesarias para la formación del contig. **B.** En amarillo se observa la secuencia de referencia, con los respectivos nucleótidos. El nucleótido marcado representa un polimorfismo, y debajo se muestran las secuencias que lo confirman. En la parte superior, se observa la secuencia consenso que se forma al elaborar el contig.

### **5.3 Composición genética del conjunto de individuos que se auto adscriben al pueblo Pikunche**

A partir de las secuencias obtenidas, se realizó un dendrograma que distribuye a los individuos según los polimorfismos que presentan a lo largo de la región D-loop del DNA mitocondrial (*Anexo*). Se puede observar que la agrupación coincide con los haplogrupos y haplotipos asignados para cada individuo, y que el árbol se distribuye igual que el entregado por la plataforma *Haplogrep*, que se encuentra basado en los linajes mitocondriales del grupo de individuos en estudio.

En la *Tabla 3* se muestra la proporción de linajes maternos encontrados en el conjunto de individuos que se auto adscriben al pueblo Pikunche. Se puede observar que poseen una alta contribución de linajes americanos ancestrales, específicamente el 88,99%; mientras que la frecuencia de haplogrupos No-Amerindios (NA), representa el 11,01% del grupo de estudio. Respecto a los linajes Amerindios, el macrohaplogrupo A es el que se encuentra en menor proporción; siendo los macrohaplogrupos B, C y D, los que presentan una mayor frecuencia. En cuanto a la diversidad de haplotipos, el Macrohaplogrupo D es el que presenta mayor cantidad de haplotipos distintos, seguido de B, C y A, respectivamente, de los cuales, los haplotipos B2i2b, C1b13 y D1g son los que presentan una mayor frecuencia dentro del grupo de estudio.

Trabajos previos del laboratorio de investigación que involucraron más de 3000 muestras de todo el País, analizaron polimorfismos de la región codificante del mtDNA, mediante el uso de enzimas de restricción. Se evidenció que todos los haplogrupos B, equivocadamente asignados por la plataforma haplogrep como B4b, a partir de secuencias de D-loop mitocondrial, son en realidad B2. Esto, ya que los polimorfismos que diferencian a B4b de B2, se encuentran en la región codificante del DNA mitocondrial (Wood et al., 2019), por lo que los dos individuos reconocidos como B4b, fueron agrupados dentro del haplogrupo B2\*. Respecto al 11,01% que corresponde a los linajes No Amerindios, se puede observar que hay 10 haplotipos distintos. Los linajes presentes son europeos (K1a, K1b1a, U4c1, V, H3p y H1cf) y africanos (L1c1a2, L1c3b1a y L2d). A excepción de W3a1 que se encuentra en Europa y en el subcontinente Indio (Fregel et al., 2019; Batini et al., 2007; Behar et al., 2012; Fernandes et al., 2012; Harich et al., 2010; Maier et al., 2022)

Tabla 3. Proporción de linajes mitocondriales encontrados en el conjunto de individuos que se auto adscriben al pueblo Pikunche.

Macrohaplogrupo	Frecuencia Absoluta	Porcentaje	Haplotipos	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa			
<b>A2</b>	5	4,59%	A2+(64)	2	0,018			
			A2+(64)+16189	2	0,018			
			A2a3	1	0,009			
<b>B2</b>	30	27,52%	B2c2b	1	0,009			
			B2d	1	0,009			
			B2i2	1	0,009			
			B2i2a	3	0,028			
			B2i2a1	3	0,028			
			<b>B2i2b</b>	<b>11</b>	<b>0,101</b>			
			B2i2b1	3	0,028			
			B2o	3	0,028			
			B2v	2	0,018			
			B2*	2	0,018			
			<b>C1</b>	31	28,44%	C1	2	0,018
						C1b	4	0,037
<b>C1b13</b>	<b>18</b>	<b>0,165</b>						
C1b13d	2	0,018						
C1d+194	4	0,037						
C1d1*1	1	0,009						
<b>D</b>	31	28,44%				D1	1	0,009
			<b>D1g</b>	<b>8</b>	<b>0,073</b>			
			D1g+16189	1	0,009			
			D1g1	2	0,018			
			D1g1b	3	0,028			
			D1g2*1	2	0,018			
			D1g2*2	1	0,009			
			D1g2a	4	0,037			
			D1g4*	1	0,009			
			D1g5	1	0,009			
			D1g6	2	0,018			
			D4h3a2	5	0,046			
			<b>NA</b>	12	11,01%	H1cf	1	0,009
H3p	1	0,009						
K1a	1	0,009						
K1b1a2	1	0,009						
L1c1a2	1	0,009						
L1c3b1a	1	0,009						
L2d+16129	1	0,009						
U4c1	1	0,009						
V+@16298	2	0,018						
W3a1+199	2	0,018						
<b>Total</b>	<b>109</b>	<b>100,00%</b>		<b>109</b>	<b>1,000</b>			

#### **5.4 Índices de diversidad genética estándar**

Se analizaron los índices de diversidad genética estándar del conjunto de individuos que se auto adscribe al pueblo Pikunche (*Tabla 4*). Para el análisis se eliminaron 9 individuos por parentesco directo, más una muestra que no pudo secuenciarse completamente, por lo que el número de individuos ( $n$ ) utilizado fue 99.

Para garantizar la correcta interpretación de los índices de diversidad genética estándar, es importante reiterar que, si bien se decidió abordar al grupo de estudio Pikunche como una población, la estrategia de muestreo y la distribución geográfica de los participantes no es del todo compatible con esta asignación. Esta situación podría restar validez a los valores calculados para los índices de diversidad genética estándar, por lo que los valores obtenidos deben ser analizados con prudencia.

Al comparar los valores obtenidos de Pikunche con las poblaciones de referencia, damos cuenta que todas las poblaciones poseen valores similares de diversidad haplotípica ( $H_d=0,976$  a  $H_d=0,993$ ); número promedio de diferencia de nucleótidos ( $K=10,561$  a  $K=14,574$ ) y diversidad nucleotídica ( $\pi=0,011$  a  $\pi=0,014$ ). Sin embargo, en cuanto a diversidad haplotípica, Pikunche posee valores más cercanos a las poblaciones de Serena/Coquimbo, Santiago, San Carlos y Concepción. Al observar en detalle, también damos cuenta que Pikunche posee valores más cercanos del número promedio de diferencia de nucleótidos con poblaciones de Serena/Coquimbo y Santiago. Asimismo, los valores de diversidad nucleotídica de Serena/Coquimbo y San Carlos, son los que más se asemejan a Pikunche. Por otra parte, al observar el número de sitios segregantes o sitios polimórficos, los valores no son uniformes como en los otros índices, pudiéndose observar claramente que Pikunche posee valores más cercanos a las poblaciones de Santiago, San Carlos y Concepción, poblaciones mestizas de la zona centro-sur de Chile.

Tabla 4. Índices de diversidad genética estándar del conjunto de individuos que se auto adscriben al pueblo Pikunche y poblaciones de referencia.

<b>Población</b>	<b>n</b>	<b>h</b>	<b>S</b>	<b>Hd</b>	<b>K</b>	<b><math>\pi</math></b>	<b>Ref.</b>
<b>Aymara</b>	39	34	77	0,993	12,110	0,012	(de Saint Pierre et al., 2012)
<b>Atacameño</b>	28	22	64	0,976	14,574	0,014	(de Saint Pierre et al., 2012)
<b>Serena/Coquimbo</b>	65	39	71	0,982	11,984	0,011	(Pezo et al., 2022)
<b>San Felipe</b>	96	72	98	0,992	12,008	0,013	(Pezo et al., 2022)
<b>Santiago</b>	186	111	107	0,986	11,202	0,012	(Pezo et al., 2022)
<b>Pikunche</b>	99	66	125	0,984	11,761	0,011	(Este estudio)
<b>San Carlos</b>	138	86	133	0,988	12,733	0,011	(Castillo Torres, 2021)
<b>Concepción</b>	200	111	111	0,984	10,561	0,012	(Pezo et al., 2022)
<b>Pehuenche</b>	42	17	49	0,923	13,165	0,013	(de Saint Pierre et al., 2012)
<b>Huilliche</b>	58	32	66	0,969	13,203	0,013	(de Saint Pierre et al., 2012)

N: número de individuos; h: número de haplotipos; S: número de sitios segregantes; Hd: diversidad haplotípica; K: número promedio de diferencias de nucleótidos por pares; Pi ( $\pi$ ): diversidad nucleotídica.

## 5.5 Estructura Poblacional

### 5.5.1 Estadístico F (Fst) y Dendrograma de Neighbour-Joining

Se estimó la diferenciación genética entre el grupo de estudio y las poblaciones de referencia, a través del estadístico F, Fst, el cual está directamente relacionado con la variación de las frecuencias de alelos entre y dentro de las poblaciones, por lo que es una herramienta muy útil para analizar distancias genéticas entre pares de poblaciones (Holsinger and Weir, 2009; Wright, 1984).

Los valores de Fst obtenidos en la matriz van desde -0,00622 a 0,34642 (*Figura 7A*). Los valores negativos son interpretados como 0, ya que los valores de Fst van de 0 a 1, donde 0 indica que no existe diferenciación entre las poblaciones, y 1 indica una diferenciación completa. Se considera una baja diferenciación genética cuando los valores de  $F_{ST} < 0.05$  y alta cuando los valores de  $F_{ST} > 0.15$  (Govindaraju, 1989).

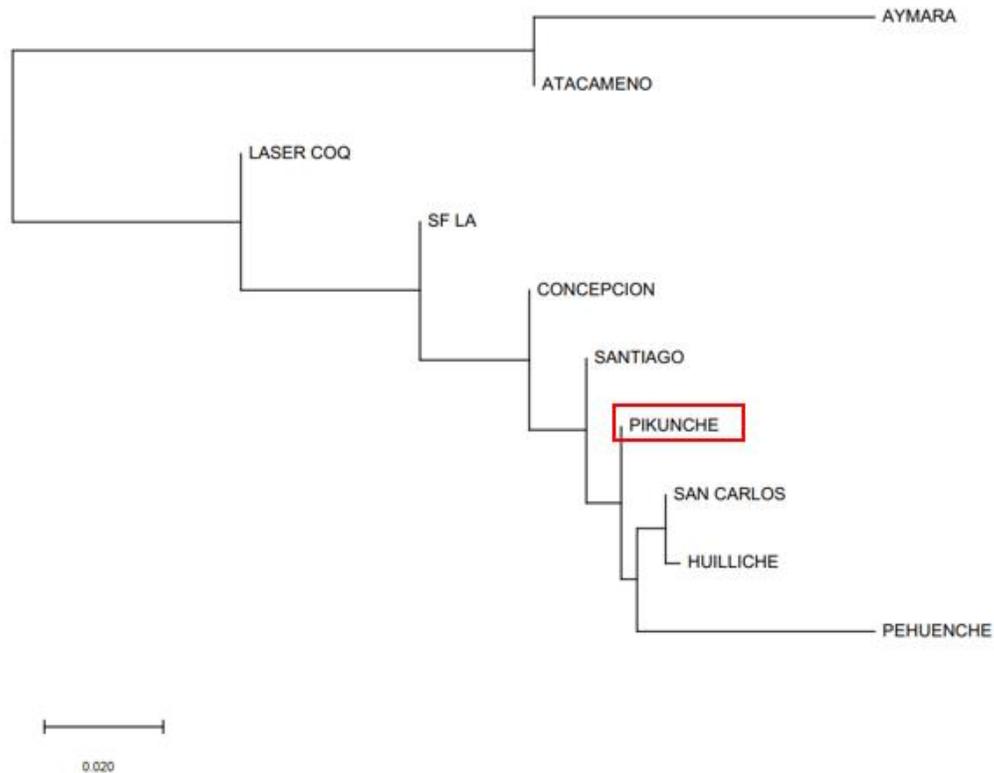
Tomando en cuenta las localidades donde se obtuvieron las muestras, se observa que los valores de Fst de Pikunche con las poblaciones de referencia aumentan a medida que también lo hace la distancia geográfica. La menor diferenciación genética de Pikunche es con las poblaciones Santiago, Concepción y San Carlos, ubicadas en la zona centro-sur de Chile; y la mayor diferenciación con las poblaciones Aymara y Atacameño, ubicadas geográficamente al extremo Norte del País.

Para una mejor visualización de lo anterior, se realizó un Dendrograma de Neighbour-Joining (*Figura 7B*). Se puede observar claramente la relación geográfica Norte-Sur con la formación de dos clados muy distantes entre sí, uno conformado por poblaciones del extremo norte de Chile, y el segundo por las poblaciones restantes, incluido Pikunche. En este último, se muestra un clado conformado por poblaciones de la zona centro-sur del país, donde se aprecia que existe una menor distancia entre Pikunche y la población de Santiago, Concepción, San Carlos, y Huilliche, posicionando geográficamente al grupo de estudio dentro de la zona centro-sur de Chile.

A.

	Aymara	Atacameño	La Serena/ Coquimbo	San Felipe	Santiago	Pikunche	San Carlos	Concepción	Pehuenche
Atacameño	<b>0,05386</b>								
La Serena/Coquimbo	<b>0,15396</b>	<b>0,09569</b>							
San Felipe	<b>0,19714</b>	<b>0,13995</b>	<b>0,01558</b>						
Santiago	<b>0,22511</b>	<b>0,16126</b>	<b>0,02214</b>	<b>0,01543</b>					
Pikunche	<b>0,21872</b>	<b>0,15581</b>	0,01168	<b>0,01400</b>	-0,00622				
San Carlos	<b>0,23011</b>	<b>0,17705</b>	<b>0,01715</b>	<b>0,03245</b>	0,00578	-0,00403			
Concepción	<b>0,20816</b>	<b>0,15414</b>	<b>0,01819</b>	<b>0,00935</b>	-0,00227	-0,00406	<b>0,00816</b>		
Pehuenche	<b>0,34642</b>	<b>0,28250</b>	<b>0,10659</b>	<b>0,09717</b>	<b>0,03336</b>	<b>0,03487</b>	<b>0,04411</b>	<b>0,03956</b>	
Huilliche	<b>0,29424</b>	<b>0,21649</b>	<b>0,03418</b>	<b>0,04459</b>	0,00979	0,00280	-0,00302	<b>0,01761</b>	<b>0,04589</b>

B.



**Figura 7. Fst y Dendrograma de Neighbour-Joining de Pikunche y las poblaciones de referencia. A.** Valores de Matriz de Fst. En negrita se destacan los valores significativos (P value <0.05). **B.** Dendrograma de Neighbour-Joining a partir de la matriz de Fst. En el recuadro rojo se destaca Pikunche y la diferenciación genética que presenta con las poblaciones de referencia. La regla en la esquina inferior izquierda indica la distancia genética.

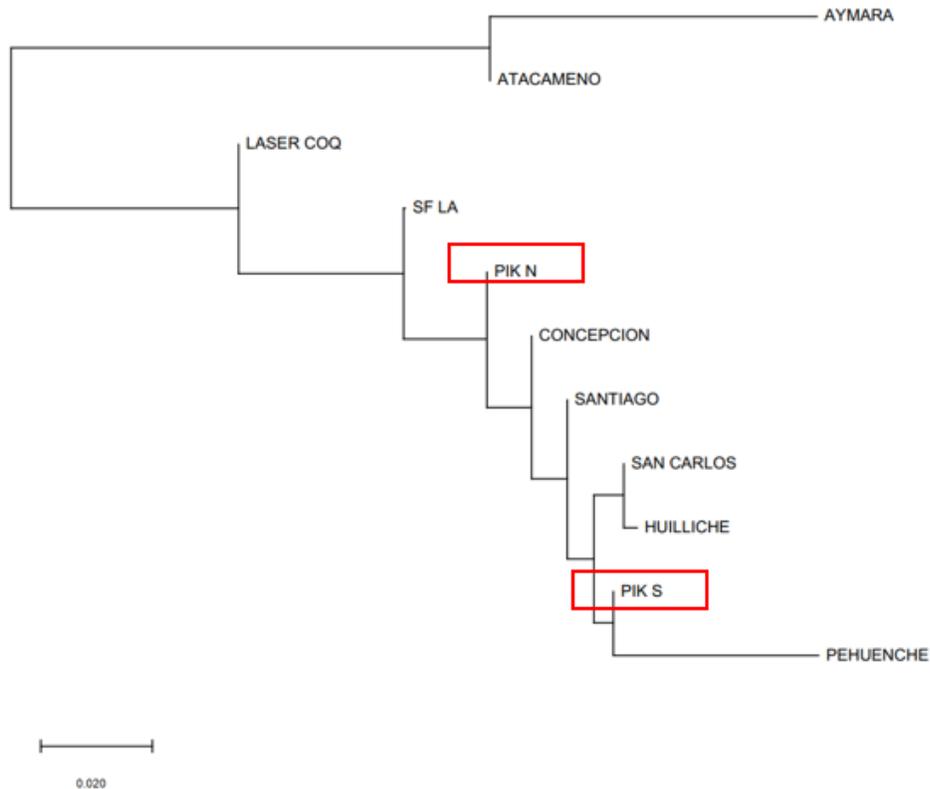
Posteriormente, se dividió el grupo de estudio en Pikunche Norte (PIK\_N, n=26) y Pikunche Sur (PIK\_S, n=62), según el lugar de nacimiento de la madre y se realizó el análisis con el estadístico F. Los valores de  $F_{st}$  oscilaron entre -0.01348 y 0.34642 (*Figura 8A*). Ambos, Pikunche Norte y Sur presentan la menor diferenciación con las poblaciones de Santiago, Concepción y San Carlos. Además, Pikunche Norte también exhibe una nula diferenciación ( $F_{st}=0$ ) con la población de La Serena/Coquimbo.

En el dendrograma de Neighbour-Joining (*Figura 8B*) también se observan los dos grandes clados que dividen la zona Norte con la zona centro/centro-sur del País. A diferencia del análisis realizado con el grupo de estudio completo, Pikunche Norte se encuentra más cercano a la población de San Felipe/Los Andes y Concepción, posicionándolo un poco más al norte que Pikunche. Asimismo, Pikunche Sur se encuentra más cercano a las poblaciones de Santiago, San Carlos y Huilliche, posicionándolo un poco más al Sur que Pikunche.

A.

	Aymara	Atacameño	La Serena/ Coquimbo	San Felipe	Santiago	Pikunche Norte	Pikunche Sur	San Carlos	Concepción	Pehuenche
Atacameño	<b>0,05383</b>									
La Serena/Coquimbo	<b>0,15396</b>	<b>0,09569</b>								
San Felipe	<b>0,19174</b>	<b>0,13995</b>	<b>0,01558</b>							
Santiago	<b>0,22511</b>	<b>0,16126</b>	<b>0,02214</b>	<b>0,01543</b>						
Pikunche Norte	<b>0,19237</b>	<b>0,12513</b>	-0,01348	0,01698	-0,00204					
Pikunche Sur	<b>0,24234</b>	<b>0,17241</b>	<b>0,02008</b>	0,01065	-0,00956	-0,00556				
San Carlos	<b>0,23011</b>	<b>0,17705</b>	<b>0,01715</b>	<b>0,03245</b>	0,00578	-0,01497	-0,00094			
Concepción	<b>0,20816</b>	<b>0,15414</b>	<b>0,01819</b>	<b>0,00935</b>	-0,00227	-0,00347	-0,00600	<b>0,00816</b>		
Pehuenche	<b>0,34642</b>	<b>0,28250</b>	<b>0,10659</b>	<b>0,09717</b>	<b>0,03336</b>	<b>0,05485</b>	<b>0,02855</b>	<b>0,04411</b>	<b>0,03956</b>	
Huilliche	<b>0,29424</b>	<b>0,21649</b>	<b>0,03418</b>	<b>0,04459</b>	0,00979	0,00286	0,00165	-0,00302	<b>0,01761</b>	<b>0,04589</b>

B.



**Figura 8. Fst y Dendrograma de Neighbour-Joining de Pikunche Norte y Pikunche Sur, con las poblaciones de referencia. A. Valores de Matriz de Fst. En negrita se destacan los valores significativos (P value <0.05). B. Dendrograma de Neighbour-Joining a partir de la matriz de Fst. En el recuadro rojo se destacan las divisiones Pikunche Norte (PIK\_N) y Pikunche Sur (PIK\_S) y la diferenciación genética que presenta con las poblaciones de referencia. La regla en la esquina inferior izquierda indica la distancia genética.**

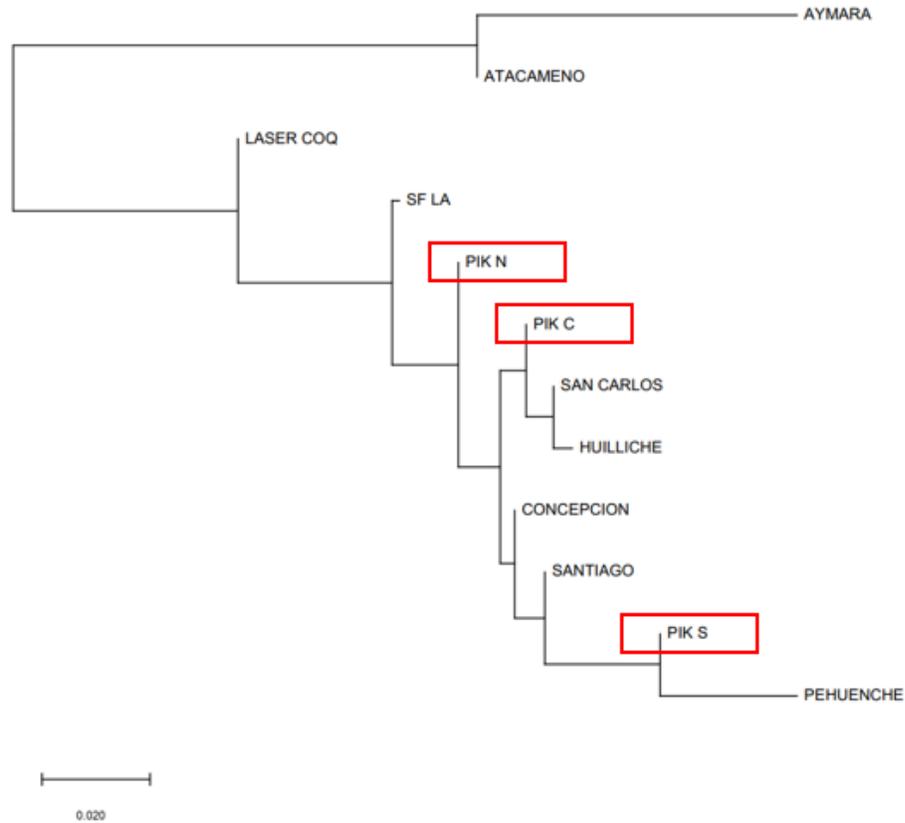
Finalmente, al dividir el grupo de estudio Pikunche en Pikunche Norte, Centro y Sur (PIK\_N, n=20; PIK\_C, n=41; y PIK\_S, n=27, respectivamente), los valores de la matriz de  $F_{st}$  oscilaron entre -0.01269 y 0.34642 (*Figura 9A*). En común, Pikunche Norte y Centro, poseen una menor diferenciación con la población de La Serena/Coquimbo, Santiago, San Carlos y Concepción; sin embargo, Pikunche Centro también presenta una diferenciación nula ( $F_{st}=0$ ) con Huilliche. Pikunche Sur, por su parte, presenta la menor diferenciación con las poblaciones de Santiago y Concepción, y una muy baja diferenciación con Pehuenche. Es más, de todas las poblaciones, Pikunche Sur es la que posee la menor diferenciación con Pehuenche. Al contrastar las tres divisiones del grupo de estudio, damos cuenta que presentan una muy baja diferenciación entre ellas; no obstante, Pikunche Centro y Pikunche Sur exhiben la mayor diferenciación entre ellas,  $F_{st}=0,013$ .

El dendrograma de Neighbour-Joining (*Figura 9B*), sigue mostrando la relación Norte-Sur con la formación de los dos grandes clados. Se puede observar que Pikunche Norte y Pikunche Centro se encuentran más cercanas entre sí, alejados de Pikunche Sur. Este último, se encuentra mucho más próximo a la población Pehuenche, comparado con el grupo de estudio Pikunche. Las tres divisiones se encuentran próximas a las poblaciones de Santiago y Concepción; no obstante, Pikunche Norte se ubica mucho más cerca de la población de San Felipe/Los Andes que Pikunche. Asimismo, se observa que Pikunche Centro forma un clado bastante cercano con las poblaciones de San Carlos y Huilliche.

A.

	Aymara	Atacameño	La Serena/ Coquimbo	San Felipe	Santiago	Pikunche Norte	Pikunche Centro	Pikunche Sur	San Carlos	Concepción	Pehuenche
Atacameño	<b>0,05386</b>										
La Serena/Coquimbo	<b>0,15396</b>	<b>0,09569</b>									
San Felipe	<b>0,19714</b>	<b>0,13995</b>	<b>0,01558</b>								
Santiago	<b>0,22511</b>	<b>0,16126</b>	<b>0,02214</b>	<b>0,01543</b>							
Pikunche Norte	<b>0,17870</b>	<b>0,12580</b>	-0,00572	0,01755	-0,00103						
Pikunche Centro	<b>0,23957</b>	<b>0,15988</b>	-0,00012	0,01079	-0,00404	-0,00486					
Pikunche Sur	<b>0,28133</b>	<b>0,20039</b>	<b>0,04356</b>	0,01779	-0,00872	-0,00046	0,01279				
San Carlos	<b>0,23011</b>	<b>0,17705</b>	<b>0,01715</b>	<b>0,03245</b>	0,00578	-0,01269	-0,00767	0,01312			
Concepción	<b>0,20816</b>	<b>0,15414</b>	<b>0,01819</b>	<b>0,00935</b>	-0,00227	-0,00316	-0,00114	-0,00532	<b>0,00816</b>		
Pehuenche	<b>0,34642</b>	<b>0,28250</b>	<b>0,10659</b>	<b>0,09717</b>	<b>0,03336</b>	0,04819	<b>0,06004</b>	0,00399	<b>0,04411</b>	<b>0,03956</b>	
Huilliche	<b>0,29424</b>	<b>0,21649</b>	<b>0,03418</b>	<b>0,04459</b>	0,00979	0,01240	-0,00896	0,02055	-0,00302	<b>0,01761</b>	<b>0,04589</b>

B.



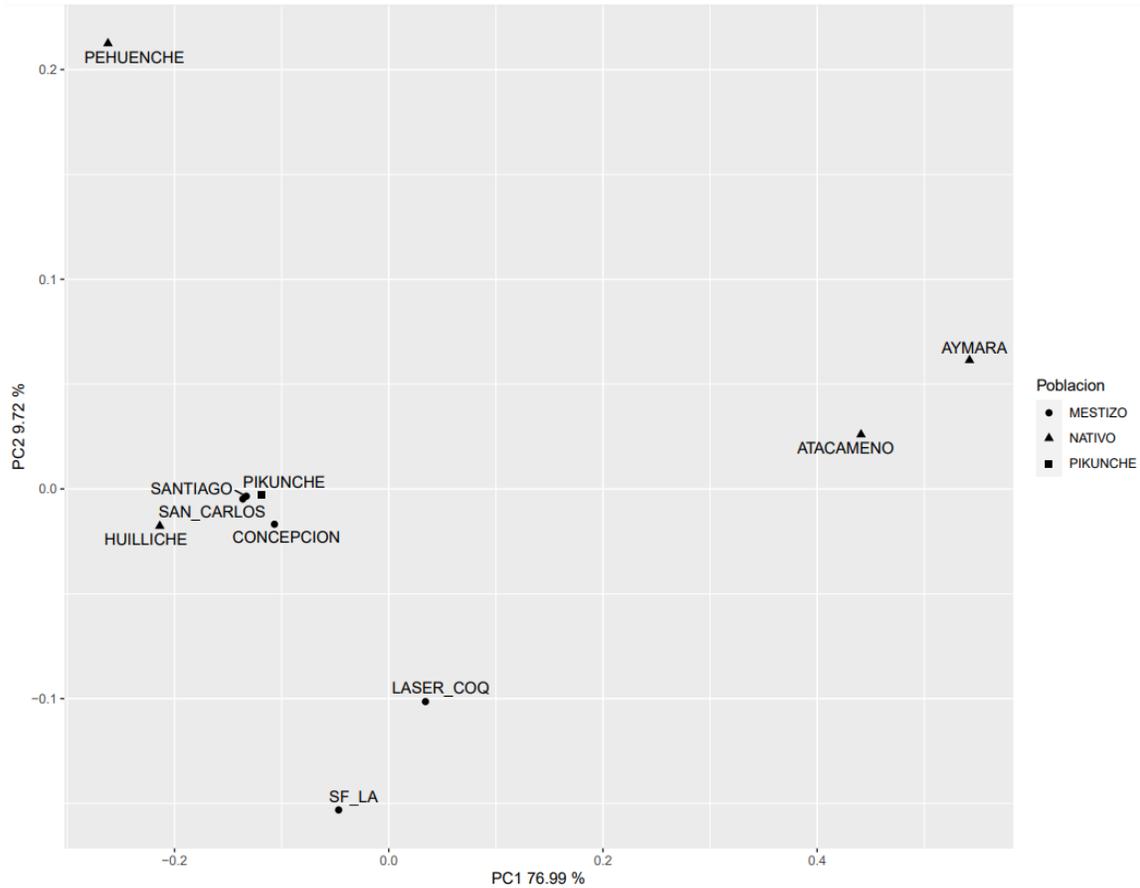
**Figura 9. Fst y Dendrograma de Neighbour-Joining de Pikunche Norte, Pikunche Centro y Pikunche Sur, con las poblaciones de referencia. A. Valores de Matriz de Fst, en negrita se destacan los valores significativos (P value <0.05). B. Dendrograma de Neighbour-Joining a partir de la matriz de Fst. En el recuadro rojo se destacan las divisiones Pikunche Norte (PIK\_N), Pikunche Centro (PIK\_C) y Pikunche Sur (PIK\_S), y la diferenciación genética que presenta con las poblaciones de referencia.**

### **5.5.2 Análisis de componentes principales**

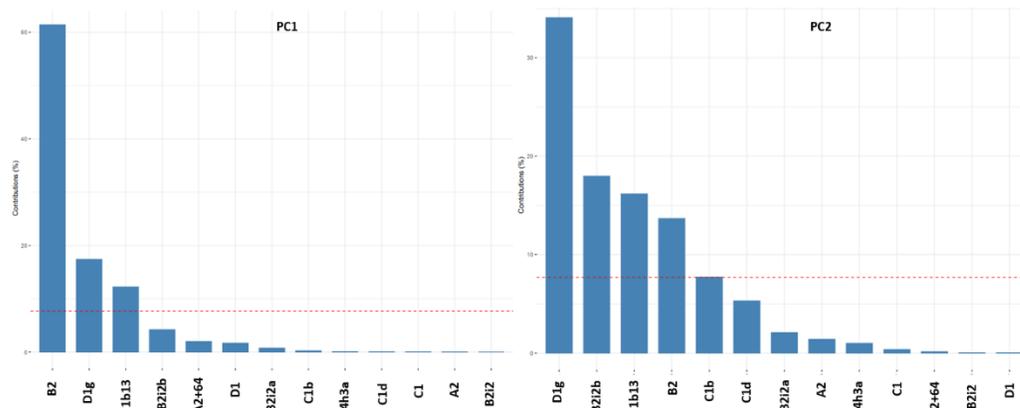
Con el fin de explorar la variabilidad genética entre el grupo de estudio y las poblaciones de referencia, se realizó un análisis de componentes principales, PCA, utilizando las frecuencias haplotípicas obtenidas previamente (*Tabla 3*). Este análisis nos permite visualizar las relaciones a nivel genético del grupo de estudio con las poblaciones de referencia.

El primer componente principal o primera dimensión explica el 77% de la varianza y separa claramente las poblaciones del extremo Norte del País, Aymara y Atacameño, del resto de las poblaciones de referencia, incluyendo Pikunche. Por su parte, la segunda dimensión explica el 9,7% de la varianza y describe la segregación de la población Pehuenche y San Felipe/Los Andes (*Figura 10A*), pudiendo observar además un grupo constituido por las poblaciones de la zona centro sur del país. Las divisiones se explican por la contribución de los haplogrupos en cada componente principal (*Figura 10B*). La primera dimensión posee una mayor contribución del haplogrupo B2; en cambio, la segunda dimensión tiene una mayor contribución de los haplogrupos de D1g, B2i2b y C1b13. Ambas sitúan a Pikunche muy próximo a las poblaciones de Concepción, Santiago y San Carlos, posicionando genéticamente al grupo de estudio cercano a poblaciones mestizas de la zona sentro-sur del País.

A.



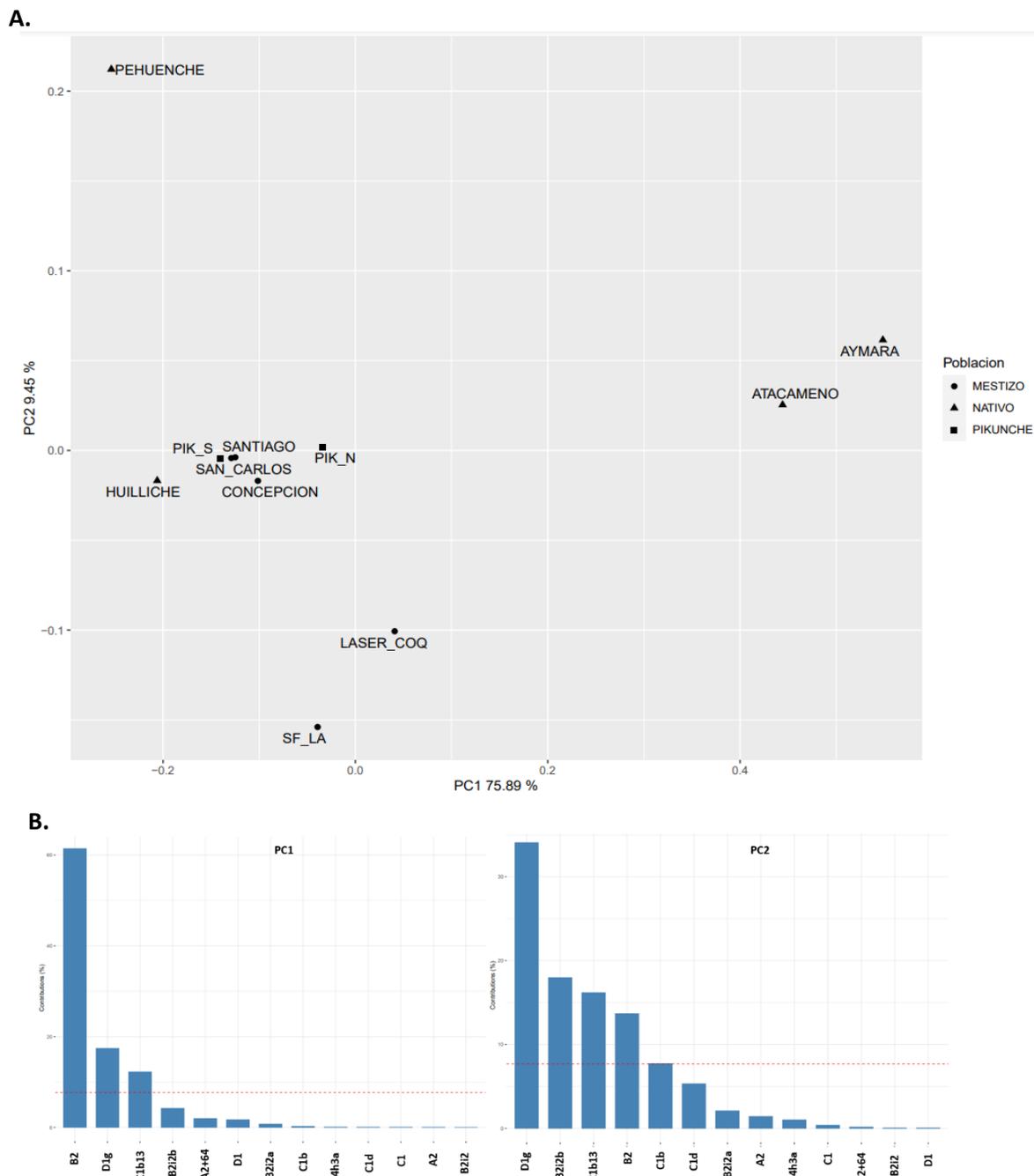
B.



**Figura 10. Análisis de componentes principales entre Pikunche y las poblaciones de referencia.** A. El PCA muestra las poblaciones de referencia mestizas (círculos), nativas (triángulos), y al grupo de estudio Pikunche (cuadrado). Las abreviaciones SF\_LA y LASER\_COQ corresponden a las poblaciones de San Felipe/Los Andes y La Serena/Coquimbo, respectivamente. B. contribuciones por haplogrupo del primer y segundo componente principal.

Se realizó el mismo análisis con los grupos Pikunche Norte y Pikunche Sur, donde la primera dimensión representa el 75,9% de la varianza y la segunda dimensión el 9,4%. Las contribuciones por haplogrupo de cada uno de los componentes principales son los mismos que en el análisis anterior (*Figura 11B*), por lo que se puede observar que la primera dimensión nuevamente separa las poblaciones del extremo norte del País del resto de las poblaciones, y la segunda dimensión muestra la segregación de las poblaciones Pehuenche y San Felipe/Los Andes (*Figura 11A*).

Pikunche Norte y Sur se posicionan a la izquierda del PCA. PIK\_S se ubica casi encima de San Carlos, y muy cercano a Santiago y Concepción, poblaciones que representan a la zona centro-sur del País; PIK\_N se aleja un poco del grupo de las poblaciones de la zona centro/sur del País, hacia las poblaciones de más al Norte. Es más, PC1 ubica a PIK\_N entre las poblaciones de San Felipe/Los Andes y La Serena/Coquimbo.

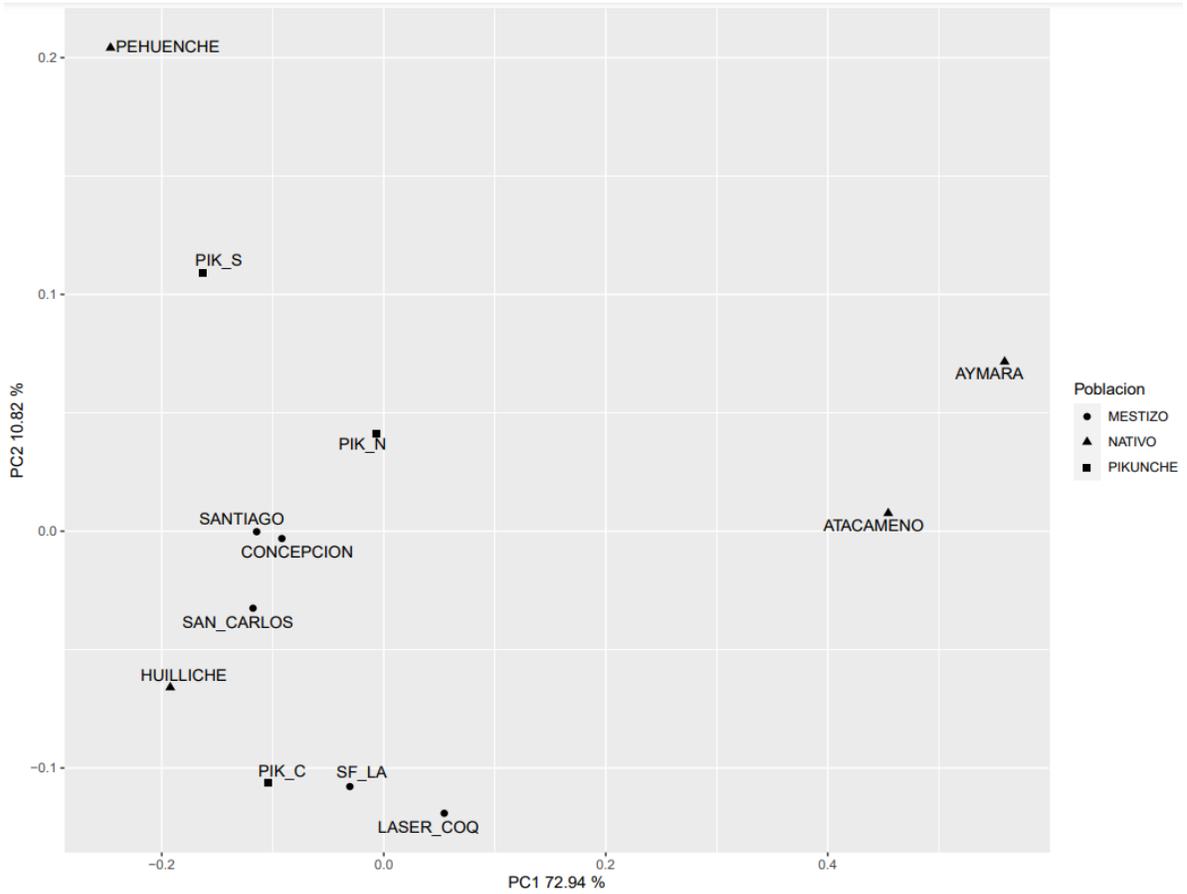


**Figura 11. Análisis de componentes principales entre Pikunche Norte, Pikunche Sur y las poblaciones de referencia.** A. El PCA muestra las poblaciones de referencia mestizas (círculo), nativas (triángulo), y al grupo de estudio Pikunche (cuadrado). PIK\_N corresponde a Pikunche Norte y PIK\_S a Pikunche Sur. SF\_LA y LASER\_COQ corresponden a las poblaciones de San Felipe/Los Andes y La Serena/Coquimbo, respectivamente. B. contribuciones por haplogrupo del primer y segundo componente principal.

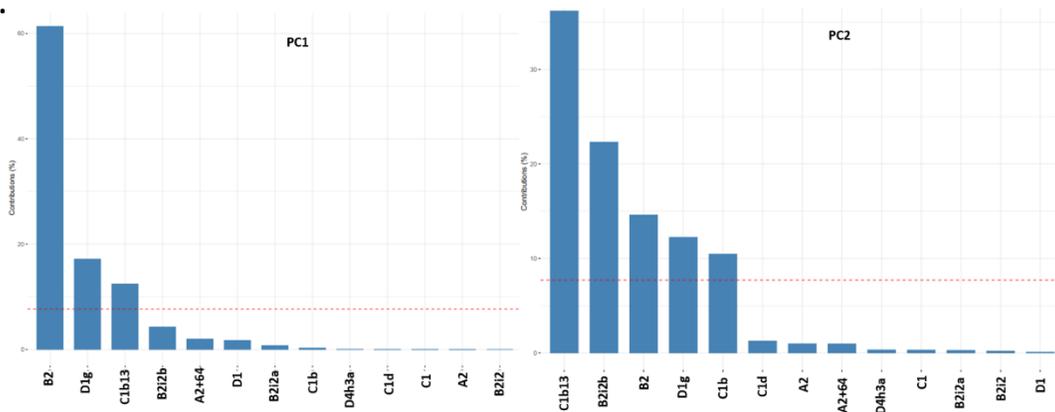
Finalmente, al realizar el análisis con los tres grupos (*Figura 12A*), es decir, Pikunche Norte, Centro y Sur (PIK\_N, PIK\_C, y PIK\_S, respectivamente), se puede observar que nuevamente el primer componente entrega la mayor varianza (72,94%), y muestra una clara división entre las poblaciones del extremo norte con las de la zona centro y centro/sur del País. Este mismo componente muestra que Pikunche Norte se ubica entre las poblaciones de La Serena/Coquimbo y San Felipe/Los Andes; Pikunche Centro se encuentra mucho más cercano a las poblaciones de San Carlos, Concepción y Santiago; mientras que Pikunche Sur se ubica entre las poblaciones de Huilliche y San Carlos.

El segundo componente no genera los grupos tan marcados, posicionando a Pikunche Sur mucho más cerca de la población Pehuenche. Esto debido a la gran contribución del haplogrupos C1b13 y B2i2b (*Figura 12B*), que además posiciona a Pikunche norte más alejado de Santiago y Concepción, y a su vez a Pikunche Centro, mucho más cercano a la población de San Felipe/Los Andes.

A.



B.



**Figura 12 Análisis de componentes principales entre Pikunche Norte, Pikunche Centro, Pikunche Sur y las poblaciones de referencia. A. El PCA muestra las poblaciones de referencia mestizas (círculo), nativas (triángulo), y al grupo de estudio Pikunche (cuadrado). PIK\_N corresponde a Pikunche Norte, PIK\_C a Pikunche Centro, y PIK\_S a Pikunche Sur. SF\_LA y LASER\_COQ corresponden a las poblaciones de San Felipe/Los Andes y La Serena/Coquimbo, respectivamente. B. contribución por haplogrupo del primer y segundo componente principal.**

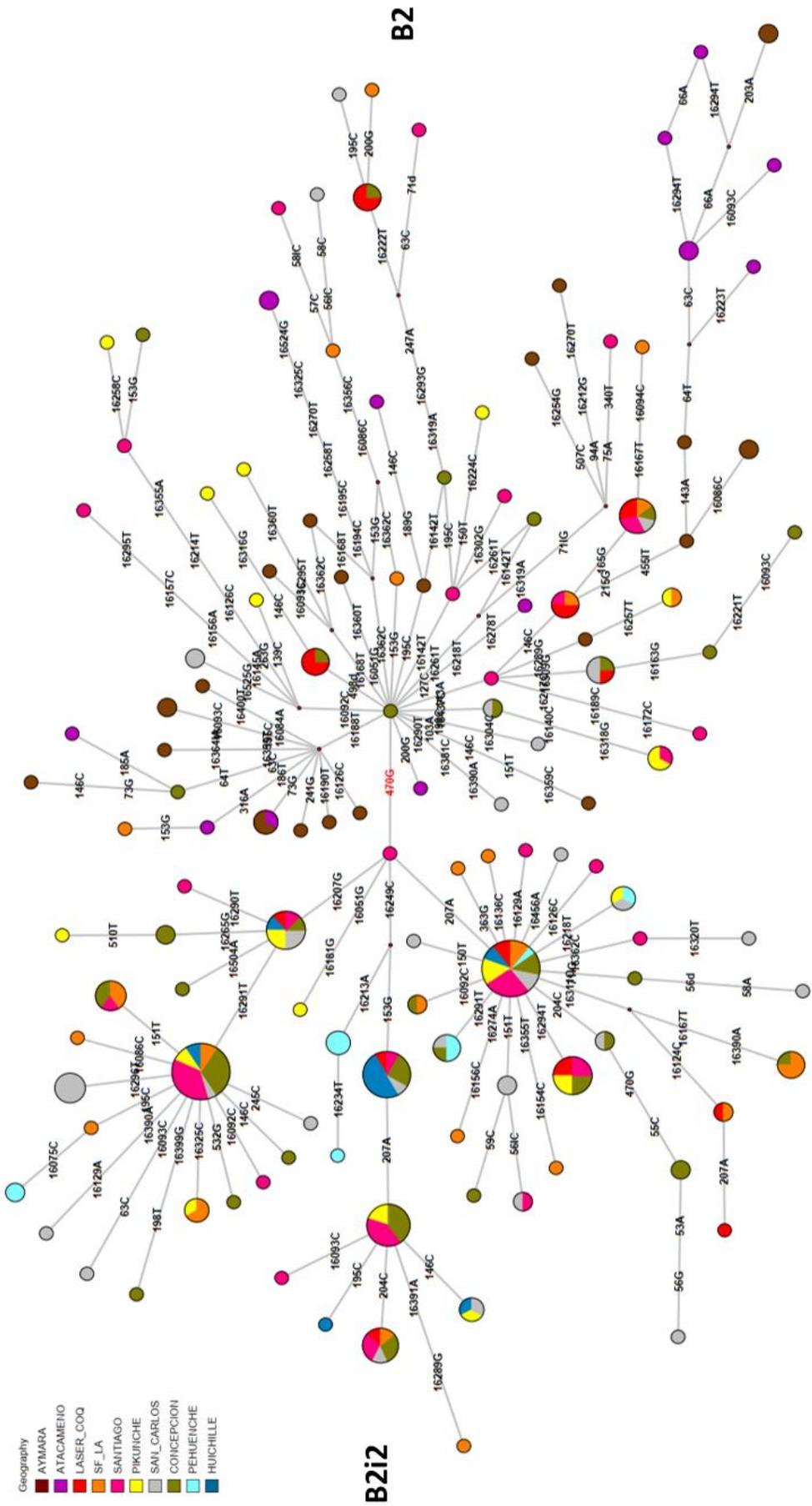
## 5.5 Redes de Haplotipos

Se construyeron redes de haplotipos para los macrohaplogrupos B, C y D, las cuales permiten visualizar los haplotipos compartidos por los individuos de las distintas poblaciones de referencia, nativas y mestizas, y el grupo de estudio Pikunche. Las redes muestran los pasos mutacionales entre los haplotipos, cuya posición en la secuencia se encuentra escrita entre los nodos. Las poblaciones se encuentran representadas por los distintos colores, por orden geográfico: con colores cálidos, las poblaciones de la zona norte y con colores más fríos, las poblaciones de la zona centro-sur y sur.

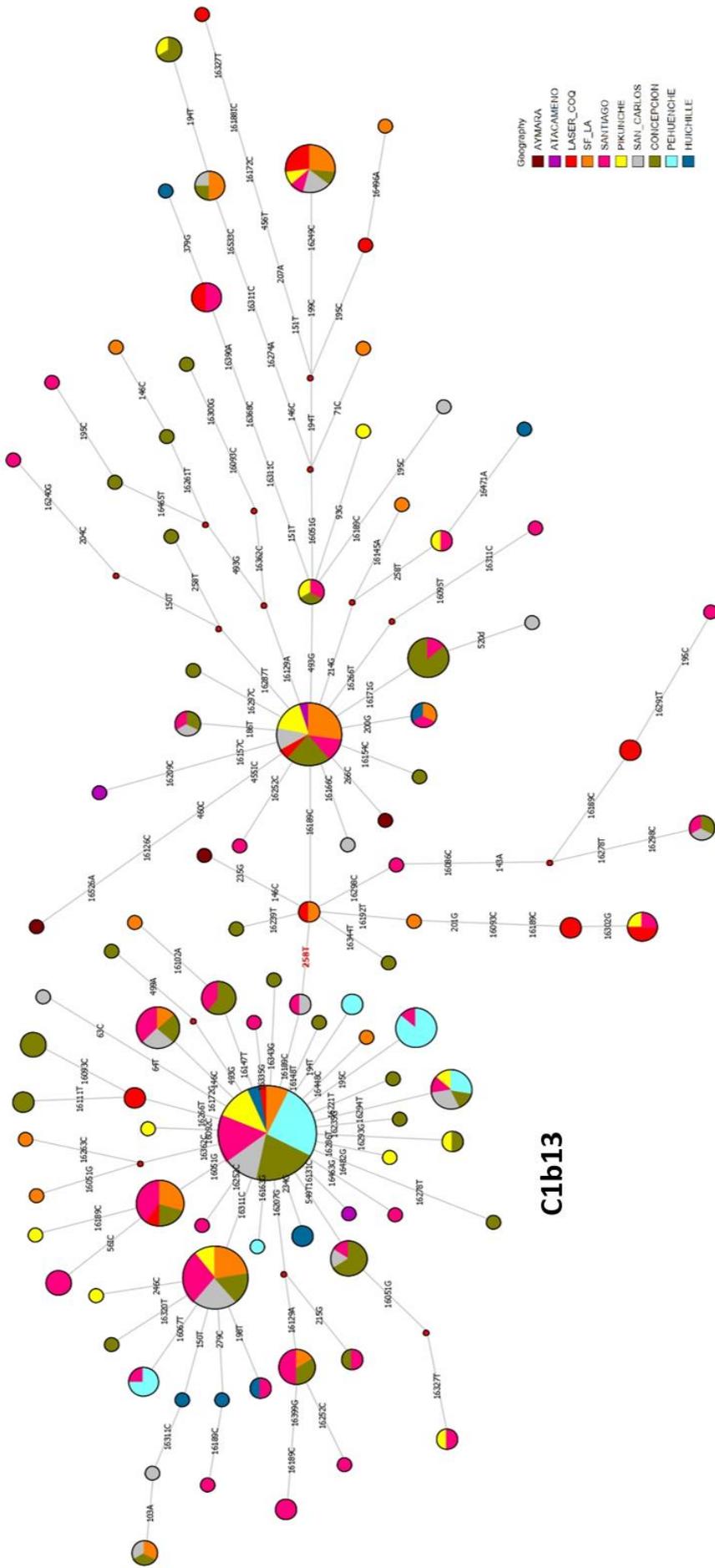
Para la red de haplotipos del macrohaplogrupo B (*Figura 13*), se marcó en rojo la posición 470G, polimorfismo fundamental para diferenciar B2i2 del resto de los B2. Como se mencionó anteriormente, el Haplogrupo B2i2 es propio de la zona centro-sur del País, mientras que B2 se encuentra en mayor frecuencia en las poblaciones del norte del País. A grandes rasgos, se puede observar que las poblaciones de la zona norte del país se encuentran al lado derecho, correspondiente a B2, y las poblaciones de la zona centro-sur y sur del país se encuentra en el lado izquierdo, correspondiente a B2i2. La mayoría de los Pikunche se encuentran distribuidos en el lado izquierdo. Interesantemente, existen haplotipos que se encuentran compartidos solo por Pikunche y San Felipe/Los Andes o con Santiago.

Para el Haplogrupo C (*Figura 14*), se puede observar en rojo la posición 258, polimorfismo que diferencia C1b13 de C1b y el resto de C1. C1b13 se encuentra en mayor frecuencia en las poblaciones de la zona centro-sur del País. Este haplogrupo está representado a la izquierda de la red. Pikunche, nuevamente se encuentra distribuido a lo largo de la red, con una mayor frecuencia del Haplogrupo C1b13. Interesantemente, existen haplotipos que solo comparten Pikunche con la población de Santiago y/o con la población de Concepción.

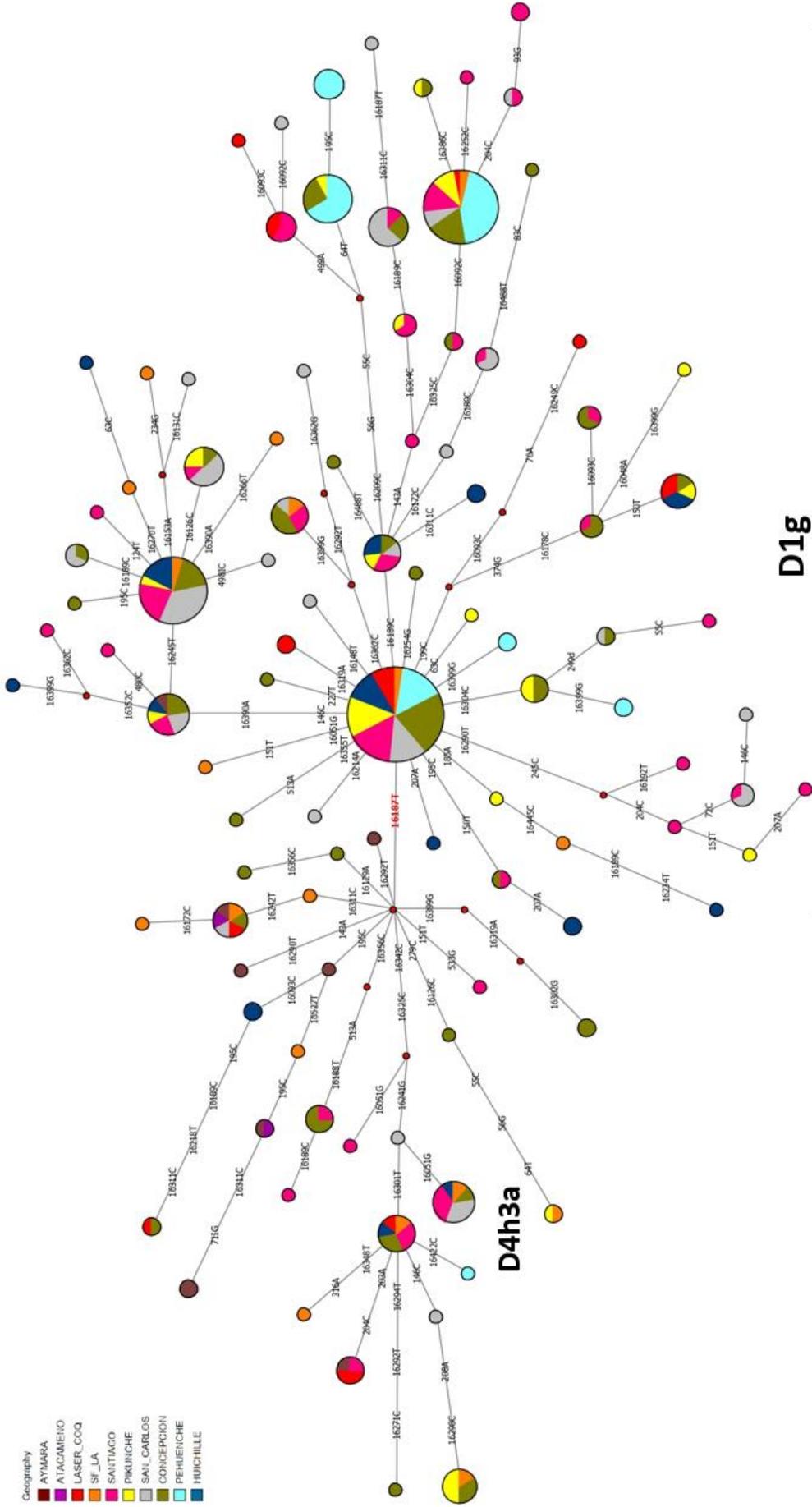
Finalmente, en la *Figura 15* se muestra la red de haplotipos para el Macrohaplogrupo D. La posición destacada, 16187, corresponde al polimorfismo que diferencia los haplogrupos D1g y D1. Se puede observar claramente que casi todos los individuos Pikunche se encuentran al lado derecho de la red, correspondiente al haplogrupo D1g. Al lado izquierdo de la red se encuentra el resto de haplogrupos D, donde se observan individuos Pikunche representados con el haplogrupo D4h3a, donde existe un haplotipo compartido por Pikunche, San Felipe/Los Andes y Concepción. También se observan haplotipos compartidos solo por Pikunche y la población de Concepción.



**Figura 13. Red de haplotipos del macrohaplogrupo B2.** Los nodos indican los individuos que comparten los diferentes haplotipos. Cada color representa una población: Aymara (Café), Atacameño (Lila), La Serena/Coquimbo (Rojo), San Felipe (Naranja), Santiago (Rosado), Piquiche (Amarillo), San Carlos (Gris), Concepción (Verde), Pehuiche (Celeste) y Huilliche (Azul). El número en rojo representa el polimorfismo que distingue a B2 de B2i2.



**Figura 14. Red de haplotipos del macrohaplogrupo C1.** Los nodos indican los individuos que comparten los diferentes haplotipos. Cada color representa una población: Aymara (Café), Atacameño (Rojo), San Felipe (Naranja), Santiago (Rosado), Pikunche (Amarillo), San Carlos (Gris), Concepción (Verde), Pehuenche (Celeste) y Huilliche (Azul). En número en rojo representa el polimorfismo que distingue a C1 de C1b13.



**Figura 15. Red de haplotipos del macrohaplogrupo D1.** Los nodos indican los individuos que comparten los diferentes haplotipos. Cada color representa una población: Aymara (Café), Atacameño (Lila), La Serena/Coquimbo (Rojo), San Felipe (Naranja), Santiago (Rosado), Pikunche (Amarillo), San Carlos (Gris), Concepción (Verde), Pehuenche (Celeste) y Huilliche (Azul). En número en rojo representa el polimorfismo que distingue a D1 de D1g.

## 6. Discusión

En la presente memoria de título se analizaron los linajes maternos de un conjunto de individuos que se auto adscriben al pueblo Pikunche, como parte del estudio de la diversidad genética de las poblaciones nativas existentes previo al contacto europeo en la zona central del país. Para abordar esta problemática se utilizó la región D-loop del DNA mitocondrial. El número de copias citoplasmáticas, la alta tasa de mutación, la herencia uniparental materna y la no recombinación, son características que permiten que el DNA mitocondrial pueda reconstruir con precisión los linajes maternos humanos a través del tiempo (Brown, 1980; Cann et al., 1987; Maier et al., 2022). Específicamente, la región no codificante o región D-loop, posee tres regiones hipervariables que presentan una alta tasa de mutación, donde se encuentran los polimorfismos suficientes para definir estos 15 haplotipos: A2, A2+(64), B2, B2i2, B2i2a, B2i2b, C1, C1b, C1b13, C1c, C1d, D1, D1g, D1j y D4h3a, utilizados como marcadores genéticos para el estudio de poblaciones (De Saint Pierre et al., 2012), lo que otorga una visión precisa sobre los linajes maternos del grupo de estudio, además del bajo costo y facilidad involucradas en la obtención y análisis de este marcador; sin embargo, la utilización de mitogenomas completos permitiría un análisis de mayor resolución, ya que contempla polimorfismos en la región codificante que permiten discriminar haplotipos específicos, como es el caso de los polimorfismos que describen al haplogrupo B4b y lo diferencian de B2 (Davidovic et al., 2020; King et al., 2014).

El primer objetivo específico de este trabajo fue caracterizar los linajes maternos amerindios del grupo de estudio Pikunche. Pese a las limitaciones existentes por la crisis sanitaria, y gracias a la disposición y colaboración de los individuos que participaron del estudio, el muestreo se llevó a cabo de manera exitosa, obteniéndose un total de 109 muestras distribuidas a lo largo de cinco regiones del País.

La estandarización del protocolo de extracción de DNA utilizando los Swabs y el kit Quick-DNA™ Miniprep Plus Kit, Zymo Research, también resultó satisfactoria. El tiempo transcurrido entre el muestreo y los análisis fue entre 10-25 días; no obstante, se pudo extraer el DNA con integridad suficiente para lograr la amplificación por PCR de la región D-loop de la totalidad de las muestras consideradas en el estudio. Interesantemente, se observó un patrón de degradación que formó bandas de bajo peso molecular en todas las muestras, el cual puede deberse tanto al tipo de muestra, es decir, células epiteliales bucales de la cara interna de la mejilla posiblemente en fases terminales de su vida, como al tiempo transcurrido entre la toma de muestra y la extracción del DNA.

En cuanto a la amplificación de la región D-loop del DNA mitocondrial, todas las muestras presentaron un claro amplicón de alrededor de 1500 pares de bases, por lo que, a pesar de la baja cantidad de DNA de algunas muestras y del patrón de degradación aparente, la amplificación resultó exitosa.

La purificación y posterior secuenciación de las muestras amplificadas fueron realizadas por la empresa *Macrogen*, con los partidores previamente descritos en la metodología, lo cual se comprobó al momento de analizar la calidad de las secuencias en el programa Geneious. En este proceso existieron muestras que, en algunas regiones, tuvieron que ser secuenciadas más de una vez con diferentes partidores dada la presencia de poli C que dificultan la secuenciación. Sólo una muestra (PIK5004) no pudo secuenciarse completamente, quedando un gap en una región polimórfica entre la posición 310 y 315, aproximadamente. Si bien, este gap no se encontraba en una posición que presente polimorfismos determinantes para definir un haplogrupo mitocondrial, sí tuvo que ser eliminada para los análisis de diversidad genética, ya que toma en cuenta el número de polimorfismos y la diversidad nucleotídica. Entonces, la correcta secuenciación y posterior análisis de la misma, permitió que los 109 individuos pudieron ser asignados a un haplogrupo o haplotipo mitocondrial de manera adecuada.

El segundo objetivo específico buscaba comparar los haplogrupos y haplotipos obtenidos para los individuos que se auto adscriben al pueblo Pikunche, con poblaciones mestizas de la zona centro sur de Chile y poblaciones nativas tanto del extremo Norte como de la zona centro-sur del País. Al analizar las frecuencias haplotípicas del conjunto de individuos que se auto adscriben al pueblo Pikunche, encontramos que el grupo en estudio presenta una alta frecuencia de linajes Amerindios (89%), lo que concuerda con estudios previos realizados a diferentes poblaciones actuales de Chile, que presentan entre un 88% y un 91% de linajes maternos Nativo Americanos (Gómez-Carballa et al., 2016; Pezo et al., 2022). Las frecuencias haplotípicas obtenidas, se ajustan al gradiente norte-sur descrito para nuestro país (Moraga et al., 2000). Dado que el muestreo se realizó en diferentes localidades de la zona centro y centro/sur del País, se esperaba que tuviese una menor frecuencia de los haplogrupos A2 y B2, comparado con los otros haplogrupos. En cuanto a la frecuencia de los linajes maternos No Amerindios (11%), si comparamos con las frecuencias obtenidas para otras ciudades del País, Santiago es la población con el valor más cercano (12%) (Pezo et al., 2022). Si analizamos a fondo los linajes No Amerindios, nos damos cuenta de que la mayoría corresponden a linajes de origen europeo y unos pocos de origen africano.

No es un misterio que, durante la época de la Conquista de América, el mayor proceso de mestizaje ocurrió entre mujeres indígenas y hombres hispanos; sin embargo, las mujeres europeas también jugaron un papel fundamental en este proceso. Eran consideradas “portadoras de un espíritu de civilización”, por lo que se promovía que las mujeres casadas viajaran a reencontrarse con sus esposos, y a su vez se reclutaban mujeres solteras como potenciales esposas para los hispanos que se encontraran solteros. Al correr los años, las ciudades americanas fundadas por españoles ya tenían un número considerable de mujeres y niños hispanos (Socolow, 2016). Por otra parte, las mujeres africanas fueron esclavizadas y enviadas al nuevo mundo desde la península ibérica o como mercadería de comercio directamente desde África. En América el sistema otorgaba acceso ilimitado de los amos con sus esclavas, por ende, muchas llegaron incluso a convertirse en concubinas de hombres blancos o mulatos, y la descendencia, legítima o no, adquiría de inmediato el estatus de la madre (Socolow, 2016). Es así como los hispanos constituyeron sociedades en las que indígenas y africanos eran la fuerza de trabajo, lo que permitió su interacción constante, conduciendo a un largo período de mestizaje (Fabregat, 2013). Estos antecedentes podrían explicar las frecuencias de linajes europeos y africanos, encontrados en el conjunto de individuos que se auto adscriben al pueblo Pikunche. Ahora bien, debido a que los individuos analizados en el estudio son parte de la población mestiza de Chile actual, los linajes maternos no amerindios presentes en el grupo de estudio podrían explicarse tanto por la presencia de estos linajes durante el proceso de conquista y colonia europea, como por los distintos eventos migratorios más tardíos ocurridos a fines del siglo XIX y comienzos del siglo XX.

Al profundizar en los linajes Nativo Americanos presentes en el grupo de estudio, los que se encuentran en mayor proporción son linajes restringidos al Cono Sur de Sudamérica (B2i2, C1b13 y D1g), específicamente a la zona centro-sur de Chile y Argentina (de Saint Pierre et al., 2012). Al comparar estos haplogrupos con otras poblaciones nativas y mestizas de Chile, constatamos que Pikunche posee frecuencias muy similares con algunas de las poblaciones de la zona centro-sur del País. Santiago, San Carlos, Concepción y Huilliche son poblaciones que presentan las frecuencias más cercanas a Pikunche en los tres haplogrupos; mientras que La Serena/Coquimbo presenta valores cercanos a Pikunche solo de B2i2b y D1g, y San Felipe/Los Andes solo de B2i2b y C1b13. Esto también pudo distinguirse en las redes de haplotipo, donde se observó claramente que individuos Pikunche presentan en su mayoría, haplogrupos B2i2, C1b13 y D1g. Más aún, también fue posible observar en las redes, que Pikunche comparte ciertos haplotipos con poblaciones

mestizas de la zona centro/sur de Chile, sobre todo con las poblaciones de Santiago y Concepción, independientemente de los tres linajes específicos. Estos resultados sugieren que el conjunto de individuos que se auto adscriben al pueblo Pikunche, comparten un acervo genético común que los vincula a las poblaciones mestizas y nativas de la zona centro-sur de Chile. Similitud que también se observa en los análisis de diversidad genética estándar y de estructuración poblacional, donde Pikunche se encuentra más cercano a las poblaciones mestizas de referencia ubicadas en la zona centro-sur del País.

Los análisis de estructuración poblacional nos confirman esta cercanía o similitud entre Pikunche y poblaciones mestizas del centro/sur del País. Los valores de  $F_{st}$  consideran una baja diferenciación genética cuando  $F_{st} < 0.05$  y, una alta diferenciación cuando  $F_{ST} > 0.15$  (Men et al., 2017). Bajo este criterio, Pikunche presentó una alta diferenciación solo con las poblaciones nativas del extremo norte de Chile, y con todas las otras poblaciones, nativas y mestizas de referencia, una baja diferenciación; sin embargo, los valores más pequeños de  $F_{st}$  fueron con las poblaciones de Santiago, Concepción y San Carlos, poblaciones mestizas de la zona centro/sur de Chile.

El resultado de la matriz de  $F_{st}$  se pudo visualizar con el dendrograma de Neighbour-joining construido a partir de la misma, que ubica a Pikunche a una pequeña distancia genética de estas tres poblaciones, además de Huilliche, población nativa del centro/sur de País. Algo interesante de mencionar es que Santiago, geográficamente, es una población vecina a San Felipe/Los Andes (ubicada a menos de 100 km de distancia), y además se ubica 500 km aproximadamente al norte de Concepción; no obstante, el dendrograma ubica genéticamente a Santiago más cerca de Concepción y poblaciones del Sur que de San Felipe/Los Andes, hecho que fue previamente observado por (Bodner et al., 2012; Pezo et al., 2022). Este fenómeno se debe principalmente a la contribución del haplogrupo D1g, con frecuencias bastante similares en Santiago y Concepción (21% y 23%) (Bodner et al., 2012); a diferencia de San Felipe/Los Andes que solo posee un 9% (Pezo et al., 2022). Esto también pudo observarse en el PCA, ya que tanto el primer como el segundo componente poseen una mayor contribución de este haplogrupo. Además, existe una explicación histórica y socio-cultural para este acontecimiento, donde Santiago como Capital de Chile ha sido un destino constante de migración nacional, sobre todo de las poblaciones más sureñas del país, nativas o mestizas, sufriendo un crecimiento exponencial en los últimos 100 años, comparado con el mantenimiento estable en el tamaño de la población de otras ciudades (Pezo et al., 2022; Leiva, 2010).

El análisis de componentes principales es de los métodos estadísticos más utilizados en genética de poblaciones, ya que ayuda a identificar estructura en la distribución de la variación genética, en este caso haplogrupos y/o haplotipos mitocondriales, pudiendo visualizar las distancias genéticas entre las poblaciones a estudiar (McVean, 2009). En este estudio, el PCA se llevó a cabo a partir de frecuencias relativas de haplogrupos y haplotipos específicos presentes en cada población, por lo que cada componente principal (PC) presentó una contribución de linajes diferentes que organiza convenientemente a las poblaciones con un eje norte-sur. PC1 explicó el mayor porcentaje de la varianza, siendo el componente más representativo. PC3 no fue considerado en los análisis ya que explicaba un porcentaje de varianza muy pequeño, del cual no podían interpretarse resultados representativos. Este análisis con el grupo de estudio Pikunche y las poblaciones de referencia, posicionó a Pikunche próximo a las poblaciones mestizas de Santiago, Concepción, San Carlos y, la población nativa Huilliche, formando una clara y casi aislada agrupación de poblaciones de la zona centro/sur del País. Esta pequeña diferenciación y distancia genética, observada tanto en el dendrograma como en el PCA, sugiere que el grupo de estudio Pikunche se comporta como una “población” de la zona centro o centro/sur del País. Existen varias razones que podrían explicar estos resultados:

La primera es que Pikunche, Mapuche y otras poblaciones originarias del centro/sur del país, y aquellas poblaciones mestizas que derivan de estas, comparten un acervo genético mitocondrial común, lo que explica que compartan linajes y frecuencias similares de estos (Arango-Isaza et al., 2023). Por otra parte, la colonización, el mestizaje, el aislamiento y la migración conducen a que los individuos puedan presentar mayor o menor relación genética con otras poblaciones, generando una estructuración de la variación genética (McVean, 2009), por lo que la segunda opción es que gente Pikunche o protopikunche haya migrado tempranamente hacía el Sur difundiendo sus linajes. Esta opción no es del todo compatible con los tamaños poblacionales de los grupos Pikunche y Mapuche según lo descrito por los cronistas (Faron, 1960; Bengoa 2000; Bengoa, 2004; Solis LL, 1985; Vargas, 2011; Merino, 2020). La tercera opción es que habitantes del Sur hayan migrado a territorio Pikunche de forma temprana (expansión Mapuche previa al arribo del Inka) o tardíamente (migración campo ciudad a principios del siglo XX), asimilando sus linajes a través del tiempo y generando esta distribución de frecuencias genéticas. Por otra parte, también se podría sugerir que en realidad esta auto adscripción no tiene una base genética aparente. Esta última posibilidad cobra sentido al momento de dividir al grupo de estudio según el lugar de residencia de la madre, donde se pudo observar que cada grupo se asemeja más a las

poblaciones geográficamente relacionadas. Si el grupo de estudio Pikunche fuese una población consolidada tempranamente, es decir, previo al contacto europeo e incluso previo al contacto con el imperio Inka, independiente del lugar de residencia de la madre, se esperaría que todas las divisiones se comportaran como un conglomerado; pero eso no ocurre y se puede observar cómo cada grupo se asemeja más a diferentes poblaciones del centro o Centro/sur, sobre todo al dividirlo en norte, centro y sur. No olvidemos eso sí que los resultados provienen de datos de variabilidad genética mitocondrial, y por tanto de origen materno; que los criterios de adscripción a un determinado pueblo originario son mayoritariamente culturales; y que uno de los criterios de inclusión en el estudio fue la presencia de apellidos indígenas que son de transmisión por línea paterna.

Al analizar la primera división (Pikunche Norte/Pikunche Sur), tanto en el dendrograma de Neighbour-Joining (Figura 8) como en el análisis de componentes principales (Figura 11), se pudo observar que comparado con Pikunche, PIK\_N se ubicó genéticamente más al norte, un poco más cerca de la población de San Felipe/Los Andes, y PIK\_S más al sur, disminuyendo la distancia con las poblaciones de San Carlos y Huilliche, e incluso con Pehuenche. PIK\_N está constituida por individuos de las regiones de Coquimbo y Valparaíso (n=26), y presentó una frecuencia relativa del haplogrupo B2, similar a la de la población de referencia de La Serena/Coquimbo; Asimismo, PIK\_S conformada por individuos de las regiones Metropolitana, O'Higgins y Maule (n=62), presentó una frecuencia relativa del haplogrupo B2 mucho más baja, similar a la de las poblaciones de la zona Centro/sur, lo que estaría explicando la notoria división entre ambos grupos. El PCA (Figura 11) muestra que persiste este conglomerado de poblaciones de la zona centro/sur del País, incluyendo PIK\_N y PIK\_S. Sin embargo, PC1 distingue a PIK\_N de PIK\_S, ubicándose el primero más cercano a las poblaciones del centro norte, mientras que el segundo más a las del centro sur. PC1, poseía una mayor contribución del haplogrupo B2, seguido de D1g y C1b13, lo que explica que posicione a PIK\_N a una menor distancia de las poblaciones mestizas de la zona Centro del País.

Para la segunda división (Pikunche Norte/Pikunche Centro/Pikunche Sur) el dendrograma de Neighbour-Joining construido a partir de la matriz de Fst (Figura 9), separó a PIK\_N, PIK\_C y PIK\_S. Estas dos últimas forman parte de un gran clado con poblaciones mestizas y nativas del centro/sur de Chile, mientras que PIK\_N se ubica en una posición intermedia entre este clado y San Felipe/Los Andes. Esta vez PIK\_N se conformó solo por individuos de la región de Coquimbo (n=20), presentando una frecuencia relativa del haplogrupo B2

importante comparada con las otras dos divisiones, lo que explicaría separación genética entre los grupos. Aun así, PIK\_N aparece a cierta distancia de La Serena Coquimbo. También, se pudo observar que PIK\_C, constituida por individuos de las regiones de Valparaíso, Metropolitana y O'Higgins (n=41), formó un clado con la población mestiza de San Carlos y la población nativa Huilliche, con las que posee una menor distancia genética. PIK\_S, constituida por solo individuos de región del Maule (n=27), formó un clado con la población nativa Pehuenche, pero a una mayor distancia genética, hecho que pudo reflejarse también con el segundo componente del PCA. PIK\_S y Pehuenche, poseen muchas similitudes en cuanto a frecuencias relativas de ciertos linajes. Ambas poblaciones presentan la mayor frecuencia relativa del haplogrupo C1b13, y no poseen linajes A2, B2i2, C1, C1b, y D1; pero poseen frecuencias relativas muy distintas de linajes B2i2b y D1g, lo que explicaría la mayor distancia genética entre ellas, comparada con otras poblaciones. El posterior análisis de componentes principales ya no evidencia la agrupación marcada de poblaciones de la zona centro/sur, como en los PCA previos, y pudo observarse claramente como estas tres divisiones se encuentran más distantes entre sí. Como ya se mencionó, la contribución de haplogrupos y la explicación de la varianza en cada componente es la que influye directamente en la interpretación del PCA. PC1 poseía la misma contribución de haplogrupos que el anterior, ubicando a las tres divisiones geográficamente de norte a sur rodeando a poblaciones mestizas y nativas de la zona centro/sur de Chile, a excepción de Pehuenche. El segundo componente presentó una mayor contribución del haplogrupo C1b13, seguido de B2i2b, B2, D1g y C1b, y esta vez explicó un porcentaje un poco más alto de la varianza, por lo que las distancias entre las poblaciones variaron. La alta frecuencia de C1b13 que posee Pehuenche y PIK\_S explicaría su cercanía en el gráfico, y a su vez, la lejanía con la agrupación que se veía anteriormente de las poblaciones de la zona centro/sur del País. Asimismo, con PIK\_C, que presenta frecuencias relativas semejantes en estos linajes con San Felipe/Los Andes. No obstante, PC1 sigue explicando la mayoría de la varianza (72,94%) por lo que la información que otorga este componente es la más representativa. La lejanía entre las divisiones de los grupos, y las variaciones en las aproximaciones con otras poblaciones de referencia distintas, comparado con Pikunche, sugiere que no es una entidad poblacional consolidada y homogénea, por lo que se podría sugerir que los individuos que se auto adscriben a este pueblo, al menos en términos de linajes mitocondriales, son posiblemente más afines a las poblaciones actuales a las que pertenecen que a una única población. No obstante, esto no quita que en términos culturales sí lo sean.

Finalmente, la encuesta sobre la identidad y pertenencia a los 109 individuos participantes del estudio arrojó que, la mayoría dice ser descendiente (84%) e identificarse (88%) con los pueblos Mapuche-Pikunche, seguido de solo Pikunche o solo Mapuche. Esto guarda una estrecha relación con los linajes Nativo Americanos del grupo de estudio, los cuales representan el 89%. Por otra parte, de los individuos que presentaron linajes No Amerindios (n=12), solo tres dicen no saber o no ser descendientes de algún Pueblo Originario, y solo dos (1 distinto del anterior) dicen no identificarse con alguna Etnia Indígena. La mayoría de ellos dice ser descendiente e identificarse con el pueblo Pikunche o Mapuche-Pikunche.

El hecho de que la mayoría de los individuos se identifique con el pueblo Pikunche o Mapuche-Pikunche, respalda que los participantes del estudio se auto adscriben realmente a este Pueblo. Los individuos que no se identifican con el pueblo Pikunche, pueden deberse a los otros criterios considerados para la inclusión en el estudio tal como se describe en materiales y métodos. Dado que los participantes del estudio que colaboraron en la elección y toma de muestras poseen un conocimiento acabado del pueblo Pikunche, confiamos en que este resultado no sea el resultado de un sesgo de muestreo.

Con respecto a la pertenencia a alguna comunidad indígena, la mayoría dice no pertenecer a ninguna comunidad Indígena, lo que se explica debido a que en Chile no se encuentra reconocido al pueblo Pikunche, por lo que no existen comunidades de este pueblo reconocidas por la Corporación Nacional de Desarrollo Indígena (Conadi), a menos que les pongan el nombre de algún pueblo originario reconocido.

Al analizar los apellidos paternos de cada individuo, se observó que la mayoría de los Apellidos fueron de origen europeo, 77% (español 70% y no español 7%). También se analizaron los apellidos maternos, aunque cabe señalar que estos se pierden más rápido a través de las generaciones, donde la mayoría también fue de origen europeo 84% (español 78% y no español 6%). Los apellidos restantes son de origen Amerindio-Mapuche (18% y 11%), y el 5% no se logró determinar, en ambos casos. Del análisis de los cuatro apellidos de los padres de los individuos, es decir, los dos apellidos de la madre y los dos apellidos del padre, se desprendió que 41 individuos presentan padres con al menos un apellido indígena. Se utilizaron estos y no los de los abuelos maternos, ya que, como se mencionó anteriormente, muchos de esos datos están perdidos.

El hecho de que la mayoría de los apellidos encontrados fueran de origen europeo-español, no fue sorprendente, ya que históricamente, Chile Central atravesó un largo proceso de

migración y asimilación indígena (Solis, 1985; Bengoa, 2004; Faron, 1960), que condujo a la pérdida no solo de algunos linajes, sino que también de apellidos. Por otra parte, que la mayoría de los apellidos Amerindios sean de origen Amerindio-Mapuche puede deberse a que la búsqueda para la clasificación de los apellidos indígenas se realizó con la base de datos de la Conadi, la cual aún no presenta un listado con apellidos del resto de los pueblos originarios. Obviamente, dado que el estado de Chile no reconoce al pueblo Pikunche como uno de los pueblos indígenas de nuestro territorio, no es sorpresa que no exista la categoría apellido Pikunche en nuestro análisis. Por otra parte, si tomamos en cuenta que el grupo de individuos estudiado en esta Memoria se comporta, en términos de sus linajes maternos, como una población mestiza de zona centro-sur de Chile, bastante similar a Santiago, tanto el alto porcentaje de apellidos europeos como el bajo porcentaje de apellidos amerindios-mapuche cobra sentido.

Hay que destacar que la asimilación indígena, aunque contribuyó a la invisibilización del componente Pikunche en la población de la zona central del país, permitió que se preservaran algunos elementos de su cultura y algunos linajes mitocondriales propios de los habitantes originarios de la región. Por lo mismo, independiente de los linajes mitocondriales y sus frecuencias encontradas en esta memoria en el grupo en estudio, tanto la continuidad territorial como la adscripción cultural actual constituyen un espacio de crecimiento para las comunidades que se sienten descendientes y parte del pueblo Pikunche.

## **7. Conclusiones**

El conjunto de individuos que se auto adscriben al pueblo Pikunche presentan, en su mayoría, ancestros maternos indígenas, y una alta frecuencia de linajes B2i2, C1b13 y D1g, lo que los restringe específicamente en el Cono Sur de Sudamérica y los vincula a las poblaciones originarias de esta área. Al comparar al grupo de estudio con las poblaciones de referencia, queda en evidencia que Pikunche posee frecuencias relativas de linajes maternos semejantes a las poblaciones mestizas de la zona centro-sur de Chile; Sin embargo la alteración en la estructuración genética al dividir al conjunto de individuos, según el lugar de residencia de la madre, sugiere que los individuos no constituyen una unidad poblacional homogénea, y que más bien poseen una distribución de linajes similar a las poblaciones mestizas de la zona centro y centro-sur del País con que se relacionan geográficamente.

Claramente sería ideal obtener alguna referencia genética antigua de Pikunche, para así poder realizar una aproximación mucho más adecuada y concreta del grupo de estudio, pero lamentablemente, esta población disminuyó considerablemente en los periodos de Conquista y Colonia Española, llegando a considerarse extinta, lo que dificulta enormemente la obtención de datos antiguos. Para complementar lo realizado en esta memoria de título, sería interesante estudiar marcadores autosómicos (SNPs) para evaluar mestizaje, lo que permitiría cuantificar la contribución genética Amerindia y de alguna otra población, principalmente europea, y así tener una visión más completa sobre la ancestría genética de estos individuos, y no solo de sus linajes maternos.

## 8. Referencias

- Achilli, A., Perego, U. A., Bravi, C. M., Coble, M. D., Kong, Q.-P., Woodward, S. R., Salas, A., Torroni, A., & Bandelt, H.-J. (2008). The Phylogeny of the Four Pan-American MtDNA Haplogroups: Implications for Evolutionary and Disease Studies. *PLOS ONE*, 3(3), e1764. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001764>
- Andrews, R. M., Kubacka, I., Chinnery, P. F., Lightowlers, R. N., Turnbull, D. M., & Howell, N. (1999). Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nature Genetics*, 23(2), 147.
- Arango-Isaza, E., Capodiferro, M. R., Aninao, M. J., Babiker, H., Aeschbacher, S., Achilli, A., ... & Barbieri, C. (2023). The genetic history of the Southern Andes from present-day Mapuche ancestry. *Current Biology*, 33, 1-14.
- Arnaiz-Villena, A., Parga-Lozano, C., Moreno, E., Areces, C., Rey, D., & Gomez-Prieto, P. (2010). The Origin of Amerindians and the Peopling of the Americas According to HLA Genes: Admixture with Asian and Pacific People. *Current Genomics*, 11(2), 103–114.
- Bandelt, H.-J., Herrnstadt, C., Yao, Y.-G., Kong, Q.-P., Kivisild, T., Rengo, C., Scozzari, R., Richards, M., Villems, R., Macaulay, V., Howell, N., Torroni, A., & Zhang, Y.-P. (2003). Identification of Native American Founder mtDNAs Through the Analysis of Complete mtDNA Sequences: Some Caveats. *Annals of Human Genetics*, 67(6), 512-524. <https://doi.org/10.1046/j.1469-1809.2003.00049.x>
- Bengoa, J. 2000. Historia del pueblo mapuche:(siglo XIX y XX) (Vol. 7). Lom Ediciones.
- Bengoa, J. (2004). La memoria olvidada. Historia de los pueblos indígenas de Chile. Bicentenario.
- Berrios, S. (2016). El ADN de los chilenos y sus orígenes genéticos. Editorial Universitaria de Chile.
- Bisso-Machado, R., & Fagundes, N. J. R. (2021). Uniparental genetic markers in Native Americans: A summary of all available data from ancient and contemporary populations. *American Journal of Physical Anthropology*, 176(3), 445-458. <https://doi.org/10.1002/ajpa.24357>
- Bodner, M., Perego, U. A., Huber, G., Fendt, L., Röck, A. W., Zimmermann, B., Olivieri, A., Gómez-Carballa, A., Lancioni, H., Angerhofer, N., Bobillo, M. C., Corach, D., Woodward, S. R., Salas, A., Achilli, A., Torroni, A., Bandelt, H.-J., & Parson, W. (2012). Rapid coastal spread of First Americans: Novel insights from South America's Southern Cone mitochondrial genomes. *Genome Research*, 22(5), 811-820. <https://doi.org/10.1101/gr.131722.111>
- Brookes, A. J. (1999). The essence of SNPs. *Gene*, 234(2), 177-186. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00219-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00219-X)
- Brown, M. D., Hosseini, S. H., Torroni, A., Bandelt, H. J., Allen, J. C., Schurr, T. G., Scozzari, R., Cruciani, F., & Wallace, D. C. (1998). mtDNA haplogroup X: An ancient link between Europe/Western Asia and North America? *American Journal of Human Genetics*, 63(6), 1852–1861.
- Castillo Torres, D. (2021). Contribución de la mujer indígena al poblamiento de la ciudad de San Carlos, Región de Ñuble. Análisis a partir de marcadores de ADN mitocondrial.
- Cann, R. L., Stoneking, M., & Wilson, A. C. (1987). Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature*, 325(6099), 31–36
- Corella, A., Bert, F., Pérez-Pérez, A., Gené, M., & Turbón, D. (2007). Mitochondrial DNA diversity of the Amerindian populations living in the Andean Piedmont of Bolivia: Chimane, Mosen, Aymara and Quechua. *Annals of Human Biology*, 34(1), 34–55.
- Crespo, C. M., Lanata, J. L., Cardozo, D. G., Avena, S. A., & Dejean, C. B. (2018). Ancient maternal lineages in hunter-gatherer groups of Argentinean Patagonia. Settlement, population continuity and divergence. *Journal of Archaeological Science: Reports*, 18. <https://doi.org/10.1016/j.jasrep.2017.11.003>
- Davidovic, S., Malyarchuk, B., Grzybowski, T., Aleksic, J. M., Derenko, M., Litvinov, A., Rogalla-Ładniak, U., Stevanovic, M., & Kovacevic-Grujicic, N. (2020). Complete mitogenome data for the Serbian population: the contribution to high-quality forensic databases. *International Journal of Legal Medicine*, 134(5), 1581–1590.

- De Saint Pierre, M. (2017). Antiquity of mtDNA lineage D1g from the southern cone of South America supports pre-Clovis migration. *Quaternary International*, 444, 19-25. <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2017.05.054>
- De Saint Pierre, M., Bravi, C. M., Motti, J. M. B., Fuku, N., Tanaka, M., Llop, E., Bonatto, S. L., & Moraga, M. (2012). An alternative model for the early peopling of Southern South America revealed by analyses of three mitochondrial DNA haplogroups. *PLoS ONE*, 7(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043486>
- Dillehay, T. D., Ocampo, C., Saavedra, J., Sawakuchi, A. O., Vega, R. M., Pino, M., Collins, M. B., Cummings, L. S., Arregui, I., Villagran, X. S., Hartmann, G. A., Mella, M., González, A., & Dix, G. (2015). New Archaeological Evidence for an Early Human Presence at Monte Verde, Chile. *PLOS ONE*, 10(11), e0141923. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141923>
- Excoffier, L., & Lischer, H. E. L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10(3), 564–567.
- Faron, L. C. (1960). Effects of Conquest on the Araucanian Picunche during the Spanish Colonization of Chile: 1536-1635. In *Ethnohistory* (Vol. 7, Issue 3, p. 239). <https://doi.org/10.2307/480824>
- Fabregat, C. E. (2013). El mestizaje en América. *Tiempo y Espacio*, (30), 201-226.
- Forster, P., Harding, R., Torroni, A., & Bandelt, H. J. (1996). Origin and evolution of Native American mtDNA variation: a reappraisal. *American Journal of Human Genetics*, 59(4), 935–945.
- Free Phylogenetic Network Software. (n.d.). Free Phylogenetic Network Software. Retrieved January 15, 2022, from <https://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm>
- García, F., Moraga, M., Vera, S., Henríquez, H., Llop, E., Aspillaga, E., & Rothhammer, F. (2006). mtDNA microevolution in Southern Chile's archipelagos. In *American Journal of Physical Anthropology* (Vol. 129, Issue 3, pp. 473–481).
- Gómez-Carballa, A., Moreno, F., Álvarez-Iglesias, V., Martín-Torres, F., García-Magariños, M., Pantoja-Astudillo, J. A., Aguirre-Morales, E., Bustos, P., & Salas, A. (2016). Revealing latitudinal patterns of mitochondrial DNA diversity in Chileans. *Forensic Science International: Genetics*, 20, 81-88. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.10.002>
- Govindaraju, D. R. (1989). Variation in gene flow levels among predominantly self-pollinated plants. *Journal of Evolutionary Biology*, 2(3), 173-181.
- Gustafsson, C. M., Falkenberg, M., & Larsson, N.-G. (2016). Maintenance and Expression of Mammalian Mitochondrial DNA. *Annual Review of Biochemistry*, 85(1), 133-160. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014402>
- Herrera-Paz, E. F. (2013). La genética de poblaciones y el origen de la diversidad humana. *rev med hondur*, 81(1).
- Holsinger, K. E., & Weir, B. S. (2009). Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting FST. *Nature Reviews Genetics*, 10(9), 639-650.
- Horai S. (1994). [Peopling of the Americas, founded by four major lineages of mitochondrial DNA]. *Tanpakushitsu kakusan koso. Protein, nucleic acid, enzyme*, 39(15), 2759–2767.
- Jobling, M. A., Hurler, M., & Tyler-Smith, C. (2004). *Human evolutionary genetics: Origins, peoples & disease*. New York: Garland Science
- King, J. L., LaRue, B. L., Novroski, N. M., Stoljarova, M., Seo, S. B., Zeng, X., Warshauer, D. H., Davis, C. P., Parson, W., Sajantila, A., & Budowle, B. (2014). High-quality and high-throughput massively parallel sequencing of the human mitochondrial genome using the Illumina MiSeq. *Forensic Science International: Genetics*, 12, 128–135.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6), 1547.
- Leiva Jiménez, X. D. (2010). Efectos de las migraciones recientes en la composición genética de la población de Santiago de Chile.

Lehti, M. S., & Sironen, A. (2017). Formation and function of sperm tail structures in association with sperm motility defects†. *Biology of Reproduction*, 97(4), 522-536. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox096>

Ley N° 21273. Modifica la ley19253 que establece normas sobre protección, fomento y desarrollo de los indígenas, y crea la corporación nacional de desarrollo indígena. 17 de Octubre de 2020

Li, X., Ji, D., Marley, J. L., Zou, W., Deng, X., Cao, Y., Zhang, Z., Liu, Y., Wei, Z., Zhou, P., & Cao, Y. (2020). Association between mitochondrial DNA D-loop region polymorphisms and endometriosis in a Chinese population. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 37(9), 2171-2179. <https://doi.org/10.1007/s10815-020-01853-z>

Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 25(11), 1451-1452. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>

Llamas, B., Fehren-Schmitz, L., Valverde, G., Soubrier, J., Mallick, S., Rohland, N., Nordenfelt, S., Valdiosera, C., Richards, S. M., Rohrlach, A., Romero, M. I. B., Espinoza, I. F., Cagigao, E. T., Jiménez, L. W., Makowski, K., Reyna, I. S. L., Lory, J. M., Torrez, J. A. B., Rivera, M. A., ... Haak, W. (2016). Ancient mitochondrial DNA provides high-resolution time scale of the peopling of the Americas. *Science Advances*, 2(4), e1501385. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1501385>

Lorenz, J. G., & Smith, D. G. (1996). Distribution of four founding mtDNA haplogroups among Native North Americans. *American Journal of Physical Anthropology*, 101(3), 307–323.

Mandryk, C. A. S., Josenhans, H., Fedje, D. W., & Mathewes, R. W. (2001). Late Quaternary paleoenvironments of Northwestern North America: Implications for inland versus coastal migration routes. *Quaternary Science Reviews*, 20(1-3), 301-314. [https://doi.org/10.1016/S0277-3791\(00\)00115-3](https://doi.org/10.1016/S0277-3791(00)00115-3)

Maier, P. A., Runfeldt, G., Estes, R. J., & Vilar, M. G. (2022). African mitochondrial haplogroup L7: a 100,000-year-old maternal human lineage discovered through reassessment and new sequencing. *Scientific Reports*, 12. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13856-0>

Mattiazzi, M., Vijayvergiya, C., Gajewski, C. D., DeVivo, D. C., Lenaz, G., Wiedmann, M., & Manfredi, G. (2004). The mtDNA T8993G (NARP) mutation results in an impairment of oxidative phosphorylation that can be improved by antioxidants. *Human Molecular Genetics*, 13(8), 869–879.

McVean, G. (2009). A genealogical interpretation of principal components analysis. *PLoS Genetics*, 5(10), e1000686.

Men, Q., Xue, G., Mu, D., Hu, Q., & Huang, M. (2017). Mitochondrial DNA markers reveal high genetic diversity and strong genetic differentiation in populations of *Dendrolimus kikuchii* Matsumura (Lepidoptera: Lasiocampidae). *PloS One*, 12(6), e0179706.

Merino, A. (2020). Prehistoria Agroalfarera de Chile Central y la llegada de los Inka a este territorio. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.36353.28006>

Moraga, M. L., Rocco, P., Miquel, J. F., Nervi, F., Llop, E., Chakraborty, R., Rothhammer, F., & Carvallo, P. (2000). Mitochondrial DNA polymorphisms in Chilean aboriginal populations: implications for the peopling of the southern cone of the continent. *American Journal of Physical Anthropology*, 113(1), 19–29.

Moreno-Mayar, J. V., Vinner, L., De Barros Damgaard, P., De La Fuente, C., Chan, J., Spence, J. P., Allentoft, M. E., Vimala, T., Racimo, F., Pinotti, T., Rasmussen, S., Margaryan, A., Iraeta Orbegozo, M., Mylopotamitaki, D., Wooller, M., Bataille, C., Becerra-Valdivia, L., Chivall, D., Comeskey, D., ... Willerslev, E. (2018). Early human dispersals within the Americas. *Science*, 362(6419), eaav2621. <https://doi.org/10.1126/science.aav2621>

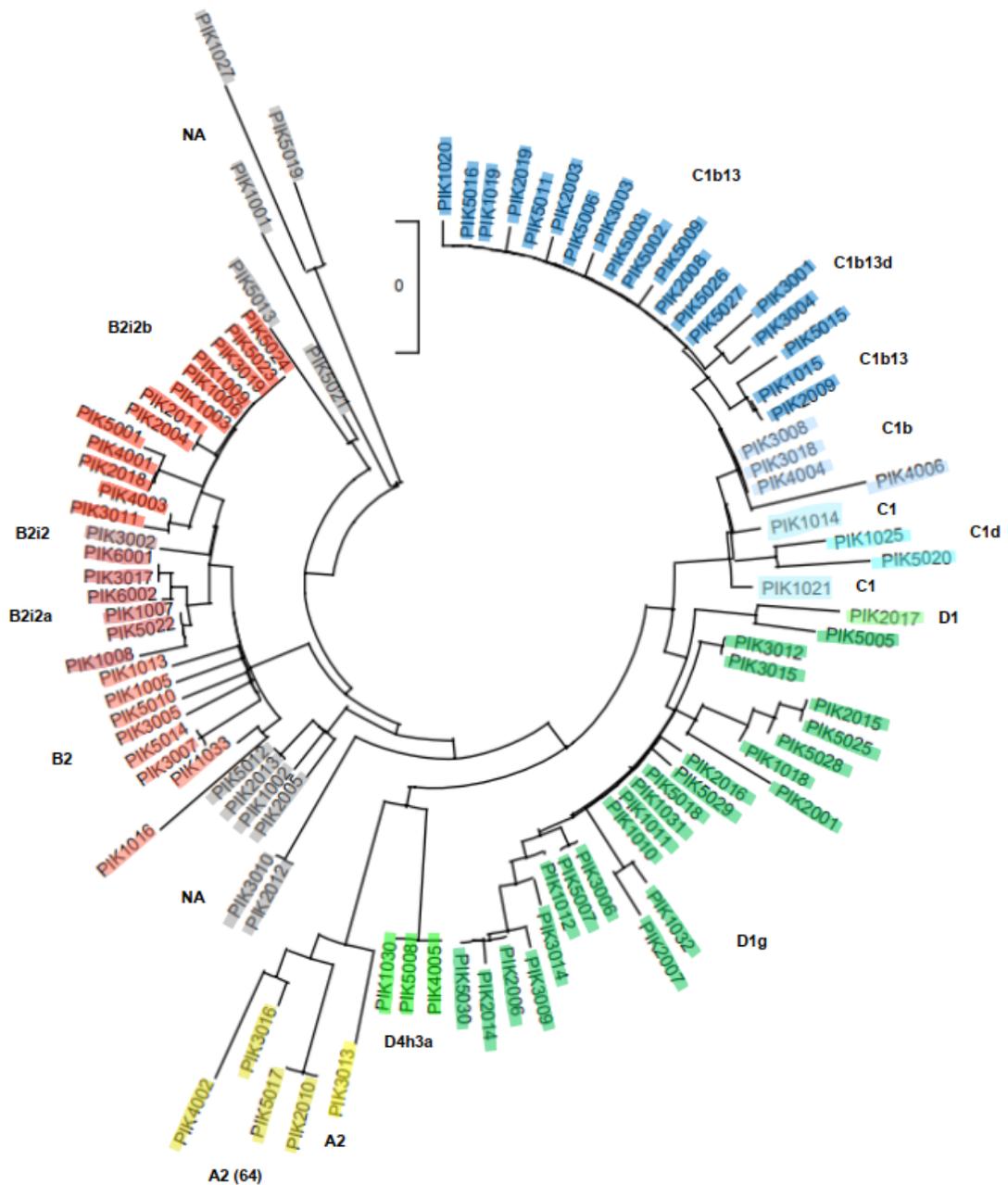
Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51 Pt 1, 263–273.

Perego, U. A., Achilli, A., Angerhofer, N., Accetturo, M., Pala, M., Olivieri, A., Kashani, B. H., Ritchie, K. H., Scozzari, R., Kong, Q.-P., Myres, N. M., Salas, A., Semino, O., Bandelt, H.-J., Woodward, S.

- R., & Torroni, A. (2009). Distinctive Paleo-Indian Migration Routes from Beringia Marked by Two Rare mtDNA Haplogroups. *Current Biology*, 19(1), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.11.058>
- Pezo, P., Orellana-Soto, M., De La Fuente, C., Leiva, X., Herrera, L., Flores-Alvarado, S., Galimany, J., De Saint Pierre, M., Bravi, C., & Moraga, M. (2022). Native American mitochondrial lineages in admixed populations from Chile: Detecting recent migrations during POST-COLUMBIAN times using geographically restricted lineages. *American Journal of Biological Anthropology*, 178(3), 504-512. <https://doi.org/10.1002/ajpa.24513>
- Prates, L., Politis, G. G., & Perez, S. I. (2020). Rapid radiation of humans in South America after the last glacial maximum: A radiocarbon-based study. *PLOS ONE*, 15(7), e0236023. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236023>
- Punzi, E., Milani, L., Ghiselli, F., & Passamonti, M. (2018). Lose it or keep it: (How bivalves can provide) insights into mitochondrial inheritance mechanisms. *Journal of Experimental Zoology. Part B, Molecular and Developmental Evolution*, 330(1), 41-51. <https://doi.org/10.1002/jez.b.22788>
- Raghavan, M., Steinrücken, M., Harris, K., Schiffels, S., Rasmussen, S., DeGiorgio, M., Albrechtsen, A., Valdiosera, C., Ávila-Arcos, M. C., Malaspinas, A.-S., Eriksson, A., Moltke, I., Metspalu, M., Homburger, J. R., Wall, J., Cornejo, O. E., Moreno-Mayar, J. V., Korneliussen, T. S., Pierre, T., ... Willerslev, E. (2015). Genomic evidence for the Pleistocene and recent population history of Native Americans. *Science*, 349(6250), aab3884. <https://doi.org/10.1126/science.aab3884>
- Rasmussen, M., Anzick, S. L., Waters, M. R., Skoglund, P., DeGiorgio, M., Stafford, T. W., Rasmussen, S., Moltke, I., Albrechtsen, A., Doyle, S. M., Poznik, G. D., Gudmundsdottir, V., Yadav, R., Malaspinas, A.-S., V, S. S. W., Allentoft, M. E., Cornejo, O. E., Tambets, K., Eriksson, A., ... Willerslev, E. (2014). The genome of a Late Pleistocene human from a Clovis burial site in western Montana. *Nature*, 506(7487), 225-229. <https://doi.org/10.1038/nature13025>
- Riva, A., & Kohane, I. S. (2002). SNPper: Retrieval and analysis of human SNPs. *Bioinformatics*, 18(12), 1681-1685. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/18.12.1681>
- R Studio. (n.d.). Retrieved March 3, 2022, from <https://www.rstudio.com>
- Sanger, F., & Coulson, A. R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*, 94(3), 441-448.
- Sanhueza, L., & Falabella, F. (2012). Las comunidades alfareras iniciales en Chile central. *Revista Chilena de Antropología*, 0. <https://doi.org/10.5354/0719-1472.1999.17951>
- Sato, M., & Sato, K. (2013). Maternal inheritance of mitochondrial DNA by diverse mechanisms to eliminate paternal mitochondrial DNA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1833(8), 1979-1984. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.03.010>
- Schurr, T. G., Ballinger, S. W., Gan, Y. Y., Hodge, J. A., Merriwether, D. A., Lawrence, D. N., Knowler, W. C., Weiss, K. M., & Wallace, D. C. (1990). Amerindian mitochondrial DNAs have rare Asian mutations at high frequencies, suggesting they derived from four primary maternal lineages. *American Journal of Human Genetics*, 46(3), 613-623.
- Skoglund, P., & Reich, D. (2016). A genomic view of the peopling of the Americas. *Current Opinion in Genetics & Development*, 41, 27-35. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2016.06.016>
- Socolow, S. M. (2016). *Las mujeres en la América Latina colonial*. Prometeo libros.
- Solis, L. L. (1985). La guerra de los Lonkos en Chile central, 1536-1545. *Chungara*, 91-114.
- Sutovsky, P., Moreno, R. D., Ramalho-Santos, J., Dominko, T., Simerly, C., & Schatten, G. (1999). Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature*, 402(6760), 371-372. <https://doi.org/10.1038/46466>
- Taanman, J. W. (1999). The mitochondrial genome: Structure, transcription, translation and replication. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1410(2), 103-123. [https://doi.org/10.1016/s0005-2728\(98\)00161-3](https://doi.org/10.1016/s0005-2728(98)00161-3)
- Taylor, M. A., Hendy, I. L., & Pak, D. K. (2014). Deglacial ocean warming and marine margin retreat of the Cordilleran Ice Sheet in the North Pacific Ocean. *Earth and Planetary Science Letters*, 403, 89-98. <https://doi.org/10.1016/j.epsl.2014.06.026>

- Tishkoff, S. A., & Verrelli, B. C. (2003). Patterns of Human Genetic Diversity: Implications for Human Evolutionary History and Disease. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 4(1), 293-340. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.4.070802.110226>
- Torrioni, A., Schurr, T. G., Cabell, M. F., Brown, M. D., Neel, J. V., Larsen, M., Smith, D. G., Vullo, C. M., & Wallace, D. C. (1993). Asian affinities and continental radiation of the four founding Native American mtDNAs. *American Journal of Human Genetics*, 53(3), 563–590.
- van Oven, M. (2015). PhyloTree Build 17: Growing the human mitochondrial DNA tree. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 5, e392-e394. <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2015.09.155>
- van Oven, M., & Kayser, M. (2009). Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Human Mutation*, 30(2), E386-394. <https://doi.org/10.1002/humu.20921>
- Vargas, C. G. (s. f.). MÉTODOS Y FORMAS DE RESISTENCIA INDÍGENA EN LA CRÓNICA DE GERÓNIMO DE BIBAR.
- Waters, M. R. (2019). Late Pleistocene exploration and settlement of the Americas by modern humans. *Science*, 365(6449), eaat5447. <https://doi.org/10.1126/science.aat5447>
- Weissensteiner, H., Pacher, D., Kloss-Brandstätter, A., Forer, L., Specht, G., Bandelt, H.-J., Kronenberg, F., Salas, A., & Schönherr, S. (2016). HaploGrep 2: mitochondrial haplogroup classification in the era of high-throughput sequencing. *Nucleic Acids Research*, 44(W1), W58–W63.
- Wood, M. R., Sturk-Andreaggi, K., Ring, J. D., Huber, N., Bodner, M., Crawford, M. H., Parson, W., & Marshall, C. (2019). Resolving mitochondrial haplogroups B2 and B4 with next-generation mitogenome sequencing to distinguish Native American from Asian haplotypes. *Forensic Science International: Genetics*, 43, 102143. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2019.102143>
- Wright, S. (1984). *Evolution and the genetics of populations, volume 4: variability within and among natural populations* (Vol. 4). University of Chicago press.
- Yang, I. S., Lee, H. Y., Yang, W. I., & Shin, K.-J. (2013). mtDNAprofler: a Web application for the nomenclature and comparison of human mitochondrial DNA sequences. *Journal of Forensic Sciences*, 58(4), 972–980.
- Zou, W., Slone, J., Cao, Y., & Huang, T. (2020). Mitochondria and Their Role in Human Reproduction. *DNA and Cell Biology*, 39(8), 1370-1378. <https://doi.org/10.1089/dna.2019.4807>

## 9. Anexos



**Dendrograma Neighbour-joining de secuencias D-loop del conjunto de individuos que se auto adscriben al pueblo Pikunche.** En la imagen se observa el dendrograma de neighbour-joining realizado con las secuencias de los individuos, representado en forma circular. Cada gama de color representa un haplogrupo mitocondrial. La gama azul corresponde a C1, verde a D1 y D4h3a, amarillo A2, naranja a B2. El color gris muestra los haplogrupos no amerindios (NA).

**ACTA DE APROBACIÓN  
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN SERES HUMANOS**

(Documento en versión 1 corregida 15.01.2018)

Con fecha 12 de Junio de 2018, el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile, integrado por los siguientes miembros:

Dr. Manuel Oyarzún G., Médico Neumólogo, Presidente  
Dr. Hugo Amigo C., PhD., Especialista en Salud Pública, Vicepresidente  
Dra. Lucia Cifuentes O., Médico Genetista  
Sra. Claudia Marshall F., Educadora, Representante de la comunidad.  
Dra. Grisel Orellana, Médico Neuropsiquiatra  
Prof. Julieta González B., Bióloga Celular  
Dra. María Angela Delucchi Biccocchi, Médico Pediatra Nefrólogo.  
Dr. Miguel O’Ryan, Médico Infectólogo  
Prof.<sup>a</sup> Maria Luz Bascañán Psicóloga PhD, Prof. Asociado.

Ha revisado el Proyecto de Investigación titulado: **“DEL POBLAMIENTO INICIAL DEL CONTINENTE A LA DIFERENCIACIÓN GEOGRÁFICA REGIONAL: UN ESTUDIO DIACRÓNICO DE LINAJES MATERNOS EN POBLACIONES HUMANAS DE CHILE”**. Y cuyo investigador responsable es el Dr. Mauricio Moraga Vergara, quien desempeña funciones en el Programa de Genética Humana, I.C.B.M, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

El Comité revisó los siguientes documentos del estudio:

- *Proyecto de investigación in extenso.*
- *CV del investigador responsable y de los Co-investigadores.*
- *Consentimiento Informado*
- *Carta de aceptación de las autoridades de las instituciones en que se realizará el estudio*
- *Carta compromiso del investigador para comunicar los resultados del estudio una vez finalizado éste.*

El proyecto y los documentos señalados en el párrafo precedente han sido analizados a la luz de los postulados de la Declaración de Helsinki, de las Pautas Éticas Internacionales para la Investigación Biomédica en Seres Humanos CIOMS 2016, y de las Guías de Buena Práctica Clínica de ICH 1996.

Sobre la base de esta información el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile se ha pronunciado de la siguiente manera sobre los aspectos del proyecto que a continuación se señalan:

- a) Carácter de la población estudiada: No cautiva, no terapéutico
- b) Utilidad del Proyecto: Aporte al conocimiento de la ancestría de la población actual chilena
- c) Riesgos y Beneficios: No hay riesgos para los participantes. Se usaran muestras previamente obtenidas por otros proyectos y objetivos comunes. Las muestras nuevas son de saliva y de sangre
- d) Protección de los participantes (asegurada por el Consentimiento Informado): Si están protegidos

Teléfono: 29789536 - Email: [comiteceish@med.uchile.cl](mailto:comiteceish@med.uchile.cl)



12 JUN 2018



**UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE MEDICINA**  
**COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS**

- e) Notificación oportuna de reacciones adversas: No se visualizan reacciones adversas
- f) El investigador responsable se ha comprometido a entregar los resultados del estudio a este Comité al finalizar el proyecto: Si se compromete
- g) Requiere seguimiento Site Visit : Si \_\_\_\_\_ No  Tiempo estimado\_Nº de visitas

Por lo tanto, el comité estima que el estudio propuesto está bien justificado y que no significa para los sujetos involucrados riesgos físicos, psíquicos o sociales mayores que mínimos.

En virtud de las consideraciones anteriores el Comité otorga la aprobación ética para la realización del estudio propuesto, dentro de las especificaciones del protocolo.

Se extiende este documento por el periodo de un año a contar desde la fecha de aprobación prorrogable según informe de avance y seguimiento bioético.

Lugar de realización del estudio: Programa de Genética Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Santiago, 12 de Junio de 2018.

  
**Dr. Hugo Amigo Cartagena**  
**Vicepresidente CEISH**



Archivo Proyecto Nº 072-2018  
Acta Nº025

**Teléfono: 29789536 - Email: comiteceish@med.uchile.cl**

12 JUN 2018

## **CONSENTIMIENTO INFORMADO**

### **TÍTULO DEL PROYECTO**

Del poblamiento inicial del continente a la diferenciación geográfica regional:  
un estudio diacrónico de linajes maternos en poblaciones humanas de Chile.

Nombre del Investigador principal: Dr. Mauricio Moraga Vergara  
R.U.T. 10.442.816-9  
Institución: Programa de Genética Humana, ICBM, Facultad de Medicina,  
Universidad de Chile.  
Teléfonos: 229786599

**Invitación a participar:** Estamos invitando a usted y a otras personas de su localidad a participar en el proyecto de investigación "Del poblamiento inicial del continente a la diferenciación geográfica regional: un estudio diacrónico de linajes maternos en poblaciones humanas de Chile". Este proyecto busca indagar en el pasado de la población chilena mediante el estudio del ADN mitocondrial de chilenos y chilenas actuales. El ADN mitocondrial en particular se hereda desde las madres a las hijas e hijos y ha sido usado extensamente en el estudio del poblamiento de América.

**Objetivos:** Esta investigación tiene por objetivo conocer las variantes de ADN mitocondrial presentes en la población chilena, específicamente aquellas de origen nativo americano, de modo de detectar variantes no detectadas previamente en poblaciones originarias.

**Procedimientos:** Si Ud. acepta participar, se le solicitará que responda una breve encuesta respecto a su origen y el de sus padres, además se le pedirá que nos de aproximadamente 2 ml de saliva, para lo cual tendrá que escupir en un tubo estéril. Todo el procedimiento incluyendo la encuesta no le tomará más de veinte minutos.

**Riesgos:** Los procedimientos relacionados a la toma de muestra de saliva no revisten ningún riesgo ni molestia para usted.

**Costos:** Este estudio no tendrá ningún costo para usted.



**Beneficios:** Este estudio no le proporcionará a usted beneficios personales directos, pero contribuirá al conocimiento de la estructura genética de la población chilena. Este conocimiento podría tener efectos beneficiosos respecto a la implementación de políticas de salud o de análisis de genética forense.

**Alternativas:** Usted es libre de participar o no participar en esta investigación y esa decisión no tendrá ninguna consecuencia para usted.

**Compensación:** Ud. no recibirá ninguna compensación económica por su participación en el estudio.

**Confidencialidad:** Toda la información derivada de su participación en este estudio será conservada bajo absoluta reserva. Las muestras de saliva no tendrán los nombres del participante siendo reemplazados por un número que hará anónima su muestra de ADN. Cualquier publicación o comunicación científica de los resultados de la investigación será completamente anónima y presentará sólo datos agregados a nivel poblacional.

**Voluntariedad:** Su participación en esta investigación es totalmente voluntaria y usted puede retirarse en cualquier momento del estudio comunicándolo al investigador responsable, de ser así su muestra será destruida a petición suya.

**Derechos del participante:** Usted tiene derecho a conocer los resultados generales del estudio y los suyos propios, los que podrá solicitar al investigador responsable del proyecto si así lo desea. Usted recibirá una copia íntegra y escrita de este documento de consentimiento informado firmado. Si usted requiere cualquier otra información sobre su participación en este estudio puede comunicarse con: Dr. Mauricio Moraga Vergara, [mmoraga@med.uchile.cl](mailto:mmoraga@med.uchile.cl), teléfono 229786599 o 229786466.

**Otros Derechos del participante**

En caso de duda sobre sus derechos debe comunicarse con el Presidente del "Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos", Dr. Manuel Oyarzún G., Teléfono: 229789536, Email: [comiteceish@med.uchile.cl](mailto:comiteceish@med.uchile.cl), cuya oficina se encuentra ubicada a un costado de la Biblioteca Central de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile en Av. Independencia 1027, Comuna de Independencia.



12 JUN 2018

2

**Conclusión:**

Después de haber recibido y comprendido la información de este documento y de haber podido aclarar todas mis dudas, otorgo mi consentimiento para participar en el proyecto "Del poblamiento inicial del continente a la diferenciación geográfica regional: un estudio diacrónico de linajes maternos en poblaciones humanas de Chile."

\_\_\_\_\_  
Nombre de la o el Participante  
Rut: \_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Firma

\_\_\_\_\_  
Nombre de la o el Encuestador  
Rut: \_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Firma

Mauricio Moraga Vergara

\_\_\_\_\_

Nombre del investigador  
Rut: 10.442.816-9

Firma

Fecha: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / 20\_\_



12 JUN 2018

**FICHA TOMA DE MUESTRA**

**PROYECTO:** “Del poblamiento inicial del continente a la diferenciación geográfica regional: un estudio diacrónico de linajes maternos en poblaciones humanas de Chile.”

**INVESTIGADOR RESPONSABLE:** Dr. **Mauricio Moraga** F: 229786599 correo: mmoraga@med.uchile.cl  
**INSTITUCIÓN PRINCIPAL:** PGH, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

**FECHA TOMA MUESTRA:** \_\_\_ / \_\_\_ / 202\_\_

**N° MUESTRA: PIK** \_\_\_\_\_

LUGAR DE TOMA DE MUESTRA: \_\_\_\_\_

DATOS DE CONTACTO: \_\_\_\_\_

EDAD: \_\_\_\_\_ AÑO DE NACIMIENTO: \_\_\_\_\_ LUGAR DE NACIMIENTO: \_\_\_\_\_

NOMBRES: \_\_\_\_\_

APELLIDO PATERNO: \_\_\_\_\_ APELLIDO MATERNO: \_\_\_\_\_

LUGAR DE RESIDENCIA: \_\_\_\_\_ SEXO: MASCULINO \_\_\_ FEMENINO \_\_\_

**DATOS DEL PADRE:**

APELLIDO PATERNO: \_\_\_\_\_ APELLIDO MATERNO: \_\_\_\_\_

LUGAR NACIMIENTO: \_\_\_\_\_ LUGAR RESIDENCIA: \_\_\_\_\_

**DATOS DEL ABUELO PATERNO:**

APELLIDO PATERNO: \_\_\_\_\_ APELLIDO MATERNO: \_\_\_\_\_

LUGAR NACIMIENTO: \_\_\_\_\_ LUGAR RESIDENCIA: \_\_\_\_\_

**DATOS DE LA ABUELA PATERNA:**

APELLIDO PATERNO: \_\_\_\_\_ APELLIDO MATERNO: \_\_\_\_\_

LUGAR NACIMIENTO: \_\_\_\_\_ LUGAR RESIDENCIA: \_\_\_\_\_

**DATOS DE LA MADRE:**

APELLIDO PATERNO: \_\_\_\_\_ APELLIDO MATERNO: \_\_\_\_\_

LUGAR NACIMIENTO: \_\_\_\_\_ LUGAR RESIDENCIA: \_\_\_\_\_

**DATOS DEL ABUELO MATERNO:**

APELLIDO PATERNO: \_\_\_\_\_ APELLIDO MATERNO: \_\_\_\_\_

LUGAR NACIMIENTO: \_\_\_\_\_ LUGAR RESIDENCIA: \_\_\_\_\_

**DATOS DE LA ABUELA MATERNA:**

APELLIDO PATERNO: \_\_\_\_\_ APELLIDO MATERNO: \_\_\_\_\_

LUGAR NACIMIENTO: \_\_\_\_\_ LUGAR RESIDENCIA: \_\_\_\_\_

**IDENTIFICACIÓN ÉTNICA / ATRIBUCIÓN CULTURAL**

En Chile se reconoce la existencia de pueblos originarios indígenas.

¿Es usted descendiente o tiene antepasados de alguno de ellos? Si \_\_\_ No \_\_\_ ¿Cuál? \_\_\_\_\_

¿Se siente identificado con alguna etnia indígena? Si \_\_\_ No \_\_\_ ¿Cuál? \_\_\_\_\_

Pertenece a una comunidad o asociación indígena? Si \_\_\_ No \_\_\_ ¿Cuál? \_\_\_\_\_

**OBSERVACIONES:** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_