

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**LOS ALELOS DEL GRUPO SANGUÍNEO O EN LOS
NATIVOS AMERICANOS Y SUS IMPLICACIONES EN EL
POBLAMIENTO DE AMÉRICA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

PRESENTA

M. en I.B.B. BENITO ESTRADA MENA

MÉXICO, D.F.

MAYO DEL 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Programa Doctorado en Ciencias Biomédicas.

Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M.

Departamento de Biología Molecular y Biotecnología.

Tutor: Dr. Alejandro García Carrancá.

Comité tutorial: Dr. Gerardo Gamba y Dr. Marco Cerbón.

Jurado de examen de grado:

Dr. Ruben Lisker

Dr. Alejandro García

Dra. Susana Kofman

Dr. Daniel Piñero

Dr. Jaime Berumen

A mis demonios*

* a la manera de Edgar Morin

*Caminante, son tus huellas
el camino y nada más;
caminante, no hay camino,
se hace camino al andar.
Al andar se hace camino
y al volver la vista atrás
se ve la senda que nunca
se ha de volver a pisar.
Caminante no hay camino
sino estelas en la mar.*

Antonio Machado

Nosotros somos los descendientes de esos hombres. Es de ellos sin duda de quienes hemos heredado la exigencia de una explicación, la angustia que nos constriñe a buscar el sentido de la existencia. Angustia creadora de todos los mitos, de todas las religiones, de todas las filosofías y de la ciencia misma.

Jacques Monod

Agradecimientos

Al pie del árbol. La red de las redes:

En un sentido, este manuscrito es como un palimpsesto (o como una historia de M. Ende), en el que la presente historia ha cubierto otras historias; historias que se conectan con otras historias y que sin embargo, han dejado sus huellas en ésta. Mi más profundo agradecimiento a todos aquellos con los que compartí historias; muchos ya no están, pero quedan las historias; a todos aquellos con los que comparto historias; muchos ya no estarán, pero quedarán las historias; finalmente, también yo no estaré, pero quedará esta historia.

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Programa del Doctorado en Ciencias Biomédicas de la UNAM.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT por haberme otorgado una beca para la realización de mis estudios.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Al departamento de Biología Molecular y Biotecnología.

Al Dr. Alejandro García Carrancá, por su gran apoyo, disposición y por darme toda la libertad para realizar esta investigación. Por su amistad.

Al Dr. Gerardo Gamba y al Dr. Marco Cerbón, miembros de mi comité tutorial.

Al jurado de la tesis por sus comentarios y correcciones: Dr. Ruben Lisker, Dr. Daniel Piñero, Dra. Susana Kofman, Dr. Jaime Berumen y Dr. Alejandro García.

Al Dr. Javier Estrada, por ayudarme en el análisis de las secuencias y facilitarme su lab y el secuenciador “de tiempo completo”; al Dr. Raúl Ulloa, por su asesoría y contribuciones en el análisis estadístico de los datos; al Dr. Héctor Villalobos por sus contribuciones para mejorar el trabajo; a las Técnicas Académicas del laboratorio, Miriam Guido y Rocío Méndez por ayudarme en el procesamiento y secuenciación de muestras; al Dr. Ramón Coral y al Dr. Julio Granados por su gran disposición y contribución de muestras de DNA. Además, a todos ellos, gracias por su amistad.

A mis compañeros del laboratorio de Biomédicas.

A Anali y LAU por su amistad y por las antiguas historias de LABO y otras más recientes.

A los miembros del laboratorio de la Escuela de Medicina de la Universidad Panamericana, por su hospitalidad.

Al prof. Victor Acuña de la ENAH, por su interés en mi trabajo, para exponerlo y discutirlo en un contexto antropológico.

A todas las personas que donaron generosamente sus muestras de sangre.

A todos mis ancestros.

A mi madre Hortensia y a mi padre Benito, por la vida, su cariño y por ser mis primeros maestros.

A mis hermanos por los genes, el cariño y las historias compartidas.

A mis hermano Javier, por los muchos apoyos para realizar esta historia, por su hospitalidad; por las muchos niveles de historias compartidas, por escuchar mis historias de las historias.

A mi hermano Israel, la persona más inteligente, perceptiva y rápida que conozco. Por todos sus consejos.

A mi hermana Araceli, mí cuñado Roberto y mis sobrinos Jazmín y Roberto T. Por su cariño y lo que hemos compartido. Les toca construir sus propias historias y expandir el linaje.

Al Capitán Douglas T., por sus enseñanzas en el arte de navegar, para ir más allá de las historias, o antes. Las velas y el viento, no mueven el barco...

A Laura y mis compañeros de tripulación del barco Maya.

A Manuel T. y la Montaña, por ayudarme a contar otras historias de las historias.

A Suany, por entretener nuestros seres y nuestras historias. Por su impulso y apoyo para terminar ésta.

Contenido

I. INTRODUCCIÓN

El Poblamiento de América.....	16
El cambio climático en el Último Máximo Glacial.....	17
Las posibles rutas de entrada hacia Norteamérica.....	21
Las evidencias arqueológicas.....	23
Las evidencias lingüísticas.....	26
Las evidencias genéticas.....	27
Fuera de Beringia: El modelo de incubación o de tres etapas.	31
Escenarios de migración alternativos.....	35
Flujo genético post-glacial.....	36
Cambios de la estructura genética en las poblaciones nativas americanas después del contacto Europeo.....	37
Los grupos sanguíneos ABO.....	39
Las bases moleculares de los alelos ABO.....	40
Posibles causas para la alta frecuencia del grupo sanguíneo O en los Nativos Americanos.....	42
II. HIPÓTESIS y OBJETIVOS.....	48
III. MATERIAL Y METODOS	
Nomenclatura de los alelos O.....	49
Colecta de muestras y serología de los grupos sanguíneos ABO.....	49
Preparación del DNA, amplificación y secuenciación	

de los exones 6 y 7.....	51
Análisis de las secuencias.....	54
IV. RESULTADOS	
Diversidad de secuencias de los haplotipos O encontrados en las poblaciones nativas de Meso América y Sudamérica.....	57
Análisis de varianza molecular (AMOVA) entre las poblaciones mesoamericanas y sudamericanas.....	63
Heterocigocidad nucleotídica pareada entre las poblaciones Nativas americanas.....	63
Diversidad genética de los alelos O en las poblaciones Nativas Americanas.....	68
Correlación entre las distancias genética y geográfica de las poblaciones Nativas Americanas.....	74
Prueba de neutralidad de Tajima para los haplotipos O en los Nativos Americanos.....	75
V. DISCUSIÓN	82
La mutación G542A como un Marcador Informativo de Ancestría (AIM) del componente Nativo Americano.....	83
Incubación en Beringia, posible origen de la mutación G542A.....	84
Los alelos ABO de los Nativos Americanos y el poblamiento de América.....	86
El predominio de los alelos O en los Nativos Americanos.....	87
La estructura genética de las poblaciones de Meso América y Sudamérica.....	88

VI. CONCLUSIONES y PERSPECTIVAS	90
VII. BIBLIOGRAFÍA	92
VIII. Apéndice1. Blood Group Alleles in Native Americans: Implications in the Peopling of Americas. Benito Estrada-Mena et al. Am J Phys Anthropol, 2010.	101

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Principios básicos del Sistema ABO.....	
Tabla 2. Polimorfismos moleculares de los alelos ABO.....	
Tabla 3. Datos de las poblaciones estudiadas en el presente trabajo.....	
Tabla 4. Variaciones de las secuencias nucleotídicas en los exones 6 y 7 de los haplotipos O observados en las poblaciones Nativas Americanas.....	
Tabla 5. Correlación de la mutación G542A y el alelo O ^{1v}	
Tabla 6. Estimados de la diversidad de secuencias en los alelos O de las poblaciones Nativas Americanas.....	
Tabla 7. Análisis de varianza molecular (AMOVA) entre las poblaciones mesoamericanas y sudamericanas con uno o dos grupos.....	
Tabla 8. Diversidad nucleotídica “por parejas” (π_{ij}) entre las poblaciones Nativas Americanas.....	
Tabla 9. Diversidad genética (H_E), Índice de fijación (F_{IS}) y valores p basados en las frecuencias de los alelos O de nueve poblaciones Nativas Americanas....	
Tabla 10. Frecuencias de los principales alelos O en trece poblaciones Americanas y tres poblaciones Asiáticas.....	
Tabla 11. Distancias genéticas (coancestría de Reynolds) entre las poblaciones Nativas Americanas.....	
Tabla 12. Distancias geográficas entre las poblaciones Nativas Americanas.....	
Tabla 13. Prueba de Mantel para evaluar la correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica de las poblaciones Nativas Americanas.....	

Tabla 14. Prueba de neutralidad de Tajima para los haplotipos O en

Los Nativos Americanos.....

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Variación climática durante el Pleistoceno.....	18
Figura 2. América del Norte hace 18,000 y 12,000 años.....	20
Figura 3. Las dos rutas de colonización propuestas del continente Americano....	22
Figura 4. Ejemplos de puntas Paleoindias clásicas y estilos de puntas de sitios claves de la Gran Llanura.....	24
Figura 5. Distribución de las tres familias lingüísticas en el continente americano propuestas por Greenberg.....	29
Figura 6. El modelo de Incubación en Beringia o de tres etapas para el poblamiento de América.....	34
Figura 7. Organización del locus <i>ABO</i>	41
Figura 8. Mapas de la distribución de los grupos sanguíneos A, B y O en las poblaciones indígenas del mundo.....	47
Figura 9. Localización geográfica de las poblaciones mesoamericanas estudiadas y de las poblaciones sudamericanas usadas para comparación.....	53
Figura 10. Red mínima de los siete haplotipos O, observados en las poblaciones nativas de Mesoamérica y Sudamérica.....	59
Figura 11. Representación de Escalamiento Multidimensional basada en la diversidad nucleotídica “pairwise” (π_{ij}) entre las poblaciones Nativas Americanas.....	67
Figura 12. Distribución de los tres alelos O predominantes (O^1 , O^{1v} , y $O^{1v(G542A)}$) en trece poblaciones Americanas y tres Asiáticas.....	71

Figura 13. Árbol *neighbour-joining* sin raíz entre 13 poblaciones
Americanas y tres poblaciones Asiáticas, basado en los
tres haplotipos O predominantes73

Figura 14. Gráficas de la prueba de Mantel.....87

Resumen

Los grupos sanguíneos A, B y O del sistema ABO, se encuentran presentes en todas las poblaciones nativas del mundo; sin embargo, la mayoría de las poblaciones nativas de América poseen en más del 90% al grupo sanguíneo O.

Se ha postulado que este patrón de diversidad pudo haberse originado, ya sea por un efecto fundador durante la colonización del Nuevo Mundo; por efecto de la selección natural en respuesta a enfermedades infecciosas; o por deriva génica asociada a una disminución poblacional promovida por el contacto europeo. La caracterización molecular de los alelos O, podría contribuir para esclarecer las posibles causas de la alta frecuencia del grupo O en las poblaciones nativas americanas. En este trabajo, se estudió la diversidad de secuencias de los exones 6 y 7 del locus *ABO* en 180 individuos con grupo sanguíneo O de cuatro poblaciones mesoamericanas (Nahua, Mazahua, Maya y mestiza de México). Además, se llevó a cabo un análisis comparativo de la diversidad genética y de la estructura poblacional con varias poblaciones de Sudamérica (Cayapa, Arara, Kayapo, Yanomama, Parakana, Huilliche, Aymara y mestiza de Chile) y algunas poblaciones de Asia (japonesa, china y coreana). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos mesoamericano y sudamericano; pero sí, dentro de los grupos poblacionales. Estas diferencias, pueden ser el resultado de procesos de deriva génica y efecto fundador que ocurrieron durante las migraciones de las poblaciones después de haber entrado a América, tal como se ha encontrado al analizar otros marcadores genéticos. Es de gran interés señalar, que en todas las poblaciones americanas estudiadas, se encontró presente el mismo conjunto de haplotipos O^1 , O^{1v} , y $O^{1v(G542A)}$. Estos resultados sugieren que: este conjunto de

haplotipos constituye la principal fuente genética de la población fundadora del continente americano; y además, que estos haplotipos proceden de la misma fuente ancestral, apoyando así, la hipótesis de una sola población fundadora. Así mismo, la presencia constante y exclusiva de la mutación G542A en las poblaciones nativo americanas, en contraste a su ausencia en las otras poblaciones del mundo, permite proponer que esta mutación sea empleada como un Marcador Informativo de Ancestría (MIA). Tanto la mayor frecuencia del alelo O^{1V} con respecto a la del alelo O^1 (al contrario de lo observado en otras poblaciones del mundo), así como la alta frecuencia del alelo raro $O^{1V(G542A)}$, junto a los valores no significativos que se obtuvieron en la prueba de neutralidad de Tajima, sugieren que un evento aleatorio (efecto fundador o deriva génica) pudo ser el responsable de la fijación del grupo sanguíneo O. A partir del actual conocimiento del poblamiento de América, se pueden hacer inferencias acerca del modo en la que la mutación G542A pudo haberse originado en Beringia, probablemente durante el proceso de diferenciación de los linajes asiáticos que dieron lugar a la población fundadora de América.

Introducción

El poblamiento de América

Uno de los rasgos que comparten todos los hombres y pueblos del mundo, es el de tener una gran curiosidad acerca de sus orígenes. En la historia de las migraciones humanas, existe el consenso de que el continente americano, fue la última tierra en ser colonizada por el *Homo sapiens*.

El poblamiento temprano de América, es uno de los temas de estudio más excitantes y vigentes acerca de la historia humana. ¿Cuándo se colonizó? ¿De dónde vinieron los primeros pobladores y que rutas siguieron? ¿Cuántas oleadas migratorias se llevaron a cabo? ¿Qué factores influyeron en la colonización de estas tierras?

Los investigadores de diferentes disciplinas tales como la Arqueología, la Antropología, la Lingüística, y más recientemente la Genética Molecular han abordado estas cuestiones por varias décadas y han obtenido diversas respuestas, de las cuáles, algunas de ellas, han resultado contradictorias. Sin embargo, en la actualidad existe el consenso, de que los ancestros de los nativos americanos vinieron de Asia vía Beringia, y continúa al presente, el debate sobre el tiempo y el número de las principales migraciones (Dillehay 2009; Goebel et al. 2008; Jobling M A et al. 2004; Mulligan et al. 2004; Salzano 2007; Scurr 2004).

El cambio climático en el Último Máximo Glacial (UMG)

La época geológica denominada Pleistoceno dio comienzo hace 1.8 millones de años y finalizó aproximadamente hace 10,000 años de radiocarbono (calibrados) o AP (antes del presente). Esta época, abarca las últimas glaciaciones y se caracterizó por sus grandes fluctuaciones climáticas. Tuvo periodos de clima frío y periodos de clima cálido, superponiéndose uno a otro a intervalos de aproximadamente 100,000, 41,000 y 23,000 años dando como resultado los ciclos glacial-interglacial (frío-cálido) (Figura 1) (Hofreiter and Stewart 2009; Lambeck et al. 2002).

El Último Máximo Glacial (UMG) (en inglés, *Last Glacial Maximum*, LGM) se refiere a la época de máxima extensión de las capas de hielo durante el último período glacial o última edad de hielo (llamada Würm en Europa y Wisconsin en América), que ocurrió aproximadamente hace 20,000 años AP y cuyo retraimiento de las placas de hielo sucedió aproximadamente hace 10,000 años AP (Holliday 2009).

En el hemisferio norte, el Último Máximo Glacial supuso un enorme cambio de paisaje. Durante los estadios más fríos, los mantos de hielo y el suelo congelado ocupaban de forma perenne, en invierno y en verano, 27 millones de kilómetros cuadrados, es decir, un 40 % de las áreas continentales de Norteamérica y de Eurasia. Los avances glaciales crearon dos enormes zonas ocupadas por hielos, una en Norteamérica y otra al norte de Eurasia: el casquete Laurentiano y el casquete Finoescandinavo, respectivamente. El casquete Laurentiano, ocupaba durante el Último Máximo Glacial una extensión de 16 millones de km² y su volumen era de unos 30 millones de km³, un tercio del total del hielo continental terrestre de esa época. La extensión de este casquete hacia el sur, llegaba por la costa este de Norteamérica

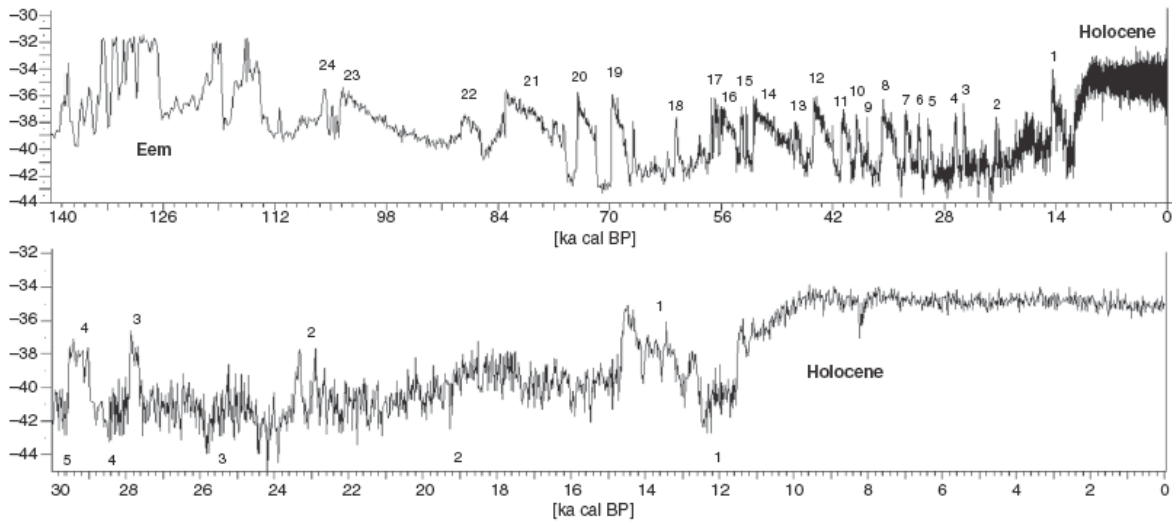


Figura 1. Variación climática durante el Pleistoceno.

El eje x, corresponde al tiempo, calibrado en miles de años antes del presente; el eje y, muestra la variación en el proporción del isótopo de oxígeno, en el que valores más negativos indican temperaturas más frías. **Panel superior:** Cambio climático durante los últimos 140,000 años. Los números muestran periodos cálidos durante el último glacial. El Eem, es el periodo interglacial anterior al último glacial. **Panel inferior:** Acercamiento de los cambios climáticos durante los últimos 30,000 años. Los interestadios están numerados arriba de la curva climática, y los estadios debajo de la curva climática. Tomada de (Hofreiter and Stewart 2009).

hasta una latitud de 36° N, en donde hoy se localiza Nueva York. La altura máxima del casquete se situaba por encima de lo que es hoy la Bahía de Hudson. Allí el espesor del hielo alcanzaba entre los 3.000 y los 4.000 metros. En el extremo occidental, el casquete Laurentiano se juntaba, al llegar al sistema de las Montañas Rocosas, con el casquete de hielo occidental que cubría las Cadenas Costeras del Pacífico: el casquete de la Cordillera (Figura 2) (DeChaine 2008; Holliday 2009).

Además de las bajas temperaturas y sus consecuencias para la vida de las plantas y los animales, la glaciación, tuvo efectos importantes sobre el nivel del mar. América del Norte quedó unida por tierra a Asia por el puente terrestre de Beringia situado entre Siberia y Alaska, justo donde se encuentra ahora el Estrecho de Bering. Este puente terrestre estuvo presente entre 65,000 y 36,000 años calibrados AP, y una vez más entre 30,000 y 13,000 años calibrados AP, y alcanzó una extensión cercana a los 2000 km. La tierra en esta región no estuvo cubierta por capas de hielo, sino probablemente por tundra, dominada por hierba, juncia y *Artemisa*, y habitada por una rica fauna que incluía mamuts, tigres con dientes de sable, bisontes, bueyes almizcleros, ovejas, rinocerontes, caballos, caribúes y camellos (Guthrie 2001). Por otra parte, durante casi todo el Pleistoceno, el casquete glacial que cubría la mayor parte de Norteamérica formaba una barrera impenetrable, y aunque en un tiempo se formó el “corredor libre de hielo” entre el casquete Florentino y el casquete de la Cordillera, el cuál se extendía desde lo que hoy es el Yukon, pasaba por Canadá y llegaba hasta Montana, las condiciones ambientales probablemente eran inhóspitas (Figura 2).

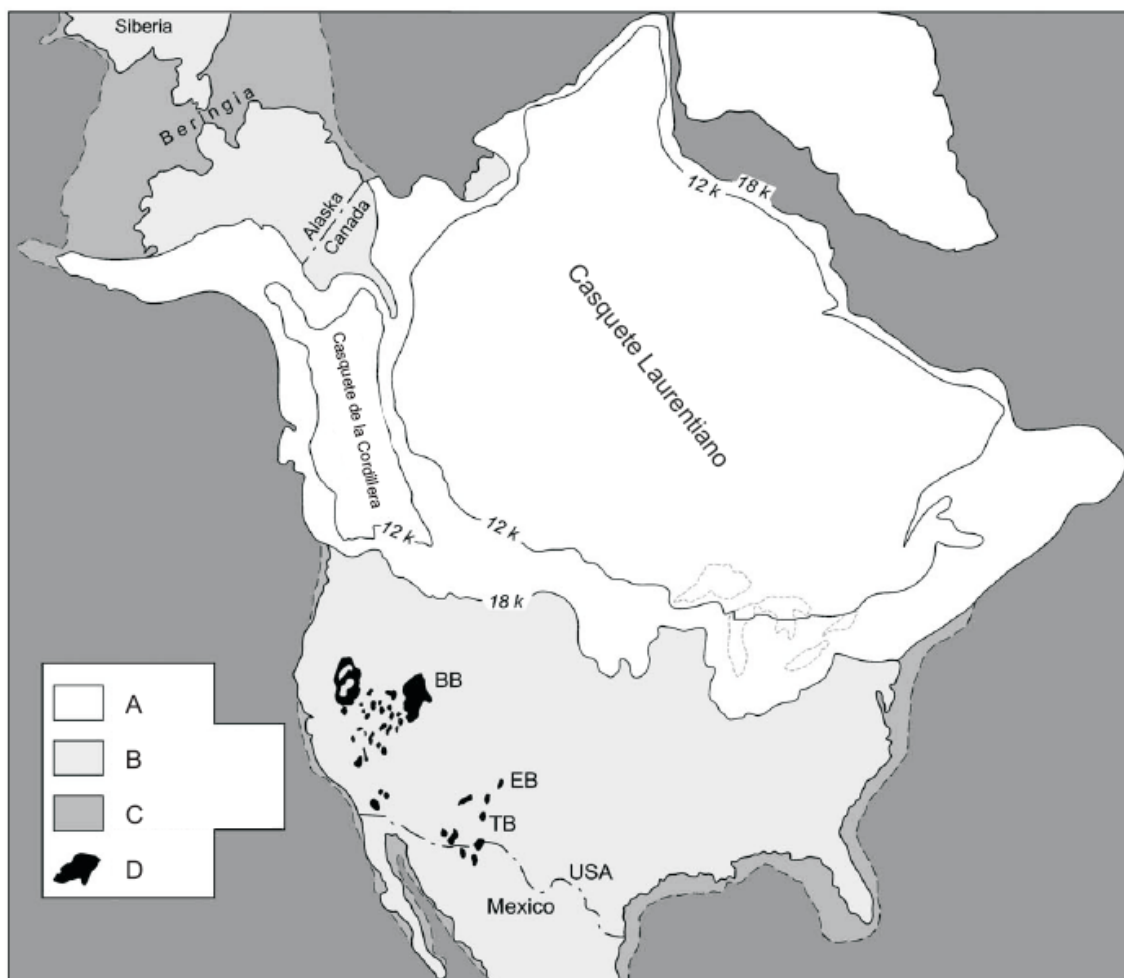


Figura 2. América del Norte hace 18,000 y 12,000 años. Se señalan: **A)** La extensión de las principales placas de hielo continentales (Laurentiano y de la Cordillera) durante el UMG (hace 18,000 años radiocarbono AP) y en 12,000 años radiocarbono BP (12 k), previamente a la aparición de los artefactos estilo Clovis (el “Corredor Libre de Hielo” esta aparente como la zona que separa las dos placas de hielo en 12 k); localización de los Grandes Lagos en relación a la extensión de los hielos; **B)** La extensión de las áreas terrestres continentales modernas aparte de los glaciales ;**C)** La extensión de las áreas terrestres continentales, incluyendo Beringia, cuándo bajo el nivel del mar durante el UMG; y **D)** Localización de paleo-lagos en el oeste de Estados Unidos (BB = Bonneville Basin; EB = Estancia Basin; TB = Tularosa Basin). Tomada de (Holliday 2009).

Todos estos cambios medioambientales, sin duda alguna, influyeron sobre la distribución y diversidad genética de las plantas y los animales, y promovieron el poblamiento de las tierras deshabitadas (DeChaine 2008).

Las posibles rutas de entrada hacia Norteamérica

Un tema que es significativo para la colonización temprana del continente americano tiene que ver con las rutas que pudieron haber estado accesibles para ingresar hacia América del Norte. Se han considerado dos rutas; la primera de ellas, sería por tierra a través del puente terrestre de Beringia, con un acceso al interior de Norteamérica por el llamado “corredor libre de hielo”; y la otra, sería a lo largo de las costas de Siberia, Beringia y América del Norte (Figura 3). En relación a la primera, es importante señalar que dado que algunos sectores de la ruta terrestre fueron solamente transitables durante periodos limitados, existen restricciones para las posibles fechas de entrada. Por el contrario, la ruta costera no tuvo este tipo de restricciones. El puente terrestre de Beringia fue más extenso cuando la mayoría del hielo estaba presente en el casquete de hielo, pero debido a este hecho, el casquete impediría el posible movimiento hacia el interior de Norteamérica; la presencia simultánea del puente terrestre y del “corredor libre de hielo” estuvo limitada a una fecha antes de los 36,000 años calibrados antes del presente y a un corto periodo cerca del final de la edad del hielo. Los posibles emigrantes se pudieron haber desplazado al interior de Alaska entre estas fechas, pero de acuerdo a este modelo, no pudieron haber sido capaces de penetrar más adentro en este tiempo. No existe evidencia directa del uso del “corredor libre de hielo” por los humanos. El análisis del

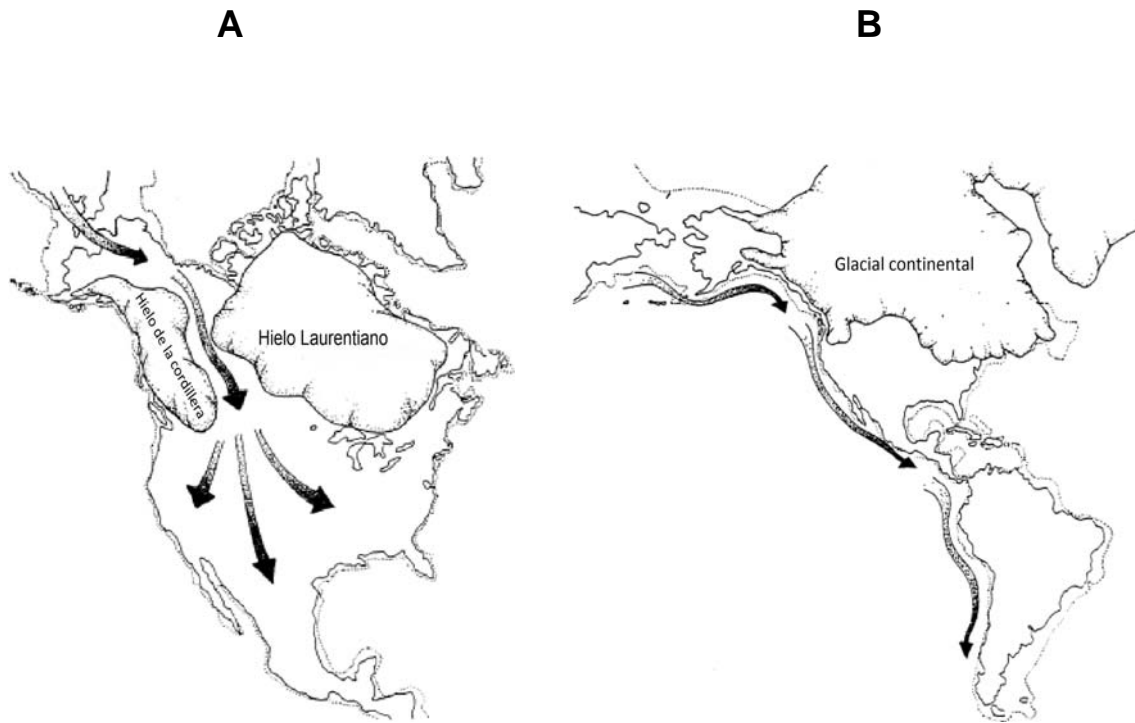


Figura 3. Las dos rutas de colonización propuestas del continente Americano. A, la ruta del corredor “libre de hielo”; **B,** la ruta costera. Tomada de (Dixon 2001).

ambiente costero del noroeste, ha resultado complicado, debido a los cambios del nivel del mar que han tenido lugar; la línea costera del Pleistoceno tardío ahora se encuentra sumergida y por lo tanto se dificultado la búsqueda de sitios arqueológicos. Sin embargo, los restos humanos encontrados cercanos a la costa, se han fechado en 11, 000 años calibrados AP y las herramientas de piedra, recobradas debajo del agua en la costa de la Columbia

Británica, provenientes de depósitos de 10,600 años calibrados AP de edad, demuestran la presencia humana al principio del periodo post-glacial. El uso más temprano de esta ruta durante el periodo glacial parece posible y es un importante foco para futuras investigaciones (Dillehay 2009; Dixon 2001; Goebel et al. 2008; Scurr 2004).

Las evidencias arqueológicas

Hasta hace relativamente poco tiempo, la explicación dominante para la colonización del continente Americano era la del modelo *Inicio-Clovis*. Según este modelo, las primeras poblaciones humanas entraron al continente americano hace aproximadamente 12,900 años AP, después del Último Glacial Máximo (UGM) (24,000-13,050 años AP). Se ha postulado que los primeros pobladores entraron por el puente terrestre de Beringia y siguieron por el “corredor libre de hielo”, que estaba abierto en Norteamérica, hacia el interior del continente, y de ahí, se expandieron rápidamente hacia las demás áreas deshabitadas de América. Se cree que estos primeros pobladores formaron parte de una tradición cultural que empleaba grandes puntas bifaciales para la caza mayor (Figura 4). Debido a que no se habían



Figura 4. Ejemplos de puntas Paleoindias clásicas y estilos de puntas de sitios claves de la Gran llanura. (a-d son estilos “aflautados”; e-h son estilos lanceolados): a, b) Puntas Clovis del sitio Clovis (Blacwater Dra. No. 1) en Nuevo México; c, d) puntas Folsom, también del sitio Clovis; e) Una variante Alberta del estilo Scottbluff del sitio Hudson-Meng, en Nebraska; f) Una punta Cody del sitio Clovis; g) una punta Plainview del sitio Plainview, Texas; h) Una punta Hell Gap, Wyoming. Las puntas son reproducciones de plástico de los artefactos originales de la colección C. Vance Haynes, del Departamento de Antropología de la Universidad de Arizona. Tomada de (Holliday 2009).

descubierto o confirmado sitios paleoindios más antiguos y porque se pensaba que todas las otras tradiciones líticas de Norteamérica derivaban de la cultura Clovis, muchos arqueólogos opinaban que las puntas Clovis demarcaban la ocupación por grupos humanos modernos más temprana de América (Dillehay 2009; Dixon 2001; Goebel et al. 2008; Mulligan et al. 2004; Salzano 2007; Scurr 2004).

Sin embargo, recientes datos arqueológicos han puesto en cuestionamiento el modelo de Clovis. El sitio Meadowcroft en Pennsylvania, el sitio Cactus Hill en Virginia, el sitio Topper en Carolina del Sur, varios sitios en Texas y otros emplazamientos, todos ellos fechados entre 16,000-14,250 años calibrados AP, tiempos que son más antiguos que los asociados con los sitios líticos en Norte América (12,900-12,550 años calibrados AP). De forma similar, un número creciente de sitios en Sudamérica, incluyendo el sitio Monte Verde en el sur de Chile, son de la misma edad, si no es que más viejos que los sitios Clovis. De todos estos sitios sudamericanos, se han colectado materiales líticos y culturales que no parecen haber sido creados por la gente Clovis. La existencia de estas culturas Pre-Clovis implica que los ancestros de los nativos americanos llegaron al Nuevo Mundo antes de 13,000 años calibrados AP y por lo tanto, comenzaron el poblamiento de América previo a la emergencia de la tradición Clovis en Norteamérica (Dillehay 2009; Goebel et al. 2008).

Los estudios de variación craneométrica han revelado diferencias biológicas entre los pobladores más tempranos de América, los paleoindios, y las poblaciones presentes desde el periodo Arcaico (7000 años calibrados AP) hasta los tiempos modernos (Brace et al. 2001; Jantz and Owsley 2001; Ross et al. 2002). Muchos de los cráneos de los paleoindios, incluyendo el del hombre de Kennewick de 9300 años

de edad (Chatters, 2001), tienen alguna semejanza con los de las poblaciones antiguas de Eurasia/Este del Asia (Brace et al, 2001; Hanihara et al. 2003, 2004). Los individuos paleoindios muestran un rango mucho más amplio en sus rasgos craneofaciales comparados a los nativos americanos tardíos, y además casi no muestran una superposición de estos rasgos con estos grupos. Estas diferencias sugieren que los paleoindios y las siguientes poblaciones nativas pueden haber surgido de dos migraciones temporalmente distintas que se originaron en diferentes partes de Asia. Sin embargo, no todos los investigadores están de acuerdo en que estos resultados reflejen dos migraciones, y se inclinan a pensar que estas diferencias craneofaciales representan formas extremas a lo largo de un continuo de variación morfológica (Gonzalez-Jose et al. 2008).

Las evidencias lingüísticas

Existe toda una línea de investigación que ha tratado de correlacionar las variaciones genéticas con las variaciones lingüísticas en las poblaciones humanas (Cavalli-Sforza et al. 1992). En 1986, Greenberg y colaboradores, argumentaban que todas las lenguas de los nativos americanos, excepto las de los grupos Na-Dene y Eskimal-Aleutiano, son similares y que pueden ser clasificadas dentro de una misma unidad lingüística, que llamaron “Amerindios” (Figura 5) (Greenberg et al. 1986).

La familia lingüística Eskimal-Aleutiano se habla en el extremo norte, así como en Groenlandia y algunas partes de Siberia. Esta familia es ampliamente reconocida y aceptada. La familia lingüística Na-Dene, se habla en algunas partes de Norteamérica y tiene divisiones más profundas que la de los Eskimal-Aleutiano. Esta familia, también es ampliamente reconocida. La familia lingüística Amerindia, es vasta y

contiene el resto de las lenguas que se hablan en Norteamérica y todas las lenguas endémicas de Centro y Sudamérica. En contraste a las dos familias anteriores, el agrupamiento de todas las diversas lenguas en una sola familia, es muy controvertida. La clasificación tripartita de Amerindios, Na-Dene y Esquimal-Aleutiano, se basó en el método de comparación multilateral, el cuál examina muchas lenguas simultáneamente para detectar similitudes en un pequeño número de palabras básicas y elementos gramaticales.

Greenberg y colaboradores, en una síntesis de evidencias lingüísticas, dentales y genéticas, sugerían que estos tres grupos lingüísticos representan tres migraciones separadas hacia América que ocurrieron en el siguiente orden: Amerindios, Na-Dene, y Eskimal-Aleutiano (Figura 5) (Greenberg et al. 1986). Inicialmente, esta teoría recibió apoyo del análisis de los grupos sanguíneos ABO, del DNA mitocondrial (mtDNA), y de varios marcadores autosómicos (Cavalli-Sforza et al. 1994; Torroni et al. 1993). Mientras que la clasificación lingüística de Greenberg ha sido ampliamente usada por los investigadores de genética humana en las dos últimas décadas, esta ha sido rechazada por virtualmente todos los lingüistas históricos que estudian los lenguajes Nativos Americanos (Bolnick et al. 2004; Gonzalez-Jose et al. 2008; Schurr 2004).

Las evidencias genéticas

En contraste a la gran diversidad de sus culturas y lenguas, las poblaciones indígenas contemporáneas de América, tienen un nivel reducido de diversidad genética. Este patrón de diversidad pudo haberse formado por un cuello de botella de

moderada intensidad durante o posterior al poblamiento de América (Battilana et al. 2006; Rosenberg et al. 2002; Zhivotovsky et al. 2003).

La mayoría de los estudios de genética molecular relacionados con el poblamiento del continente americano, se han enfocado en el genoma mitocondrial (mtDNA), que es heredado por vía materna, y en el cromosoma Y, que es heredado por vía paterna. El estudio de estos marcadores genéticos, indican que la mayoría de las poblaciones nativas americanas contemporáneas tienen cinco haplogrupos diferentes del mtDNA (A, B, C, D, y X) y dos haplogrupos del cromosoma Y (C y Q), todos ellos se han encontrado en las poblaciones indígenas del sur de Siberia, apoyando un origen asiático (Schurr et al. 1990) y son considerados linajes fundadores. Aunque algunos de los estudios iniciales con este tipo de datos eran compatibles con la hipótesis de múltiples migraciones (Horai et al. 1993; Torroni et al. 1992), esta visión fue retada por investigaciones posteriores que utilizaron más individuos y diferentes abordajes estadísticos (Bonatto and Salzano 1997a; Bonatto and Salzano 1997b; Merriwether et al. 1995; Stone and Stoneking 1998). Posteriormente, estudios recientes analizando genomas completos del mtDNA confirmaron la presencia de sub-haplogrupos autóctonos de los nativos americanos A2, B2, C1, D1, y X2a, así como sus linajes derivados (ej., C1b, C1c, y C1d), reflejando la acumulación de varias mutaciones específicas en estas poblaciones (Fagundes et al. 2008b; Tamm et al. 2007).



Figura 5. Distribución de las tres familias lingüísticas en el continente americano propuestas por Greenberg. Tomada de (Mulligan et al. 2004).

Los estudios sobre la variación del cromosoma Y, mostraron la presencia de un linaje, ahora reconocido como haplogrupo Q, que se encuentra en la mayoría de individuos indígenas del Norte, Centro, y Sudamérica (Pena et al. 1995; Santos et al. 1996; Underhill et al. 1996). Su linaje asiático ancestral se localizó en el sur-centro de Siberia (Bortolini et al. 2002; Bortolini et al. 2003; Karafet et al. 1999; Santos et al. 1999). El Haplogrupo Q fue dividido posteriormente en los sub-haplogrupos Q3 y Q*; el último es considerado un cromosoma autóctono americano. Como el haplogrupo Q3 se encuentra en la mayoría de los cromosomas Y de los nativos de América (>80%), incluyendo tribus de todos los grupos lingüísticos y culturales, este resultado es explicado por un efecto fundador durante el poblamiento inicial, así como el de un origen común para todos los nativos americanos, incluyendo a los amerindios, los na-dene, y los eskimal-aleutianos (Tarazona-Santos and Santos 2002; Zegura et al. 2004). Estas observaciones están de acuerdo con los resultados recientes provenientes del mtDNA.

De acuerdo a los análisis llevados a cabo acerca de la diversidad del microsatélite-Y (Bortolini et al. 2003; Zegura et al. 2004), de los Y-SNPs (polimorfismos de un solo nucleótido) y de las simulaciones de coalescencia (Hammer and Zegura, 2002), el rango de tiempo resultante para la primera entrada, se ha estimado entre 14,000 y 18,000 años AP (pero con grandes intervalos de confianza). Estos estimados, son similares a los obtenidos de los datos del mtDNA presentados anteriormente.

Recientemente, un alelo (9AR) del locus del microsatélite autosómico D9S1120 se encontró a altas frecuencias en todas las poblaciones Nativas Americanas, incluyendo a los na-dene y a los eskimales-aleutianos, y en grupos beringianos relacionados del

oeste, y está ausente en otras 49 poblaciones del mundo (Schroeder et al. 2007; Wang et al. 2007). Esta distribución es más consistente con la hipótesis de que todos los Nativos Americanos provienen de una población fundadora en común (Schroeder et al. 2007). El análisis del mtDNA, también ha mostrado ser consistente con la teoría de una sola migración hacia América (Merriwether et al. 1995) con una re expansión poblacional (Bonatto and Salzano 1997b; Forster et al. 1996). Además, estudios sobre el cromosoma Y humano, han mostrado una homogeneidad genética y un efecto fundador pronunciado en la colonización de Amerindios de Centro y Sudamérica (Pena et al. 1995; Santos et al. 1996).

Fuera de Beringia: El modelo de incubación Beringiana o de tres etapas

En base a los datos genéticos más recientes de secuencias de alta resolución, tanto del mtDNA como del cromosoma Y, integrados junto a los datos arqueológicos, geológicos y paleontológicos, se ha propuesto el siguiente modelo, conocido como el Modelo de Incubación Beringiana (BIM, por las siglas en inglés) o de tres etapas, para el poblamiento del continente americano (Figura 6) (Bonatto and Salzano 1997b; Fagundes et al. 2008b; Kitchen et al. 2008; Tamm et al. 2007):

Se postula que en la etapa inicial del proceso de colonización se llevó acabo la divergencia de los ancestros de los nativos americanos de la fuente genética del Este/Central de Asia, probablemente acontecida antes de $\approx 50,000$ años. A esta divergencia le siguió un periodo de crecimiento gradual, durante el cuál, la población de los proto-americanos sufrió un incremento de ≈ 7 veces en ≈ 7000 años, en el periodo comprendido entre $\approx 43-36,000$ años. La población fundadora emigrante probablemente fue un pequeño subgrupo, como es evidente por los bajos niveles de

variación de las poblaciones del Nuevo Mundo con respecto a las poblaciones asiáticas (Figura 6) (Kitchen et al. 2008; Tamm et al. 2007).

En la segunda etapa, se propone que la población se estableció en Beringia, la gran región comprendida entre Siberia y Alaska (la mayoría de la cuál, ahora se encuentra sumergida), dando lugar a la generación de nuevas mutaciones (en un tiempo de $\approx 15-20,000$ años) (Figura 6). La existencia de variantes específicas del Nuevo Mundo que están distribuidas a través de América indica que una diversificación genética ocurrió durante la ocupación beringiana (Malhi et al. 2002; Tamm et al. 2007; Torroni et al. 1993; Torroni et al. 1992). Este periodo de ocupación beringiana, en el que hubo poco cambio en el tamaño de la población, abarco de $\approx 36-16,000$ años, y coincide con la evidencia arqueológica de la primera habitación Ártica del oeste de Beringia ($\approx 30,000$ años) (Pitulko et al. 2004). Este periodo también coincide con la evidencia geológica, que indica una restricción de la ruta acceso hacia América del Norte debido a la impenetrabilidad del casquete glaciar Laurentiano ($\approx 17-30,000$ años) (Hoffecker and Elias 2003). Algunos restos botánicos, como microfósiles y polen antiguo indican que Beringia fue un ecosistema de pradera productiva más que un ambiente Ártico desértico (Zazula et al. 2003) (ver más arriba).

La etapa final de colonización consistió en una rápida expansión geográfica hacia el Nuevo Mundo dando como resultado un incremento significativo de la población (≈ 16 veces) en un periodo de $\approx 15,000$ años (Figura 6). Así después de estacionarse por largo tiempo en Beringia, la migración inicial que se dio de Norte a Sur fue probablemente un proceso rápido, y no una difusión gradual; los haplotipos fundadores están uniformemente distribuidos a través de Norte y Sudamérica en vez de presentar una estructura anidada de Norte a Sur. Este escenario se correlaciona

con el patrón de distribución de los primeros sitios arqueológicos en el Noroeste de Asia y América (Pitulko et al. 2004). El registro geológico indica que América del Norte pudo ser accesible desde Beringia entre $\approx 17-14,000$ años AP, cuando el casquete glaciar que cubría lo que hoy es Canadá comenzaba a retraerse (Hoffecker and Elias 2003). La entrada de la población fundadora hacia el Nuevo Mundo pudo haberse llevado a cabo, ya sea por la ruta terrestre a través del “corredor libre de hielo” ubicado en Norteamérica o por la ruta costera, a lo largo de la costa del Pacífico en el noreste de América del Norte, las cuáles eran viables en esos tiempos. Este periodo, también coincide con la inundación inicial del puente terrestre de Bering, después de la cuál, las migraciones con Asia pudieron haber estado muy limitadas. (Bonatto and Salzano 1997b; Kitchen et al. 2008; Tamm et al. 2007).

En resumen, los fundadores del continente americano surgieron de una sola población ancestral, que evolucionó en aislamiento, probablemente en Beringia quizás hasta por $\approx 15,000$ años. Este tiempo permitió la acumulación de mutaciones específicas que separaron a los linajes del Nuevo mundo de sus clados hermanos asiáticos. Después de este aislamiento, los fundadores iniciales de América comenzaron a poblar rápidamente el Nuevo Mundo desde el Norte hacia Sudamérica (Bonatto and Salzano 1997a; Bonatto and Salzano 1997b; Kitchen et al. 2008; Tamm et al. 2007).

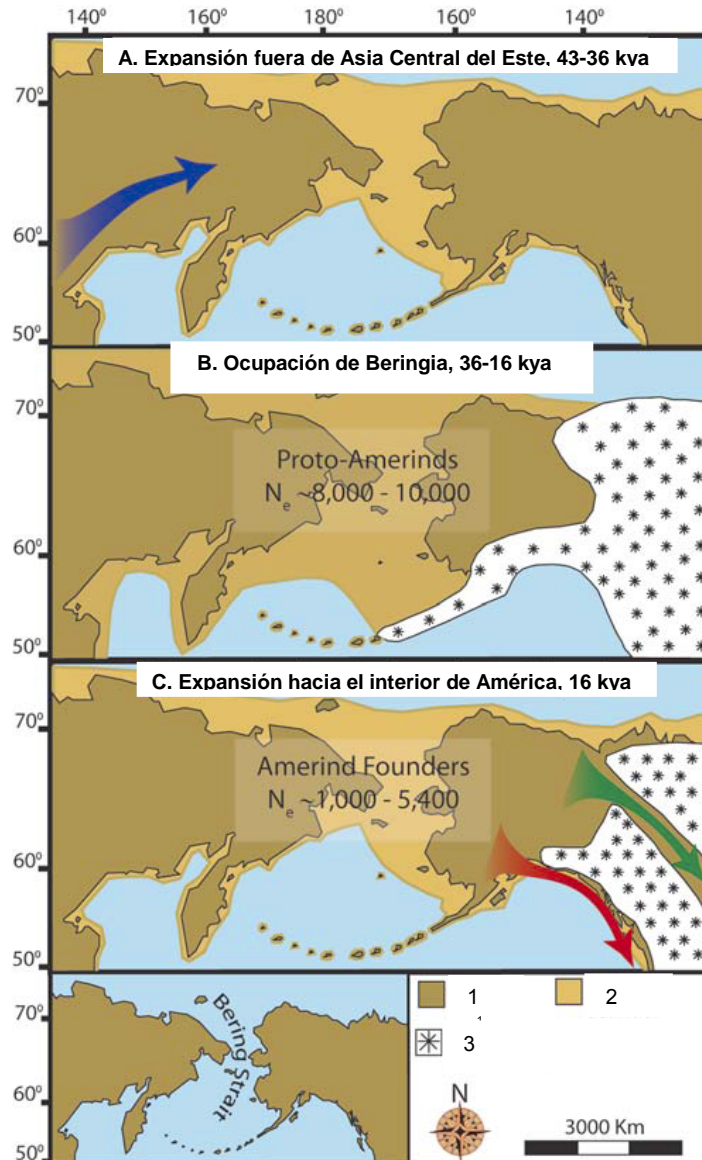


Figura 6. El modelo de Incubación en Beringia o de tres etapas para el poblamiento de América. (A) Divergencia. Expansión gradual de los ancestros de los nativos americanos desde su pool genético asiático (flecha azul). (B) Ocupación de Beringia por los Proto-Americanos sin gran crecimiento poblacional por $\approx 20,000$ años con la aparición de nuevas mutaciones. (C) Colonización rápida del Nuevo Mundo por un grupo fundador a través del “corredor libre de hielo” (flecha verde) y/o por la ruta costera del Pacífico (flecha roja). 1, Tierra actual; 2, fondo marino expuesto; 3, casquete glaciar después de 36 kya. Tomada de (Kitchen et al. 2008).

Escenarios de migración alternativos

Aunque el modelo tradicional de la colonización del Nuevo Mundo menciona una única y rápida migración a través del puente terrestre de Beringia (con todos los haplotipos fundadores), se han propuesto escenarios alternativos de poblamiento. En ese sentido, Schurr y Sherry (Schurr and Sherry 2004) propusieron una migración por la costa del Pacífico desde Siberia a Sudamérica (con los haplogrupos A, B, C, y D) aproximadamente 20-15 kya, seguida por una segunda migración (con el haplogrupo X) hacia Norteamérica una vez que el “corredor libre de hielo” apareció. Este modelo es congruente con el modelo reciente de una migración dual de Perego y colaboradores (Perego et al. 2009), basado sobre la distribución geográfica de dos linajes mtDNA raros. El haplogrupo D4h3 está distribuido solamente a lo largo de las regiones costeras de Norte y Sudamérica, mientras que el haplogrupo X2a está restringido al noroeste de Norteamérica. Perego y colaboradores interpretaron esta distribución como indicativa de dos migraciones hacia América del Norte: una migración por la ruta costera y otra migración separada pero contemporánea, a través del “corredor libre de hielo”.

En contraste, Fagundes y colaboradores (Fagundes et al. 2008b) concluyen que los ancestros de los nativos americanos colonizaron el noroeste de Asia, incluyendo Beringia, antes del Último Máximo Glacial (UMG). Durante el UMG, esta población sufrió una significativa reducción, pero se expandieron otra vez entre 19,000 y 15,000 años AP, dando como resultado en la colonización del continente americano vía por una ruta costera (Fagundes et al. 2008b). Este escenario de colonización es consistente con el registro arqueológico en Siberia, el cuál indica un abandono del noroeste de Siberia en el comienzo del último ciclo glacial, y su recolonización por

una expansión poblacional enseguida del UMG. En un re-análisis de los datos de Kitchen et al (Kitchen et al. 2008) Mulligan y colaboradores (Mulligan et al. 2008) concluyen que los ancestros de los americanos se dispersaron hacia el sur alrededor 16,000 años AP después de la divergencia de el pool genético de Asia central y una pausa de 7,000-15,000 años AP, presumiblemente dentro de Beringia, durante el cuál, se acumuló la variación genética. Tanto el escenario de una sola como el de dos migraciones se han visto favorecidos alternativamente en el análisis de los datos de la distribución y coalescencia de los linajes del cromosoma Y en América y Siberia. A partir de datos del cromosoma Y, se ha posicionado a una población polimórfica en la región de la Montaña Altai de Siberia, como el punto de inicio de una única migración post-UGM entre 17,200 y 10,100 años AP (Zegura et al. 2004). Un modelo de un solo origen de la misma región ya había sido propuesto anteriormente de los datos del mtDNA (Kolman et al. 1996; Merriwether et al. 1995). Sin embargo, es importante señalar, que es difícil inferir el número de migraciones solo a partir de los datos genéticos. Por una parte, pudieron haber ocurrido migraciones que no influyeron significativamente la distribución actual de la diversidad genética, y por otra parte, distintas migraciones de la misma población de origen pueden producir patrones de variación similares a las producidas por una sola migración (Schroeder et al. 2007).

Flujo genético post-glacial

Adicionalmente, los datos genéticos sugieren algún nivel de flujo hacia atrás, de Beringia al oeste de Siberia y/o migraciones más recientes (pero constantes) a través de las áreas circun-Árticas. Por ejemplo, los linajes nativos americanos del mtDNA, cromosoma Y, así como del alelo autosómico 9AR, se encuentran en bajas

frecuencias en las poblaciones asiáticas, especialmente en el noroeste de Siberia (Bortolini et al. 2002; Bortolini et al. 2003; Scurr 2004; Schroeder et al. 2007; Tamm et al. 2007; Tarazona-Santos and Santos 2002; Wang et al. 2007).

En resumen, los análisis genéticos recientes tienden a converger en un único, aunque complejo escenario para el origen de los nativos americanos, indicando tiempos pre-Clovis para el primer poblamiento y un papel crucial de Beringia durante las fases tempranas de ocupación.

Cambios de la estructura genética en las poblaciones nativas americanas después del contacto Europeo

La llegada de los europeos al Nuevo Mundo provocó cambios significativos en las poblaciones nativas americanas. Por un lado, las guerras y las epidemias eliminaron a una gran cantidad de individuos, provocando un descenso demográfico, que probablemente condujo a una reducción en la diversidad genética de estas poblaciones (Crawford 1998). Al incrementarse las interacciones con las personas de descendientes europeos, así como con la introducción de esclavos africanos durante los siglos dieciséis hasta el diecinueve, se generaron muchas poblaciones mestizas en diferentes partes del continente americano. Como una consecuencia de estos eventos, el pool genético americano ha sido remodelado sustancialmente en los últimos 500 años (Crawford 1998).

Tabla 1. Principios básicos del Sistema ABO. Relación entre antígenos y anticuerpos

Grupo Sanguíneo	Genotipo	Antígenos	Anticuerpos
A	AA, AO	A	anti-B
B	BB, BO	B	anti-A
O	OO	H	anti-A, anti-B, anti-A,B
AB	AB	A y B	Ninguno

Los grupos sanguíneos ABO

El sistema de los grupos sanguíneos ABO, fue descubierto en 1900 por Landsteiner y fueron los primeros polimorfismos humanos en ser reconocidos (Landsteiner 1901); y aunque en la actualidad constituye el sistema sanguíneo más importante en las prácticas de transfusión y de transplantes, los grupos sanguíneos ABO se usaron inicialmente para propósitos antropológicos, encontrándose amplias variaciones entre individuos de diferente origen étnico (Hirszfeld L and Hirszfeld H 1919).

El sistema ABO, está basado en la presencia o ausencia de los antígenos de los grupos sanguíneos A y B, y que dan lugar a cuatro fenotipos, A, B, AB, y O (Tabla 1). Las correspondientes estructuras de carbohidratos de los grupos sanguíneos, designados ABH, se encuentran presentes en las cadenas terminales de oligosacáridos de las glicoproteínas y los glicolípidos que se localizan en la superficie de los eritrocitos y de las células endoteliales y epiteliales (Clausen and Hakomori 1989; Watkins 1980). El monosacárido que determina la especificidad del grupo sanguíneo A, es una N-acetilgalactosamina (GalNAc) terminal, con uniones α -1,3; mientras el correspondiente monosacárido que da la especificidad del grupo sanguíneo B es una galactosa (Gal) terminal, con uniones α -1,3. Las células del grupo O, carecen de ambos monosacáridos en la parte terminal de sus cadenas de oligosacáridos, y en su lugar tienen una fucosa (Fuc) con enlaces α -1,2 y se le designa como antígeno H (Watkins 1980). El plasma de los individuos del grupo sanguíneo A, contiene anticuerpos contra el antígeno B que ocurren naturalmente; por el contrario, los individuos del grupo sanguíneo B, contienen anticuerpos contra el antígeno A; mientras que el plasma del grupo sanguíneo AB, no contiene ninguno de

estos anticuerpos, y el plasma del grupo sanguíneo O, tiene ambos tipos de anticuerpos (Tabla 1). Los individuos con anticuerpos anti-A o anti-B, no pueden recibir una transfusión de sangre que contenga el correspondiente antígeno incompatible (Storry and Olsson 2009).

Las bases moleculares de los alelos ABO

Las bases moleculares de los grupos sanguíneos han sido bien establecidas (Yamamoto et al. 1990). El locus *ABO* se localiza en la parte terminal del brazo largo del cromosoma 9; su región codificadora abarca cerca de 19.5 kb, consiste de siete exones, con un rango de tamaño de 28 a 688 pb; una secuencia de 1062 pb codifica para 354 aminoácidos que corresponden a una proteína de 41 kDa. El gene *ABO* contiene seis intrones con tamaños en un rango de 554 a 12982 pb. Los exones 6 y 7, que son los más grandes, codifican para el 77% del total de la región codificadora y probablemente el dominio completo responsable para la actividad catalítica (Figura 7).

Este locus contiene tres alelos principales: A, B y O. Los alelos A y B codifican las glicosil-transferasas que adicionan, ya sea *N*- acetil-galactosamina o galactosa respectivamente. Ambos alelos, difieren uno de otro en 7 posiciones nucleotídicas, dando como resultado, 4 sustituciones de aminoácidos en las correspondientes glicosil-transferasas (Tabla 2). Por otra parte, se han descrito varios alelos O, que codifican enzimas inactivas –usualmente truncadas-. Los alelos O¹ (O01) y O^{1v} (O02) son los dos alelos más frecuentes en todas las poblaciones. Estos alelos difieren en los exones 6 y 7 en 9 sustituciones nucleotídicas y tienen una delección puntual en el exón 6 (G261-) (Tabla 2) (Chester and Olsson 2001). Esta delección, induce un corrimiento en el marco de lectura, produciendo un codón de paro prematuro

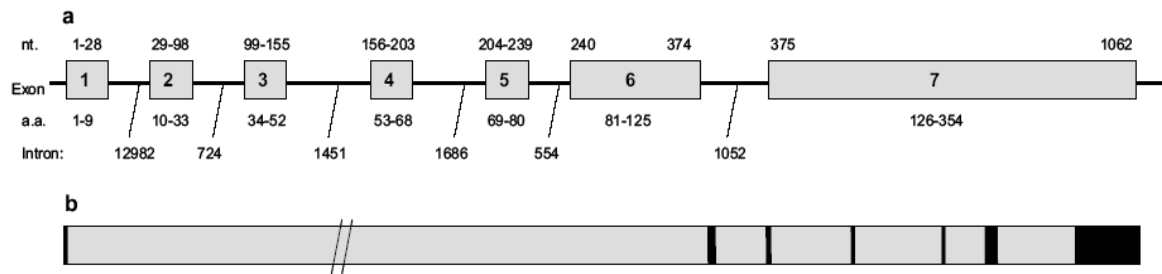


Figura 7. Organización del locus *ABO*. Los siete exones y seis intrones no están dibujados a escala. Los números arriba de las cajas representan el primer y último nucleótido de la región codificadora en cada exón, mientras que los números debajo de las cajas muestran los correspondientes números de aminoácidos (a). El tamaño de cada intrón es indicado con una línea oblicua (a). El gene *ABO* dibujado a escala; los exones en negros y los intrones en gris (b).

(nucleótidos 352-354), dando como resultado, una proteína truncada (117 amino ácidos) que no tiene actividad enzimática. Se han descrito otras variantes de los alelos O^1 y O^{1v} que se distinguen por unas pocas mutaciones puntuales (Olsson and Chester 1996a; Yamamoto et al. 1993). Adicionalmente, se han descrito alelos O raros, que no contienen la delección G261, los cuales incluyen a un alelo O con una mutación silenciosa (O_2 o O_{03}) observado únicamente en europeos y a baja frecuencia en africanos del sub-Sahara (Grunnet et al. 1994; Yamamoto et al. 1993; Yip 2000) y los alelos O_3 (o O_{08}), O_4 , y O_5 que también contienen mutaciones inactivantes (Chester and Olsson 2001; Yamamoto et al. 1990).

Posibles causas para la alta frecuencia del grupo sanguíneo O en los Nativos Americanos

Aunque los polimorfismos de los grupos sanguíneos ABO están distribuidos a nivel mundial, existen importantes variaciones en sus frecuencias entre las diferentes poblaciones. Resulta interesante, que el alelo O, aunque no es funcional, es el más abundante, con un rango que va del 61 al 98%. La distribución geográfica de los alelos ABO es muy diferente en América con respecto a otras partes del mundo. En Norteamérica, las poblaciones na-dene tienen grupos sanguíneos A y O, mientras que las poblaciones eskimales tienen grupos sanguíneos A, B y O con frecuencias similares al resto de las poblaciones del mundo (Cavalli-Sforza et al. 1994). En contraste, estudios fenotípicos de los grupos sanguíneos ABO han revelado que las poblaciones Amerindias contienen casi exclusivamente al grupo O (Figura 8) (Lisker 1981; Mourant et al. 1976).

Se han propuesto tres hipótesis para explicar la alta frecuencia del grupo sanguíneo O. La primera de ellas, propone que un efecto fundador ocurrió durante la colonización inicial de América. Datos del DNA mitocondrial (mtDNA), cromosoma Y, y marcadores autosómicos, sugieren que los nativos americanos contemporáneos, son descendientes de una sola población fundadora que migró al continente americano desde Beringia (Fagundes et al. 2008b; Merriwether et al. 1995; Schroeder et al. 2007; Tamm et al. 2007; Wang et al. 2007; Zegura et al. 2004). Se cree que un número relativamente pequeño de fundadores dieron lugar a todas las poblaciones nativas americanas. Solamente unos pocos haplotipos fundadores del mtDNA, cromosoma Y han sido identificados (Achilli et al. 2008; Malhi et al. 2002; Schurr and Sherry 2004; Tamm et al. 2007; Zegura et al. 2004), y todas las poblaciones que han sido genotipificadas para el locus autosómico D9S1120 comparten un alelo único en ese locus (Schroeder et al. 2007; Wang et al. 2007), los nativos americanos también muestran una diversidad genética más baja que las poblaciones de otras regiones continentales (Wang et al. 2007). Debido a que las poblaciones siberianas tienen una mayor diversidad que las nativas americanas (Mourant et al., 1976), es posible que la baja diversidad en América parte de un efecto fundador.

La segunda hipótesis, plantea que la alta frecuencia del tipo sanguíneo O en los nativos americanos actuales, puede ser el resultado de la selección en respuesta a las epidemias provocadas por el contacto europeo. Algunos patógenos tienen moléculas que se parecen a los antígenos ABO (ej. mimetismo molecular), que dificulta que el sistema inmune los detecte y los destruya (Berger et al. 1989; Henry 2001; Mourant 1985; Seymour et al. 2004). Por lo tanto, algunos Individuos con ciertos tipos sanguíneos ABO pueden ser susceptibles a ciertas enfermedades

Tabla 2. Polimorfismos moleculares de los alelos ABO

Exón	3		4		5		6		7									
Nucleótido	106	188	189	220	261	297	526	646	657	681	703	771	796	802	803	829	930	1096
A ¹	G	G	C	C	G	A	C	T	C	G	G	C	C	G	G	G	G	G
B						G	G		T		A		A		C		A	A
O ¹					-													
O ^{1v}	T	A	T	T	-	G		A		A		T				A		
O ²						G	G							A				A

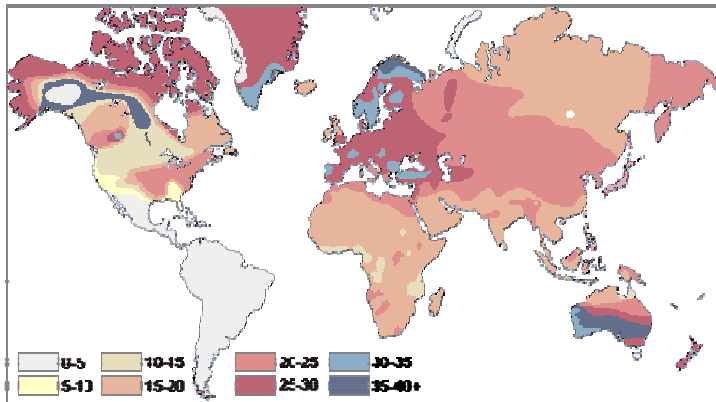
Diferencias en la secuencia de bases entre los principales exones de los alelos A¹, B, O^{1v} y O². La secuencia del alelo A¹ se presenta como referencia; los guiones denotan delección. Tomada de (Yip 2000).

(Berger et al. 1989; Marionneau et al. 2001; Seymour et al. 2004). Por ejemplo, el tipo sanguíneo A puede ser más susceptible a la viruela, porque una sustancia que se parece al antígeno A está presente en el virus *Variola* (Muschel 1966). Los individuos con el tipo sanguíneo A, tienen una mayor tasa de infección, una mayor severidad de la enfermedad y un incremento en la mortalidad de la viruela (Muschel 1966) por lo que la repetida y amplia dispersión de la epidemia de la viruela de los siglos XVI-XIX, pueden haber seleccionado en contra a los Nativos Americanos con alelos A y un incremento de la frecuencia de alelos O y B en la población sobreviviente. Una atención especial se ha puesto sobre las enfermedades infecciosas debido a la amplia expresión de los antígenos A y B por varios agentes infecciosos y también porque varios agentes infecciosos usan a las sustancias A y B como receptores. Los polimorfismos ABO pueden prevenir que las especies sean puestas en peligro por algún patógeno que usa carbohidratos como receptor. Por otra parte, el polimorfismo ABO provoca que haya una producción polimórfica de anticuerpos naturales anti-A y anti-B, que potencialmente protegen a los individuos de los diversos agentes infecciosos que expresan motivos A y B. De estas observaciones, se puede concluir, que el alelo O silencioso, aunque es un alelo nulo, puede tener un valor selectivo, porque en estado homocigoto, producen anticuerpos naturales anti-A y anti-B. Además, los individuos homocigotos son potencialmente protegidos de agentes que usan a las sustancias A y B como receptores, pero son más susceptibles a *Helicobacter pylori* (Boren et al. 1993) y son particularmente sensibles a formas severas de malaria (Fry et al. 2008), porque el fenotipo O reduce la forma de roseta de los glóbulos rojos, que es un factor de virulencia (Rowe et al.

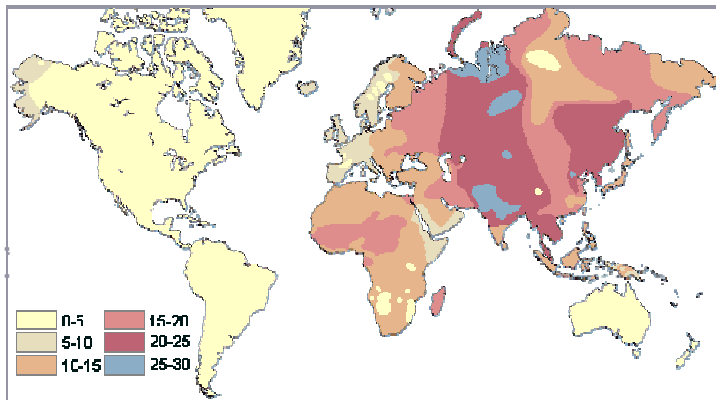
2007). Otros ejemplos de agentes potencialmente selectivos son *Campylobacter jejuni* (Ruiz-Palacios et al. 2003) y el virus Norwalk (Marionneau et al. 2001).

Finalmente, la tercera hipótesis, propone que la alta frecuencia del tipo sanguíneo O, puede reflejar un cuello de botella asociado con el contacto europeo. Evidencias tanto arqueológicas como históricas muestran que el contacto europeo y el colonialismo dieron lugar a una reducción significativa en el tamaño de la población (Livi-Bacci 2006). Se estima que entre el 50% y el 90% de la población total se perdió en este tiempo como resultado de la guerra, la esclavitud, y las epidemias causadas por las enfermedades europeas (Livi-Bacci 2006). Dado que el despoblamiento puede causar un cuello de botella genético y reducir la diversidad genética (Hoelzel 1999; Nei M et al. 1975), es probable que estos eventos históricos hayan influido sobre el patrón de diversidad de América. En estudios anteriores, que incluyen los realizados por Bolnick y Smith, sobre el análisis de la variación del mtDNA en el sureste de Norteamérica (Bolnick and Smith 2003) y los de Wang y colaboradores, sobre el análisis de 175 marcadores genéticos-globales en el Choctaw de Oklahoma, se ha encontrado evidencia de un cuello de botella inducido por los europeos (Wang et al. 2004). En el estudio de Salzano y Callegari-Jacques con 421 loci nucleares, se encontró que la historia poblacional reciente ha influido sobre la variabilidad genética de los nativos americanos (Salzano and Callegari-Jacques 2006). Sin embargo, también hay un estudio reciente, que reporta, que los eventos posteriores al contacto europeo no alteraron el patrón de diversidad de las poblaciones indígenas que existían, con respecto a el patrón de las poblaciones indígenas contemporáneas (Halverson and Bolnick 2008).

Grupo A



Grupo B



Grupo O

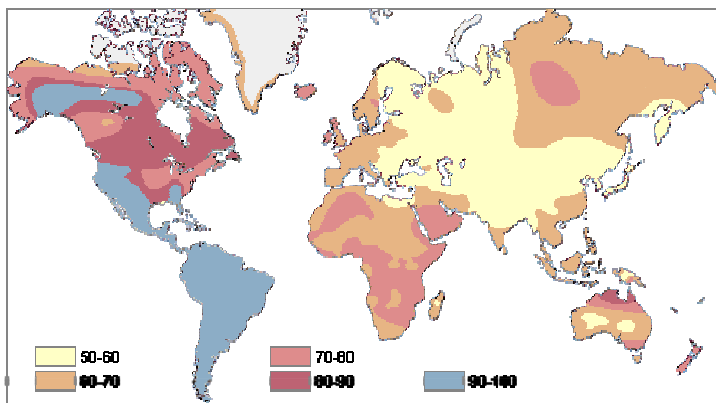


Figura 8. Mapas de la distribución de los grupos sanguíneos A, B y O en las poblaciones indígenas del mundo. Tomados de http://anthro.palomar.edu/vary/vary_3.htm

Hipótesis:

-Sí todas las poblaciones nativas de Meso América y Sudamérica comparten el mismo tipo de alelos O, implica que todas ellas surgieron de una misma población ancestral.

-Sí hay algún alelo O en la mayoría de los nativos americanos que tenga mutaciones que no se encuentran en las poblaciones asiáticas y en las demás poblaciones del mundo, entonces estas mutaciones surgieron en los nativos americanos.

Objetivos

1) Caracterizar la diversidad y distribución de los polimorfismos moleculares de los alelos O entre diferentes grupos nativos de Meso América.

2) Comparar la diversidad de los haplotipos O y la estructura genética de las poblaciones nativas de Meso América y de Sudamérica.

3) Sobre las bases de este análisis global, discutir los posibles eventos involucrados que condujeron a la diversidad actual de los alelos O en América.

MATERIAL Y METODOS

Nomenclatura de los alelos O

Los alelos del grupo sanguíneo O, fueron nombrados de acuerdo a la nomenclatura no oficial de acuerdo a Olsson y Chester (Olsson and Chester 1996b) seguido entre paréntesis (sí es el caso) de nombres alternativos de otros autores (Roubinet et al. 2004).

En general, no se utilizó el término “Amerindias” para describir a las poblaciones indígenas de Meso América y Sudamérica, debido a que la mayoría de los lingüistas no aceptan la validez de este grupo (ver introducción). En su lugar se usó el término “nativas americanas”. Por otra parte, se consideró como individuo mestizo, al individuo que nació en México, que tiene un apellido de origen español y que tiene ancestros de origen mexicanos tres generaciones hacia atrás (Gorodezky et al. 2001).

Colecta de muestras y serología de los grupos sanguíneos ABO

Las muestras sanguíneas se colectaron en tubos con EDTA de 180 individuos mesoamericanos de fenotipo O, incluyendo 37 Nahuas de Guerrero, 50 Mazahuas del Estado de México, 50 Mayas de Yucatán, y 43 mestizos de la ciudad de México (Figura 9 y Tabla 3). El tipo sanguíneo ABO fue confirmado por métodos serológicos mediante anticuerpos anti-A, anti-B, y anti-AB, de acuerdo a las instrucciones del productor (Immucor Gamma). Individuos mestizos mexicanos con fenotipo A se usaron como controles.

Este estudio, siguió los lineamientos sobre la investigación científica con humanos sin riesgo evidente, señalados en el Código Ético para el personal académico del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM (Hudson R et al. 2007) y fue autorizado por el Comité de Bioética de este Instituto. Todos los individuos participaron voluntariamente. A todos los sujetos se les informó de manera accesible acerca de los posibles riesgos y beneficios personales, así como de la relevancia científica de la investigación. Después de haber comprendido la información, y si decidieron participar, firmaron la carta de Consentimiento informado, dónde se explica en lenguaje sencillo y accesible la información sobre el proyecto y su participación. Posteriormente, se realizó la colección de la muestra de sangre.

Para llevar a cabo un análisis comparativo de la diversidad genética y estructura poblacional, se usaron datos reportados para los alelos O, de 301 individuos sudamericanos de 9 poblaciones (ver Figura 9 y Tabla 3).

Para el análisis de las secuencias de DNA, se construyó una base de datos, con las secuencias de los exones 6 y 7 del alelo O de Cayapas de Ecuador (35 individuos) y Aymaras de Bolivia (63 individuos) reportados previamente (Roubinet et al. 2001).

Para los análisis comparativos adicionales, se compilaron las frecuencias de los alelos O^1 , O^{1v} , and $O^{1v(G542A)}$ obtenidas en ensayos de RFLP-PCR de los siguientes grupos: Arara (n = 15), Kayapo (n = 16), y Yanomama (n = 17) de la región amazónica de Brasil (un total de 48 individuos) (Chester and Olsson 2001); 62 indígenas Parakana (de la tribu Yupi) de Brasil (Barjas-Castro et al. 2003), y sujetos chilenos de las poblaciones Aymara (n = 84), Huilliche (n = 75), y mestiza de Santiago (n = 82) (Llop et al. 2006) (ver figura 9). Adicionalmente, para algunos análisis, se

incluyeron sujetos de poblaciones asiáticas de Japón (n = 278), China (n = 80), y de Korea (n = 141) (Chester and Olsson 2001), tal como se indica en el texto (Tabla 3).

Preparación del DNA, amplificación y secuenciación de los exones 6 y 7

El DNA genómico, se obtuvo a partir de leucocitos de sangre periférica con proteinasa K (Roche Diagnostics, Meylan, France), seguido de una extracción con fenol-cloroformo.

Las amplificaciones por PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 50 μ l que contenía: 50 mM de $MgCl_2$ (1.5 μ l); 2 mM de dNTPs (5 μ l) 2 U de Taq Polimerasa (Applied Biosystems, Foster City, CA); 200-300 ng de DNA genómico, y 1 μ M de concentración final de cada iniciador. Los pares de iniciadores ABO-1/2 y 23/8 se emplearon para amplificar respectivamente los exones 6 and 7, de acuerdo a Ogasawara y colaboradores (Ogasawara et al. 1996).

Se amplificaron fragmentos de 187-pb del exón 6 y de 737-pb del exón 7. Los amplicones se analizaron en geles de agarosa al 2.0% y posteriormente se purificaron de acuerdo a las instrucciones del proveedor (QIAGEN Qiaquick gel extraction kit). Los productos amplificados se secuenciaron directamente con el kit de secuenciación Big Dye Terminator cycle utilizando el analizador ABI Prism 310, de acuerdo a las condiciones del proveedor (Applied Biosystems).

La secuenciación directa de los productos amplificados, produjo secuencias de los exones 6 y 7 de 180 individuos con fenotipo O. Las mutaciones fueron confirmadas por secuenciación de ambas cadenas de DNA.

Tabla 3. Datos de las poblaciones estudiadas en el presente trabajo

Población	País	<i>n</i>	<i>N</i>	Tipo de datos	referencia
Meso América					
Nahua	México	37	74	Secuencia de DNA	Este estudio
Mazahua	“	50	100	“	“
Maya	“	50	100	“	“
Mestiza	“	43	86	“	“
Sudamérica					
Cayapa	Ecuador	35	70	Secuencia de DNA	Roubinet et al., 2001
Aymara	Bolivia	63	126	“	“
Arara	Brasil	15	30	RFLP-PCR	Olsson et al., 1998
Kayapo	“	16	32	“	“
Yanomama	“	17	34	“	“
Parakana	“	62	124	“	Barjas-Castro et al., 2003
Aymara	Chile	84	168	“	Llop et al., 2006
Huilliche	“	75	150	“	“
Mestiza	“	82	164	“	“
Asia					
Japón	-	278	556	RFLP-PCR	Chester and Olsson, 2001
China	-	80	160	“	“
Korea	-	141	282	“	“
Total		1128	2256		

n, número de individuos; *N*, número de cromosomas.



Figura 9. Localización geográfica de las poblaciones mesoamericanas estudiadas y de las poblaciones sudamericanas usadas para comparación.

La caracterización de diferentes alelos se confirmó mediante RFLP-PCR con las enzimas de restricción Mbol (646 nt), Ddel (771 nt), y Nhel (542 nt) (Olsson et al. 1998).

Análisis de las secuencias de DNA

Después de editar las secuencias de los exones 6 y 7, se construyó una base de datos de secuencias con 826 bases de longitud. Debido a la diferente tasa de sustitución entre las transiciones y transversiones del alelo O, los datos de las secuencias, se analizaron utilizando las distancias corregidas para múltiples *hits* con el modelo de 2 parámetros de Kimura (Kimura 1980). Con esta distancia, se estimó la diversidad nucleotídica *dentro* (π_i) y *entre* (π_{ij}) poblaciones. Se realizaron “pruebas exactas” para evaluar la diferenciación por parejas “pairwise” de las poblaciones (Rousset and Raymond 1995).

La gráfica de Escalamiento multidimensional (MDS) se generó a partir de una matriz π_{ij} con el software SPSS versión 10.0 para Windows.

El Análisis jerárquico de la Varianza Molecular (AMOVA) se realizó después de definir los grupos mesoamericanos y sudamericanos. Los componentes de la varianza se emplearon para computar los índices de fijación y su significancia se examinó por medio un abordaje de permutación no-paramétrico (Excoffier et al. 1992). Todos los cálculos se llevaron a cabo usando la prueba AMOVA implementada en el paquete ARLEQUIN 3.11 (Excoffier et al. 2005).

Para evaluar las relaciones entre los haplotipos, un análisis “median joining network” se realizó con el software libre phylogenetic Network (<http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm>) (Bandelt et al. 1999).

Posteriormente, para comparar los datos provenientes del análisis de RFLP-PCR entre los mesoamericanos y los sudamericanos, se calculó la diversidad genética a partir de la heterocigosidad esperada (H_E) bajo el equilibrio de Hardy-Weinberg, la heterocigosidad observada (H_O) y el índice de fijación ($F = (H_E - H_O) / H_E$); Solamente las poblaciones de Nativos Americanos con la distribución de genotipos disponibles fueron incluidas para este propósito. Se usaron Cadenas de Markov para evaluar el equilibrio de Hardy-Weinberg (Guo and Thompson 1992); sí el valor del índice F resultaba positivo, la hipótesis sobre un déficit o exceso de heterocigosidad era examinada para la población en cuestión (Rousset and Raymond 1995).

El Coeficiente de Coancestría de Reynolds, se calculó a partir de las frecuencias poblacionales de los tres alelos O predominantes (O_1 , O_{1v} , and $O_{1^{(G542A)}}$) observadas en las poblaciones Nativas Americanas y Asiáticas con el programa Genetic Data Analysis (GDA) versión 1.1 (Lewis PO and Zaykin D 2001). Se prefirió usar esta distancia genética, porque se supuso que la deriva génica es el principal factor que actúa sobre la diferenciación genética entre poblaciones estrechamente relacionadas o para una evolución a corto plazo (Reynolds et al. 1983; Weir 1996). Se construyó un árbol sin raíz a partir de los coeficientes de coancestría con la metodología "Neighbour-Joining" (NJ) (Saitou and Nei 1987). Para investigar sí el aislamiento por distancia (IBD, por sus siglas en inglés) podría explicar la diferenciación genética entre los grupos de nativos americanos, se examinó la correlación entre las distancias geográficas y genéticas entre estas poblaciones. De esta forma, se evaluó un escenario de efecto fundador en serie, es decir, sí la heterocigosidad disminuía cuando la distancia se incrementaba con respecto al origen geográfico de los ancestros de los nativos americanos (presumiblemente Beringia)

(Ramachandran et al. 2005; Wang et al. 2007). La validez estadística de estas correlaciones se evaluó mediante la prueba de Mantel.

Las distancias en kilómetros entre las poblaciones, se calcularon con el programa *Great Circle Calculador* empleando las coordenadas geográficas (<http://www.gb3pi.org.uk/great.html>). Finalmente, se efectuó la prueba de Tajima D junto con sus valores P para las poblaciones de nativos americanos con los datos de secuencias de los exones 6 y 7.

Resultados

Se obtuvieron las secuencias directas a partir de amplicones de los exones 6 y 7 del gene ABO de los siguientes individuos: 37 Nahuas, 50 Mazahuas, 50 Mayas, y 43 mestizos mexicanos. Todos los individuos que se incluyeron en el presente estudio tienen el grupo sanguíneo O y en todos ellos, se encontró la delección G261 en estado homocigoto; esta delección es característica de los alelos O^1 (O01) y O^{1v} (O02).

Diversidad de secuencias de los haplotipos O encontrados en las poblaciones nativas de Meso América y Sudamérica

En la Tabla 4, se muestra la diversidad de secuencias de los haplotipos encontrados en las poblaciones nativas americanas. Un total de cuatro haplotipos diferentes se encontraron en las poblaciones mesoamericanas (Hp 1-4). Se tomó como referencia las posiciones relevantes de los exones 6 y 7 y cada haplotipo se atribuyó a un alelo O en particular (como O^1 , O^{1v} , y otros) tal como lo definenha Roubinet et al (Roubinet et al. 2004).

Las frecuencias de los haplotipos, representadas por el tamaño de los círculos y los eventos mutacionales que los conectan, se presentan en una red mínima de haplotipos (Figura 10). La mayoría de las secuencias, se agrupan en los tres haplotipos O^1 , O^{1v} , y $O^{1v(G542A)}$ (O11). Además, se encontró un haplotipo raro (O05).

La mutación G542A se encontró exclusivamente asociada con el alelo O^{1v} ; se presentó en estado heterocigoto (GA) en individuos con genotipos O^1/O^{1v} y O^{1v}/O^{1v} en las cuatro poblaciones mexicanas estudiadas; se presentó en estado homocigoto (AA) en individuos con genotipo O^{1v}/O^{1v} en los Nahuas, Mayas y mestizos;

Tabla 4. Variaciones de las secuencias nucleotídicas en los exones 6 y 7 de los haplotipos O observados en las poblaciones Nativas Americanas

Hp	Alelo/posición	E6		E7						
		261	297	498	538	542	646	681	771	829
	A1	G	A	C	C	G	T	G	C	G
1	O1v	-	G	*	*	*	A	A	T	A
2	O1v542	-	G	*	*	A	A	A	T	A
3	O1	-	*	*	*	*	*	*	*	*
4	O05	-	G	*	*	*	*	*	*	*
5	Ov7	-	G	*	*	*	A	*	T	A
6	O32	-	G	*	T	*	A	A	T	A
7	O33	-	G	T	*	*	A	A	T	A

Hp, haplotipo; los cambios de bases, se muestran con referencia a la secuencia del alelo A1.

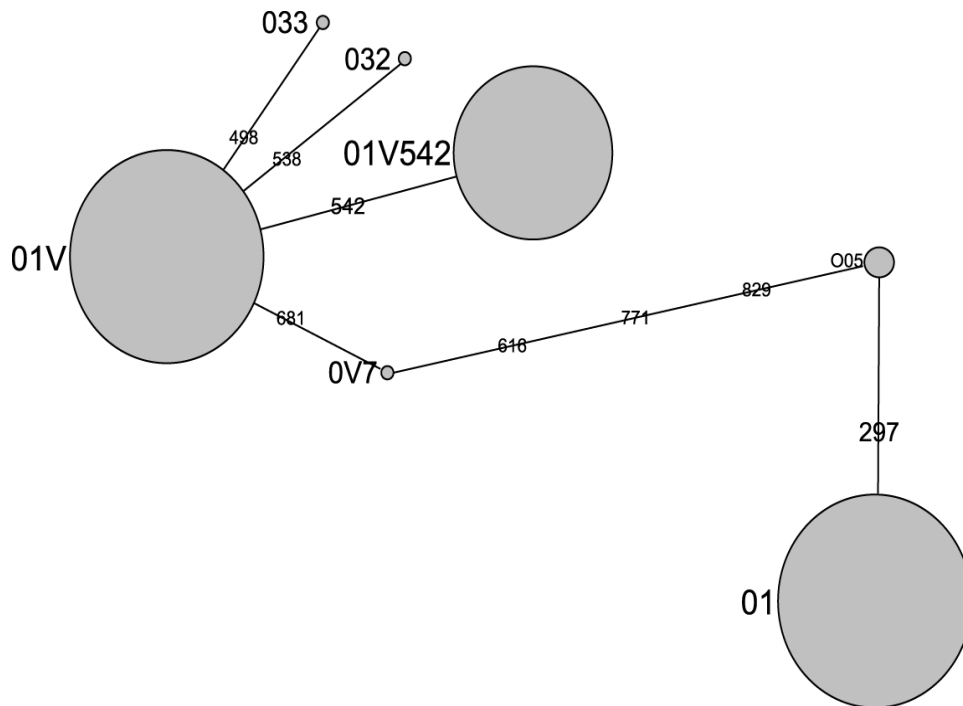


Figura 10. Red mínima de los siete haplotipos O, observados en las poblaciones nativas de Meso América y Sudamérica. Se muestran las conexiones entre los haplotipos, unidos por pasos mutacionales; el tamaño de los círculos esta relacionado con la frecuencia de los haplotipos de las poblaciones estudiadas.

y no se encontró en individuos con genotipo O^1/O^1 , tal como ha sido reportado anteriormente en las poblaciones sudamericanas (Tabla 5).

La Tabla 6 describe las frecuencias haplotípicas, la diversidad de haplotipos y la diversidad nucleotídica para las poblaciones mesoamericanas, en conjunto a las poblaciones de Cayapa y Aymara de Sudamérica, que fueron estudiadas anteriormente. El haplotipo más frecuente que se encontró en estas poblaciones, fue el haplotipo O^{1v} , excepto en los Cayapas de Ecuador, en donde el haplotipo O^1 , fue el haplotipo predominante (51.4 %). Todas las poblaciones nativas americanas estudiadas, tienen el haplotipo $O^{1v(G542A)}$, mientras que la frecuencia del haplotipo $O^{1v(G542A)}$, fue más alto en en las poblaciones de Mesoamérica que en las de Sudamérica. Por otra parte, otros cuatro haplotipos fueron detectados a bajas frecuencias. El haplotipo O05, fue observado en las poblaciones Maya y Cayapa; el haplotipo O^{v7} estuvo presente únicamente en los Cayapas, mientras que los haplotipos O32 y O33 se detectaron en la población Aymara de Bolivia (Figura 10 y Tablas 4 y 6).

La diversidad haplotípica (H) fue mayor en las cuatro poblaciones mesoamericanas ($H > 0.60$) que en las dos poblaciones sudamericanas ($H < 0.60$). Por el contrario, la diversidad nucleotídica *dentro* de las poblaciones (π_i) fue más alta en los Cayapas, seguida por la de las poblaciones de mestizos y Mazahuas; con los valores observados más bajos en los Nahuas y en los Mayas (Tabla 6).

Tabla 5. Correlación de la mutación G542A y el alelo O^{1v}

Genotipo	GG	GA	AA
Nahuas			
O ¹ O ¹	4	0	0
O ¹ O ^{1v}	4	3	0
O ^{1v} O ^{1v}	13	11	2
Mazahuas			
O ¹ O ¹	6	0	0
O ¹ O ^{1v}	16	4	0
O ^{1v} O ^{1v}	9	15	0
Mayas			
O ¹ O ¹	1	0	0
O ¹ O ^{1v}	9	7	0
O ^{1v} O ^{1v}	13	17	2
Mestizos			
O ¹ O ¹	7	0	0
O ¹ O ^{1v}	14	3	0
O ^{1v} O ^{1v}	11	5	3

Los números indican, el número de individuos con la mutación G542A en estado homocigoto (AA) o estado heterocigoto (GA).

Tabla 6. Estimados de la diversidad de secuencias en los alelos O de las poblaciones Nativas Americanas

Haplotipo	Nahua	Mazahua	Maya	Mestizos México	Cayapa	Aymara Bol
O1v	0.554	0.400	0.520	0.477	0.4140	0.595
O1v542	0.243	0.280	0.280	0.163	0.0429	0.119
O1	0.203	0.320	0.180	0.360	0.5140	0.27
O05	0	0	0.020	0	0.0143	0
Ov7	0	0	0	0	0.0143	0
O32	0	0	0	0	0	0.008
O33	0	0	0	0	0	0.008
N	74	100	100	86	70	126
Nh	3	3	4	3	5	5
H	0.6009	0.6659	0.6246	0.6235	0.5698	0.563
π_i ($\times 10^{-3}$)	2.435	3.154	2.419	3.158	3.16	2.718

N = Número de cromosomas; Nh = Número de haplotipos; H = Diversidad Haplotípica; π_i = Diversidad nucleotídica dentro de las poblaciones.

Análisis de varianza molecular (AMOVA) entre las poblaciones mesoamericanas y sudamericanas

El Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) mostró la variabilidad dada por los haplotipos O entre los sujetos de las poblaciones de Mesoamérica ($F_{IT} = 0.121$; $P = 0.033$); La mayoría de esta variabilidad representa la diferenciación entre los individuos dentro de las poblaciones ($F_{IT} = 0.104$; $P = 0.059$). Cuando las dos poblaciones sudamericanas se incluyeron como un segundo grupo en la prueba AMOVA, la mayoría de la variación genética se encontró dentro de las poblaciones ($F_{IT} = 0.132$; $P = 0.01$), dando como resultado una diferenciación baja y no significativa entre estas regiones ($F_{CT} = 0.004$; $P = 0.264$). Aunque mucha de esta variabilidad representa diferencias entre los individuos dentro de las poblaciones ($F_{IS} = 0.087$; $p = 0.062$), los grupos Mesoamericano y Sudamericano presentaron una diferenciación significativa dentro de las poblaciones ($F_{SC} = 0.046$; $P = 0.001$)(Tabla 7).

Heterocigocidad nucleotídica pareada entre poblaciones Nativas Americanas

Para la heterocigocidad nucleotídica pareada *entre* poblaciones (π_{ij}), los valores más altos fueron obtenidos entre las poblaciones Cayapa y Maya ($\pi_{ij} = 0.197$) y entre las poblaciones Cayapa y Nahua ($\pi_{ij} = 0.184$), mientras que los valores más bajos fueron obtenidos entre las poblaciones Mazahua y Mestiza, y entre las poblaciones Nahua y Maya ($\pi_{ij} = 0$). Después de aplicar la corrección de Bonferroni para análisis múltiples (0.0083), los valores de diversidad nucleotídica entre la población Cayapa y todas las demás poblaciones, fueron significativos excepto el obtenido con la

población mestiza (Tabla 8). Mientras que entre las poblaciones nativas mesoamericanas, no se encontraron valores significativos

Tabla 7. Análisis de varianza molecular (AMOVA) entre las poblaciones mesoamericanas y sudamericanas

Número de grupos	Z	Entre grupos		Entre poblaciones dentro de grupos		Entre individuos dentro de poblaciones		Entre individuos dentro de la población total	
		F_{CT}	valor de P	F_{SC}	valor de P	F_{IS}	valor de P	F_{IT}	valor de P
Dos	6	0.004	0.264	0.046	0.001	0.087	0.062	0.132	0.010
Uno	6			0.048	0.000	0.087	0.054	0.131	0.009
sin Cayapa	5			0.015	0.124	0.073	0.095	0.087	0.060
Solo Mesoamérica	4			0.020	0.088	0.104	0.059	0.121	0.033

Grupos, mesoamericano y sudamericano; Z, número de poblaciones. Grupo mesoamericano, Nahua, Maya, Mazahua y Mestizo; Grupo sudamericano, Cayapa y Aymara de Bolivia.

Tabla 8. Diversidad nucleotídica pareada (π_{ij}) entre las poblaciones Nativas Americanas

	Nahua	Mazahua	Maya	Mestizo	Cayapa	Aymara Bol
Nahua		0.135	0.973	0.018	0.000	0.207
Mazahua	0.020		0.045	0.405	0.000	0.126
Maya	-0.011	0.023		0.018	0.000	0.126
Mestizo	0.044	-0.002	0.051		0.027	0.108
Cayapa	0.184	0.079	0.197	0.040		0.000
Aymara B	0.007	0.007	0.015	0.008	0.109	

La diversidad nucleotídica pareada (π_{ij}) se indica abajo de la diagonal, y sus respectivos valores P se indican arriba de la diagonal. Parámetros de acuerdo al modelo de Kimura. Se resaltan en negritas los valores que son significativos después de aplicar la corrección de Bonferroni ($P = 0.05/6 = 0.0083$).

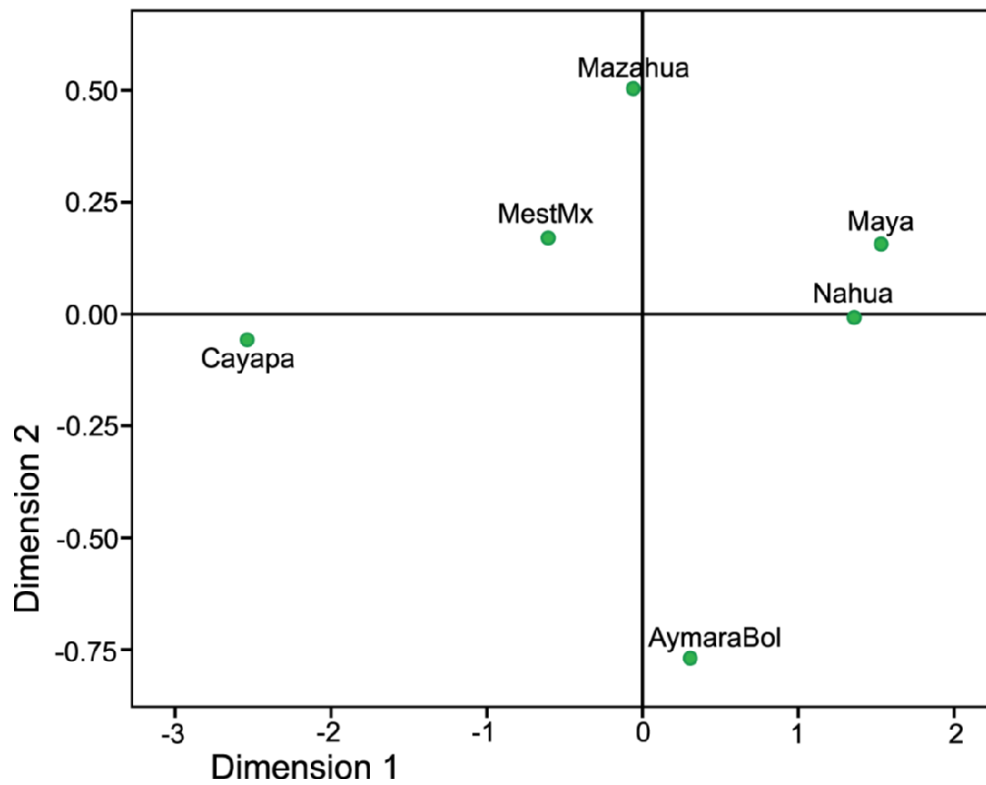


Figura 11. Representación de Escalamiento Multidimensional basada en la diversidad nucleotídica pareada (π_{ij}) entre las poblaciones Nativas Americanas. Stress =0.00323.

después de aplicar la corrección de Bonferroni. Este patrón de diferenciación se representó en una gráfica MDS (Figura 11); de manera interesante, los Aymaras de Bolivia se encontraron cercanos a las poblaciones mesoamericanas, mientras que los Cayapas, fueron la población más diferenciada.

Esta característica excepcional de los Cayapas con respecto a las poblaciones indígenas restantes podría involucrar los siguientes procesos: a) efecto fundador y/o deriva génica como los que se han descrito en los grupos Amerindios (Wang et al. 2007); b) mezcla europea, y c) sesgo en el muestreo de la población. Aunque no se pudo descartar alguna de estas explicaciones, los Cayapas presentaron la diversidad nucleotídica más alta (π_i), un número de diferentes haplotipos, y una diferenciación genética (π_{ij} y valores P) con respecto a las otras poblaciones nativas americanas (Tablas 5 y 6) (Figuras 10 y 11).

Diversidad genética de los alelos O en las poblaciones Nativas Americanas.

En la tabla 9, se muestra la diversidad genética (H_E), y el índice de fijación (F_{IS}) de los alelos O para las poblaciones mesoamericanas, junto con los de las poblaciones sudamericanas con genotipos previamente obtenidos por RFLP-PCR. En general, tal como se mostró para la diversidad haplotípica, se notó que la diversidad genética (H_E) fue más alta en las poblaciones mesoamericanas que en las poblaciones sudamericanas. Sin embargo, debido a que no se pudo calcular el error estándar por trabajar con un solo locus, no se pudo realizar una comparación entre los valores de heterocigocidad. Algunas poblaciones, presentaron un exceso de homocigotos (valores F_{IS} positivos), mientras que otras exhibieron un déficit de homocigotos

(valores F_{IS} negativos). Sin embargo, todos los grupos con déficit de homocigotos estuvieron dentro del equilibrio de Hardy-Weinberg ($P > 0.05$), mientras que los grupos Nahuas y mestizos mexicanos mostraron un exceso significativo de homocigotos ($P \leq 0.05$).

Para propósitos comparativos, en la Figura 12 (y Tabla 10) se presenta, la distribución de los tres alelos O predominantes observados en los nativos americanos (O^1 , O^{1v} , y $O^{1v(G542A)}$) en un total de 13 poblaciones americanas y tres asiáticas. Es particularmente notable, que el haplotipo $O^{1v(G542A)}$ fue exclusivamente observado en americanos pero no en poblaciones asiáticas, en un rango de 0.042 a 0.56 en las tribus Cayapa y Yanomama, respectivamente.

Entre las poblaciones americanas, la frecuencia más alta del haplotipo O^1 fue observada en Cayapas (0.53), seguidos por los mestizos chilenos de Santiago (0.40) y mestizos mexicanos (0.36). Por el contrario, la frecuencia más baja de O^1 fue observada en los Arara (0.03), seguido por los Yanomama (0.09). Finalmente, la frecuencia más alta del haplotipo O^{1v} fue observada en los Huilliches de Chile (0.7) así como en los Araras de Brasil (0.67) (Figura 12).

Los datos de las poblaciones de la Figura 12 fueron usados para construir un dendrograma NJ basado en las distancias de los coeficientes de coancestría (Figura 13). En el árbol NJ, se puede observar un panorama amplio de las relaciones genéticas entre las 16 poblaciones, basado exclusivamente en los tres alelos O (O^1 , O^{1v} , y $O^{1v(G542A)}$). En principio, se puede observar que no hay un orden en relación a la localización geográfica de las poblaciones; sin embargo, se debe tener cuidado en hacer interpretaciones extensivas acerca del origen y evolución con respecto a estas poblaciones con datos de tres alelos de un solo gen.

Tabla 9. Diversidad genética (H_E), Índice de fijación (F_{IS}) y valores P basados en las frecuencias de los alelos O de nueve poblaciones Nativas Americanas.

Población	N	H_E	F_{IS}	Valor de P
Nahua	37	0.586	0.180	0.04
Mazahua	50	0.621	-0.117	0.12
Maya	50	0.601	-0.047	0.30
Mestiza	43	0.618	0.202	0.02
Amazoniana	48	0.543	-0.144	0.18
Aymara c	84	0.585	-0.119	0.05
Huilliche	75	0.462	0.084	0.38
Cayapa	35	0.537	0.082	0.38
Aymara Bol	63	0.544	-0.051	0.64

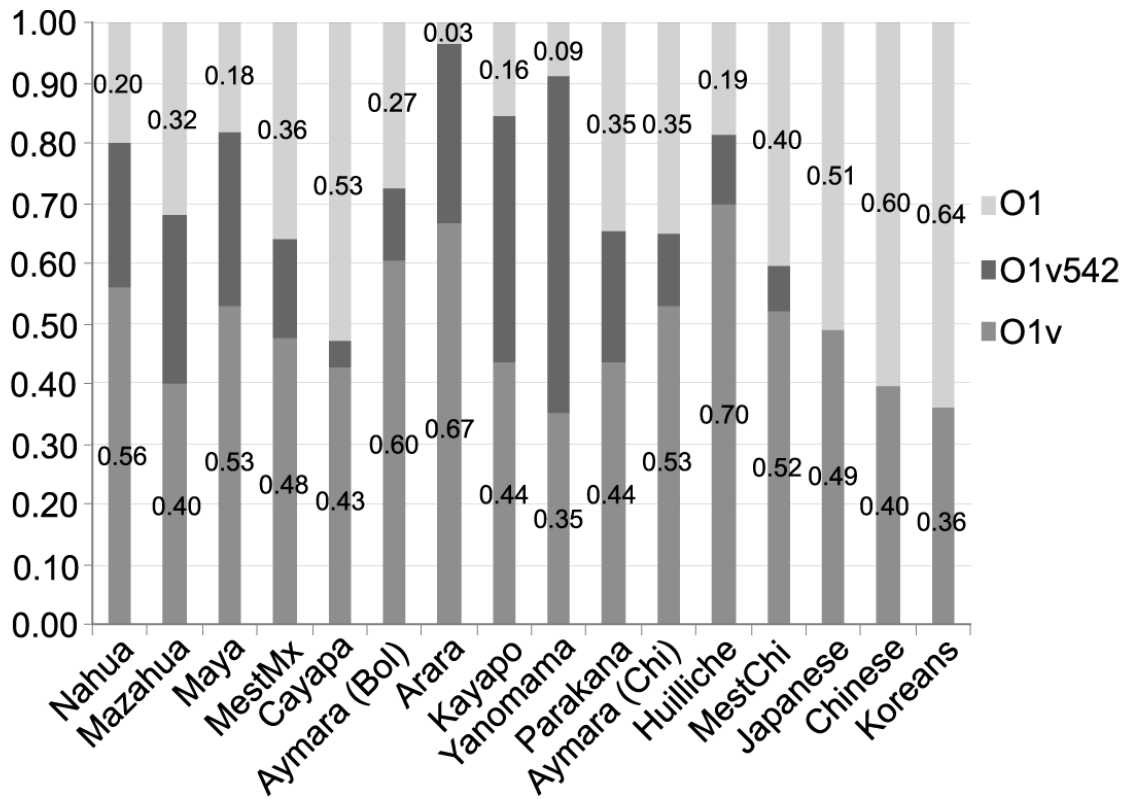


Figura 12. Distribución de los tres alelos O predominantes (O^1 , O^{1v} , y $O^{1v(G542A)}$) en trece poblaciones Americanas y tres Asiáticas

Tabla 10. Frecuencias de los principales alelos O en trece poblaciones Americanas y tres poblaciones Asiáticas.

Población	O1 ^v	O1 ^{v542}	O1
Nahua	0,56	0,24	0,20
Mazahua	0,40	0,28	0,32
Maya	0,53	0,29	0,18
Mest Mex	0,48	0,16	0,36
Cayapa	0,43	0,04	0,53
Aymara b	0,60	0,12	0,27
Arara	0,67	0,30	0,03
Kayapo	0,44	0,41	0,16
Yanomama	0,35	0,56	0,09
Parakana	0,44	0,22	0,35
Aymara Chi	0,53	0,12	0,35
Huilliche	0,70	0,11	0,19
Mest Chi	0,52	0,08	0,40
Japoneses	0,49	0,00	0,51
Chinos	0,40	0,00	0,60
Coreanos	0,36	0,00	0,64

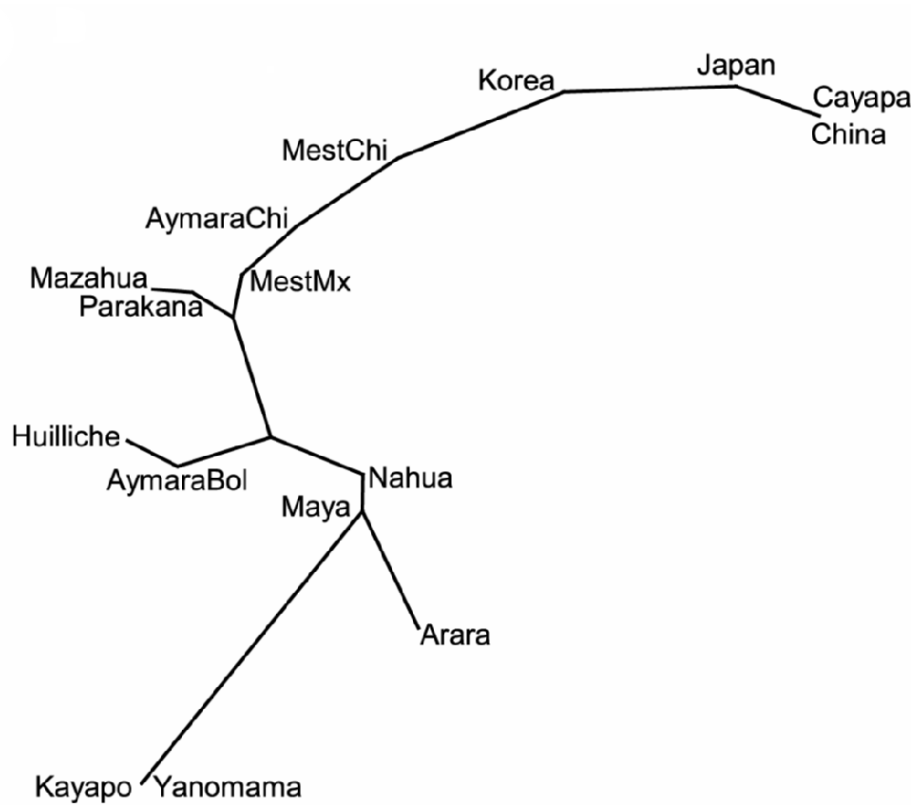


Figura 13. Árbol *neighbour-joining* sin raíz, que muestra las relaciones genéticas entre trece poblaciones Americanas y tres poblaciones Asiáticas, basado en los tres alelos O predominantes.

Correlación entre las distancias genética y geográfica de las poblaciones Nativas Americanas

Sí las poblaciones nativo americanas, siguieran un modelo de “aislamiento por distancia” (IBD), se esperaría encontrar que las poblaciones más cercanas geográficamente también fueran las más cercanas genéticamente. De tal manera, sí se asume que hubo una sola fuente para las poblaciones nativas americanas, el modelo de fundadores serial, predice una disminución de la diversidad genética (heterocigocidad) conforme se aumentara la distancia con respecto del lugar de origen (Ramachandran et al. 2005; Wang et al. 2007). Por tal motivo, con el propósito de establecer sí existía una correlación entre las distancias genéticas y las distancias geográficas, se aplicó la prueba de Mantel a las poblaciones nativas de América. Para realizar esta prueba, fue necesario obtener tanto la matriz de distancias genéticas (Tabla 11), como la matriz de distancias geográficas (Tabla 12) entre las diferentes poblaciones.

Los resultados mostraron que la correlación entre distancias genética y geográfica no fue significativa entre las poblaciones nativas americanas. Aunque la prueba de Mantel se repitió eliminando al grupo Cayapa, considerando que este grupo fue el más diferenciado, ninguna correlación significativa fue establecida entre las distancias genética y geográfica. La prueba de correlación fue repetida solo con las poblaciones sudamericanas (sin los Cayapas), pero tampoco se encontró una correlación significativa ($P = 0.047$), después de aplicar la corrección de Bonferroni ($P = 0.05/4 = 0.0125$). Todos estos resultados no apoyan un modelo de “aislamiento por distancia”. De manera similar, el descenso de la diversidad genética de los haplotipos O con

respecto a la distancia geográfica a partir del posible lugar de origen (Beringia) no fue significativo ($P > 0.05$) (Tabla 13 y Figura 14).

Prueba de neutralidad de Tajima para los haplotipos O en los Nativos Americanos

La distribución de los polimorfismos en la secuencia de bases, puede ser usada para estudiar la selección a nivel molecular. La prueba de neutralidad de Tajima (D de Tajima) se basa en la detección de las diferencias entre dos estimadores de la diversidad genética: el primero, π , se refiere a la diversidad nucleotídica (el número de nucleótidos diferentes por sitio entre dos secuencias tomadas al azar) (Nei and Li 1979). Y el segundo, θ , que se puede calcular utilizando el número total de sitios segregativos o polimórficos en un grupo de secuencias (Tajima 1983). Si D resulta negativa quiere decir que θ posee un valor mayor que π , y significa que hay un exceso de polimorfismos de baja frecuencia, indicando un crecimiento poblacional histórico y/o selección positiva. En cambio, si D resulta positiva quiere decir que π tiene un mayor valor que θ , y significa que existe un nivel bajo de polimorfismos de alta y baja frecuencia, indicando una reducción del tamaño poblacional y/o selección equilibradora. Si D es igual a cero quiere decir que no existe diferencia alguna entre ambos estimadores y que existe un equilibrio mutación-deriva génica (Tajima 1983; Tajima 1989).

Al efectuar la prueba de Tajima D , para examinar posibles escenarios de selección con respecto a los haplotipos O en seis poblaciones nativas americanas, se encontraron valores positivos (de 1.21449 a 2.80438), pero no significativos ($P > 0.89$) (Tabla 14).

Tabla 11. Distancias genética (coancestría de Reynolds) entre las poblaciones Nativas Americanas

	Nahua	Mazahua	Maya	Cayapa	Aymarab	Arara	Kayapo	Yanomama	Parakana	Huilliche
Nahua										
Mazahua	0,02994									
Maya	0,00914	0,02685								
Cayapa	0,13140	0,07576	0,14850							
Aymara b	0,01753	0,05666	0,03515	0,08853						
Arara	0,02360	0,10582	0,02292	0,29269	0,07392					
Kayapo	0,02332	0,02191	0,00784	0,20195	0,09447	0,04630				
Yanomama	0,11519	0,09010	0,08264	0,34430	0,22658	0,12935	0,00780			
Parakana	0,02812	0,00456	0,03167	0,04896	0,03688	0,11163	0,04444	0,13277		
Huilliche	0,03402	0,11883	0,05555	0,18353	0,01840	0,05177	0,13854	0,28744	0,09515	
Aymara c	0,03185	0,03632	0,04732	0,04021	0,01228	0,11727	0,09535	0,21959	0,01734	0,05480

b, Bolivia; c, Chile.

Tabla 12. Distancias geográficas entre las poblaciones Nativas Americanas

	Nahua	Mazahua	Maya	Cayapa	Aymara,b	Arara	Kayapo	Yanomama	Parakana	Huilliche
Nahua										
Mazahua	0.0230									
Maya	0.1239	0.1066								
Cayapa	0.2985	0.3005	0.2477							
Aymara b	0.5234	0.5281	0.4780	0.2313						
Arara	0.4301	0.4336	0.3804	0.1344	0.0976					
Kayapo	0.5959	0.5927	0.5109	0.3078	0.1856	0.2098				
Yanomama	0.4555	0.4493	0.3606	0.1964	0.2246	0.1727	0.1543			
Parakana	0.6265	0.6260	0.5528	0.3297	0.1536	0.2101	0.0702	0.2102		
Huilliche	0.7078	0.7205	0.7039	0.4651	0.2711	0.3524	0.4060	0.4943	0.3401	
Aymara c	0.5238	0.5301	0.4863	0.2387	0.0310	0.1098	0.2157	0.2525	0.1791	0.2468

Las distancias geográficas están expresadas en Km x 10⁻⁴. b, Bolivia; c, Chile.

Tabla 13. Prueba de Mantel para evaluar la correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica de las poblaciones Nativas Americanas

	Poblaciones analizadas	<i>r</i>	Valor de <i>P</i>
A	Meso América y Sudamérica	-0.1643	0.8470
B	Todas, excepto Cayapa	-0.0762	0.6160
C	Sudamérica, sin Meso América	0.3092	0.1290
D	Sudamérica, sin Cayapa y sin Meso América	0.5345	0.0470

Después de 999 permutaciones. *r*, coeficiente de correlación; *P*, nivel de significancia; corrección de Bonferroni: $P = 0.05/4 = 0.0125$. Las poblaciones analizadas fueron, por parte de Meso América: Nahua, Mazahua y Maya; por parte de Sudamérica: Cayapa, Aymara de Bolivia, Arara, Kayapo, Yanomama, Parakana, Huilliche y Aymara de Chile.

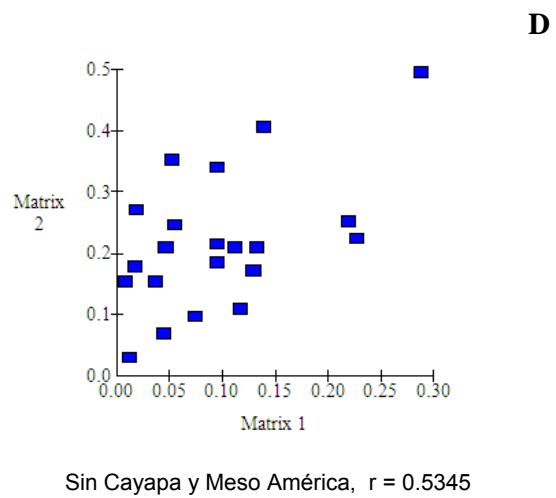
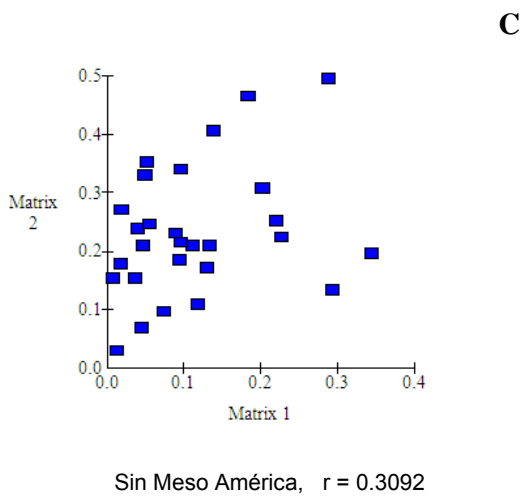
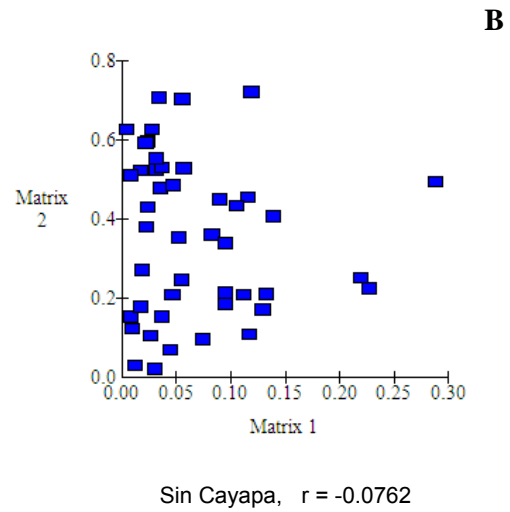
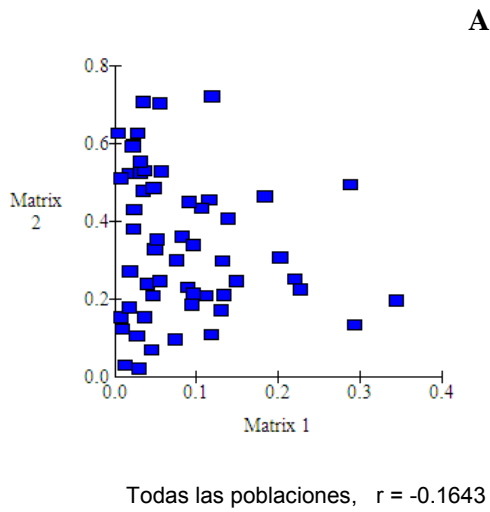


Figura 14. Gráficas de la prueba de Mantel. Matriz 1, distancia genética de Reynolds; Matriz 2, distancia geográfica ($\text{Km} \times 10^4$); r , coeficiente de correlación de las 2 matrices.

Tabla 14. Prueba de neutralidad de Tajima para los haplotipos O de Meso América y Sudamérica.

	Nahua	Mazahua	Maya	Mestizo	Cayapa	Aymara b
N	74	100	100	86	70	126
S	6	6	6	6	6	8
π	2.01148	2.60525	1.99838	2.60821	2.61035	2.24483
D Tajima	1.49919	2.80438	1.62771	2.72895	2.61767	1.21449
valor de P	0.940	0.999	0.949	0.993	0.992	0.898

N, tamaño de la muestra; S, sitios segregantes; π , diversidad nucleotídica.

DISCUSION

Los grupos sanguíneos ABO, fueron los primeros polimorfismos humanos descritos (Landsteiner 1901). Y aunque estos, todavía constituyen el sistema sanguíneo más importante en las practicas de transfusión y de transplantes, los grupos sanguíneos ABO, inicialmente se usaron para propósitos antropológicos, encontrándose amplias variaciones entre individuos de diferente origen étnico (Hirszfeld L and Hirszfeld H 1919). Desde la elucidación de las bases moleculares de los genotipos ABO, los polimorfismos genéticos de este locus, se han investigado extensivamente a nivel de secuencia del DNA, demostrándose la existencia de varios alelos O entre las diferentes poblaciones del mundo (Chester and Olsson 2001; Yip 2002).

El presente trabajo, representa el primer reporte de los polimorfismos moleculares del alelo O entre los indígenas de Meso América (México). El análisis de las secuencias de los exones 6 y 7 de los alelos O, mostró que todas las poblaciones estudiadas presentaron los haplotipos O^1 (O01), O^{1v} (O02) y $O^{1v(G542A)}$. De acuerdo con reportes anteriores sobre indígenas de Sudamérica, las frecuencias del haplotipo O^{1v} obtenidas en este estudio fueron más altas que las del haplotipo O^1 (excepto para las del grupo Cayapa, ver Tabla 6) en contraste a las demás poblaciones del mundo (Barjas-Castro et al. 2003; Chester and Olsson 2001; Llop et al. 2006; Olsson et al. 1998; Roubinet et al. 2004; Roubinet et al. 2001).

La mutación G542A como un Marcador Informativo de Ancestría (AIM) del componente Nativo Americano.

El haplotipo O^{1v(G542A)} se encontró tanto en las poblaciones mesoamericanas como en las sudamericanas. La presencia constante de la mutación G542A en todas las poblaciones nativas americanas apoya el empleo de esta mutación como un Marcador Informativo de Ancestría (AIM) relacionado con el componente Nativo Americano. Sin embargo, se requiere examinar su presencia en más poblaciones europeas y africanas para confirmar y/o determinar su valor como AIM en el estudio de poblaciones mezcladas.

Se debe considerar, que ocasionalmente, el alelo O^{1v(G542A)} ha sido encontrado en algunos individuos europeos y del Este Medio (6 daneses, 2 kuwaitíes y 1 inglés) (Olsson et al. 1998; Yip 2000; Yip et al. 2006). Tres posibilidades pueden explicar estas observaciones: flujo genético, polimorfismo ancestral o mutación recurrente. Con respecto a la primera posibilidad, hay diversos ejemplos de flujo genético de nativos americanos hacia Europa, muy probablemente mediado a través de individuos con una ancestría mezclada (poblaciones hispánicas o latinoamericanas). Probablemente, la mejor evidencia proviene del análisis detallado de las secuencias de mtDNA publicadas. De hecho, los linajes nativos americanos A2, C1, y D1 pueden ser fácilmente reconocidos en varias poblaciones a lo largo del continente, como puede observarse en los diferentes reportes de Europa (Behar et al. 2004; Crespillo et al. 2000; Helgason et al. 2000; Pfeiffer et al. 2001; Picornell et al. 2005; Pinto et al. 1996; Rando et al. 1999). Además, también existen algunos ejemplos del flujo de mtDNA de nativos americanos en algunas poblaciones africanas (Jackson et al. 2005; Salas et al. 2002).

La segunda posibilidad, de que una mutación recurrente pueda explicar la presencia irregular y ocasional de la mutación G542A en Europa y en el Este Medio parece poco probable, ya que esta mutación, solo se ha encontrado asociada al alelo O^{1v} y no a otros alelos (Calafell et al. 2008; Roubinet et al. 2004). Finalmente, la tercera posibilidad consiste en que el alelo O^{1v(G542A)} sea un polimorfismo ancestral, que se originó ya sea en Europa o en África. Se ha encontrado evidencia de que los alelos O^{1v} y O¹, que se encuentran distribuidos en todas las poblaciones del mundo, divergieron de su alelo ancestral A¹ hace aproximadamente ~2.5 y ~1.5 millones de años respectivamente en África (Calafell et al. 2008). Sin embargo, es importante hacer notar que el alelo O^{1v(G542A)}, a pesar de tener un solo cambio con respecto al alelo O más antiguo, tiene una baja frecuencia tanto en Kuwait e Inglaterra (<1%) y esta ausente en varias poblaciones europeas, asiáticas y africanas (Kang et al. 1997; Ogasawara et al. 1996; Roubinet et al. 2004; Yang et al. 2007; Yip 2000). Aunque esta distribución parece ser muy restringida para la distribución de un alelo ancestral, sería importante establecer la posible edad del alelo O^{1v(G542A)}. Si el alelo se originó recientemente (América), es más plausible considerar que este alelo haya sido dispersado a lo largo del mundo vía un flujo latinoamericano

Incubación en Beringia, posible origen de la mutación G542A

El haplotipo O^{1v(G542A)}, que guarda una estrecha relación con el haplotipo O^{1v} (un solo evento mutacional), es el haplotipo más frecuente en la mayoría de los nativos americanos (Figura 10). Este hecho apoya que la mutación G542A se haya podido originar en el haplotipo O^{1v}, que es muy frecuente en las poblaciones asiáticas (Kang et al. 1997; Ogasawara et al. 1996; Roubinet et al. 2004; Yang et

al. 2007; Yip 2000). Evidencias recientes, principalmente provenientes del mtDNA con respecto al poblamiento de América (Fagundes et al. 2008b; Kitchen et al. 2008; Mulligan et al. 2008; Schroeder et al. 2007; Tamm et al. 2007) permite inferir que esta mutación pudo haber surgido durante uno de los siguientes momentos: (i) en los ancestros asiáticos de los nativos americanos antes de llegar a Beringia; (ii) durante el tiempo en que los ancestros de los nativos americanos estuvieron viviendo en Beringia, o (iii) durante la expansión poblacional a América en el final del Último Máximo Glacial (LGM), hace ~18,000–15,000 años AP. Como se mencionó anteriormente, el haplotipo $O^{1v(G542A)}$ se ha encontrado de forma persistente y casi exclusivamente en las poblaciones nativas americanas y no en las asiáticas (Figura 12), de tal forma que este hallazgo no apoya el que la mutación G542A haya surgido en los ancestros asiáticos antes de llegar a Beringia. Por otro lado, si esta mutación hubiera surgido durante la expansión poblacional, es difícil explicar de explicar la amplia distribución del haplotipo $O^{1v(G542A)}$ en todas las poblaciones nativas americanas estudiadas a la fecha. Por lo tanto, resulta más plausible que el surgimiento de la mutación G542A haya tenido lugar en Beringia, de acuerdo al Modelo de Incubación Beringiana (BIM), el cuál sugiere que los emigrantes asiáticos estuvieron aislados por un periodo amplio de tiempo, previamente a entrar a América, dando lugar a linajes fundadores en los ancestros de los nativos americanos y diferenciados de los subclados asiáticos (Tamm et al. 2007). La presencia exclusiva del haplotipo $O^{1v(G542A)}$ en Beringia y su ausencia en las poblaciones asiáticas (Asia Central) podría ser una contribución substancial al Modelo de Incubación Beringiana desde la perspectiva del grupo sanguíneo O (Figura 6).

Los alelos ABO de los nativos americanos y el poblamiento de América

La distribución geográfica de los grupos sanguíneos ABO es compleja en el continente Americano. En Norte América, las poblaciones eskimales tienen grupos sanguíneos A, B, y O, mientras que las poblaciones na-dene y otras, tienen grupos sanguíneos A y O; y todas las demás poblaciones nativas americanas del Norte, Centro y Sudamérica tienen casi exclusivamente el grupo O (Cavalli-Sforza et al. 1994). Para explicar las diferentes distribuciones geográficas de los alelos ABO, existen dos hipótesis de trabajo relacionadas con el poblamiento de América: i) el modelo clásico de las tres-oleadas propuesto por Greenberg y colaboradores (Greenberg JH et al. 1986), y ii) el modelo reciente de tres-etapas que acentúa un solo origen (Fagundes et al. 2008a; Kitchen et al. 2008; Mulligan et al. 2008; Perego et al. 2009). Sin embargo, existe un acuerdo general de que los indígenas eskimales-aleutianos y los na-dene representan la última y más reciente expansión significativa hacia el Nuevo Mundo (Gonzalez-Jose et al. 2008; Schurr and Sherry 2004; Tamm et al. 2007; Volodko et al. 2008). Por tal motivo, la emergencia de los grupos circun-árticos no será abordada aquí.

La distribución geográfica tanto del alelo autosómico privado D9S1120 como de las variantes mitocondriales y del cromosoma Y, ubicuas en América, sugiere que todos los nativos americanos contemporáneos son descendientes de una población fundadora común (Dillehay 2009; Gonzalez-Jose et al. 2008; Kitchen et al. 2008; Schroeder et al. 2007; Tamm et al. 2007; Wang et al. 2007). De manera similar, la distribución de los alelos O entre las poblaciones nativas americanas y mestizas (Figuras 10 y 12) sugiere que los alelos O^{1V} , $O^{1V(G542A)}$, y O^1 fueron parte de la fuente genética ABO original presente entre los primeros nativos americanos. La presencia constante de los tres haplotipos en los grupos nativos americanos de

las regiones de Meso América y Sudamérica es acorde con la hipótesis de una sola población fundadora. Por el contrario, la ausencia de linajes predominantes compartidos entre poblaciones nativas de Meso América y Sudamérica, apoyaría modelos de múltiples migraciones. Adicionalmente, aunque la amplia distribución de los mismos tres haplotipos O a través de América no nos permite descartar hipótesis específicas concernientes al poblamiento de América (Perego et al. 2009), esta distribución esta de acuerdo con la fuerte expansión poblacional que probablemente ocurrió hacia el final de el Último Glacial Máximo (LGM), indicando un rápido poblamiento del Nuevo Mundo, presumiblemente a lo largo de la ruta de la costa del Pacífico (Fagundes et al. 2008b; Kitchen et al. 2008; Mulligan et al. 2008; Tamm et al. 2007). Tal como fue descrito, los resultados del presente trabajo, apoyan propuestas recientes acerca del poblamiento del Nuevo Mundo; Sin embargo, los haplotipos O deben ser obtenidos de poblaciones asiáticas y nativas americanas (especialmente de Siberia y Norteamérica) para confirmar las hipótesis del escenario del grupo O.

El predominio de los alelos O en los nativos americanos

Los nativos americanos de Centro y Sudamérica (y algunos de América del Norte) son únicos en haber perdido en su mayoría los alelos A y B. Tres hipótesis se han propuesto para explicar la alta frecuencia del grupo sanguíneo O. Primero, un efecto fundador ocurrido durante el poblamiento inicial de América; segundo, selección natural de los grupos sanguíneos O asociados con alguna ventaja selectiva todavía no identificada, y tercero, una deriva génica relacionada con el descenso poblacional asociado con el contacto europeo. En un estudio reciente, las frecuencias ABO observadas entre los nativos americanos antiguos (pre-

contacto) y los contemporáneos de la misma región, no fueron significativamente diferentes, hecho que sugiere que los eventos ocurridos después del contacto europeo no alteraron el patrón de diversidad ABO (Halverson and Bolnick 2008). Sin embargo, esta afirmación debe ser confirmada en diferentes regiones del continente para descartar hipótesis alternativas. Con respecto a la selección natural, el hecho de que los haplotipos O^1 y O^{1v} sean alelos nulos y, que en principio tengan valores selectivos idénticos, apoya la noción de que el azar (efecto fundador y deriva génica azarosa) pueda ser el responsable, tanto para el predominio de los haplotipos O^{1v} como para la fijación del grupo sanguíneo O. En apoyo de esta inferencia, se obtuvieron valores no significativos en la prueba de Tajima D en todas las poblaciones estudiadas aquí. Sin embargo, aún sí la deriva génica fuera la responsable para la fijación del grupo O en las poblaciones americanas, es difícil de excluir definitivamente el efecto de la selección natural con los datos disponibles de este estudio.

La estructura genética de las poblaciones de Meso América y Sudamérica

El análisis de la estructura genética (AMOVA) para las poblaciones nativas americanas mostró diferencias no significativas entre Meso América y Sudamérica. Sin embargo, sí se observó una diferenciación significativa entre las poblaciones dentro de los grupos. Este resultado puede involucrar patrones de diferenciación por deriva génica y flujo genético previos al contacto europeo, tal como ha sido inferido de los análisis del mtDNA, cromosoma-Y y Repetidos Cortos en Tandem (STR), tanto en Sudamérica (Rodríguez-Delfin et al. 2001; Tarazona-Santos et al. 2001) como en Mesoamérica (Rangel-Villalobos et al. 2008; Wang et al. 2007). Sin embargo, una mezcla vía contacto post-europeo no puede descartarse, porque

esta ya se ha detectado y/o inferido en Cayapas (este estudio) y en las poblaciones mesoamericanas (Bonilla et al. 2005; Lisker et al. 1996). Para las poblaciones mesoamericanas y sudamericanas, no se encontró correlación entre (i) las distancias genéticas y las distancias geográficas y (ii) un descenso linear de la diversidad genética con respecto a la distancia geográfica desde Beringia, el presumible origen de los nativos americanos. Este resultado se relaciona con la distribución observada del alelo privado del locus D9S1120 en los nativos americanos, que se desvía del patrón global y que no muestra un gradiente de norte a sur en las frecuencias alélicas (Wang et al. 2007). Esta distribución se explica más fácilmente por la difusión espacial inicial de variantes raras durante el poblamiento de América, más que por selección natural a través del continente. No se ha encontrado apoyo para el modelo IBD al analizar marcadores relacionados al cromosoma Y de las poblaciones mesoamericanas, sugiriendo un escenario complejo, influido por un elevado flujo genético entre las poblaciones nativas americanas en ciertas regiones y con particulares historias demográficas (Rangel-Villalobos et al. 2008), tal como se ha descrito para las poblaciones sudamericanas (Rodriguez-Delfin et al. 2001; Tarazona-Santos et al. 2001; Wang et al. 2007).

CONCLUSIONES

Las frecuencias del haplotipo O^{1v} fueron más altas que las del haplotipo O^1 (excepto para Cayapa) al contrario de las demás poblaciones del mundo.

La distribución de los mismos haplotipos O^1 , O^{1v} , y $O^{1v(G542A)}$, en las poblaciones mesoamericanas y sudamericanas indican que:

- 1) Estos haplotipos constituyen el principal pool genético de las primeras poblaciones nativas americanas.
- 2) Estos haplotipos provienen de la misma población fundadora ancestral.
- 3) La presencia constante y restringida de la mutación G542A en todas las poblaciones nativas americanas, indica que esta mutación surgió en su población fundadora.
- 4) La presencia constante y restringida de la mutación G542A en los nativos americanos, permite proponer a esta mutación como un Marcador Informativo de Ancestría (AIM).

En base al conocimiento actual del poblamiento de América, se sugiere que la mutación G542A pudo haber emergido en Beringia durante la diferenciación de los linajes asiáticos que dieron lugar a la población fundadora de América.

Perspectivas

Para confirmar las observaciones anteriores, se requiere que se realicen estudios adicionales de la diversidad de secuencias del gene ABO, particularmente en las poblaciones norteamericanas y noro-asiáticas (Siberia, por ejemplo).

REFERENCIAS

- Achilli A, Perego UA, Bravi CM, Coble MD, Kong QP, Woodward SR, Salas A, Torroni A, and Bandelt HJ. 2008. The phylogeny of the four pan-American MtDNA haplogroups: implications for evolutionary and disease studies. *PLoS ONE* 3(3):e1764.
- Bandelt HJ, Forster P, and Rohl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular biology and evolution* 16(1):37-48.
- Barjas-Castro ML, Soares MC, Menezes RC, Carvalho MH, Costa FF, and Saad ST. 2003. ABO blood group in Amerindians from Brazilian Amazon. *Ann Hum Biol* 30(2):220-224.
- Battilana J, Fagundes NJ, Heller AH, Goldani A, Freitas LB, Tarazona-Santos E, Munkhbat B, Munkhtuvshin N, Krylov M, Benevolenskaia L and others. 2006. Alu insertion polymorphisms in Native Americans and related Asian populations. *Ann Hum Biol* 33(2):142-160.
- Behar DM, Hammer MF, Garrigan D, Villemes R, Bonne-Tamir B, Richards M, Gurwitz D, Rosengarten D, Kaplan M, Della Pergola S and others. 2004. MtDNA evidence for a genetic bottleneck in the early history of the Ashkenazi Jewish population. *Eur J Hum Genet* 12(5):355-364.
- Berger SA, Young NA, and Edberg SC. 1989. Relationship between infectious diseases and human blood type. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 8(8):681-689.
- Bolnick DA, Shook BA, Campbell L, and Goddard I. 2004. Problematic use of Greenberg's linguistic classification of the Americas in studies of Native American genetic variation. *American journal of human genetics* 75(3):519-522.
- Bolnick DA, and Smith DG. 2003. Unexpected patterns of mitochondrial DNA variation among Native Americans from the southeastern United States. *American journal of physical anthropology* 122(4):336-354.
- Bonatto SL, and Salzano FM. 1997a. Diversity and age of the four major mtDNA haplogroups, and their implications for the peopling of the New World. *American journal of human genetics* 61(6):1413-1423.
- Bonatto SL, and Salzano FM. 1997b. A single and early migration for the peopling of the Americas supported by mitochondrial DNA sequence data. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(5):1866-1871.
- Bonilla C, Gutierrez G, Parra EJ, Kline C, and Shriver MD. 2005. Admixture analysis of a rural population of the state of Guerrero, Mexico. *American journal of physical anthropology* 128(4):861-869.
- Boren T, Falk P, Roth KA, Larson G, and Normark S. 1993. Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science (New York, NY)* 262(5141):1892-1895.
- Bortolini MC, Salzano FM, Bau CH, Layrisse Z, Petzl-Erler ML, Tsuneto LT, Hill K, Hurtado AM, Castro-De-Guerra D, Bedoya G and others. 2002. Y-chromosome biallelic polymorphisms and Native American population structure. *Annals of human genetics* 66(Pt 4):255-259.
- Bortolini MC, Salzano FM, Thomas MG, Stuart S, Nasanen SP, Bau CH, Hutz MH, Layrisse Z, Petzl-Erler ML, Tsuneto LT and others. 2003. Y-chromosome evidence for differing ancient demographic histories in the Americas. *American journal of human genetics* 73(3):524-539.

- Brace CL, Nelson AR, Seguchi N, Oe H, Sering L, Qifeng P, Yongyi L, and Tumen D. 2001. Old World sources of the first New World human inhabitants: a comparative craniofacial view. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(17):10017-10022.
- Calafell F, Roubinet F, Ramirez-Soriano A, Saitou N, Bertranpetit J, and Blancher A. 2008. Evolutionary dynamics of the human ABO gene. *Human genetics* 124(2):123-135.
- Cavalli-Sforza LL, Menozzi P, and Piazza A. 1994. *The history and geography of human genes*. Princeton, N.J.: Princeton University Press.
- Cavalli-Sforza LL, Minch E, and Mountain JL. 1992. Coevolution of genes and languages revisited. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89(12):5620-5624.
- Clausen H, and Hakomori S. 1989. ABH and related histo-blood group antigens; immunochemical differences in carrier isotypes and their distribution. *Vox sanguinis* 56(1):1-20.
- Crawford MH. 1998. *The Origins of Native Americans*. Cambridge, UK: Cambridge Univ. Press.
- Crespillo M, Luque JA, Paredes M, Fernandez R, Ramirez E, and Valverde JL. 2000. Mitochondrial DNA sequences for 118 individuals from northeastern Spain. *International journal of legal medicine* 114(1-2):130-132.
- Chester MA, and Olsson ML. 2001. The ABO blood group gene: a locus of considerable genetic diversity. *Transfus Med Rev* 15(3):177-200.
- DeChaine EG. 2008. A bridge or a barrier? Beringia's influence on the distribution and diversity of tundra plants. *Plant Ecology & Diversity* 1(2):197-207.
- Dillehay TD. 2009. Probing deeper into first American studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(4):971-978.
- Dixon EJ. 2001. Human colonization of the Americas: timing, technology and process. *Quaternary Science Reviews* 20:277-299.
- Excoffier L, Laval G, and Schneider S. 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary bioinformatics online* 1:47-50.
- Excoffier L, Smouse PE, and Quattro JM. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131(2):479-491.
- Fagundes NJ, Kanitz R, and Bonatto SL. 2008a. A reevaluation of the Native American mtDNA genome diversity and its bearing on the models of early colonization of Beringia. *PLoS ONE* 3(9):e3157.
- Fagundes NJ, Kanitz R, Eckert R, Valls AC, Bogo MR, Salzano FM, Smith DG, Silva WA, Jr., Zago MA, Ribeiro-dos-Santos AK and others. 2008b. Mitochondrial population genomics supports a single pre-Clovis origin with a coastal route for the peopling of the Americas. *American journal of human genetics* 82(3):583-592.
- Forster P, Harding R, Torroni A, and Bandelt HJ. 1996. Origin and evolution of Native American mtDNA variation: a reappraisal. *American journal of human genetics* 59(4):935-945.
- Fry AE, Griffiths MJ, Auburn S, Diakite M, Forton JT, Green A, Richardson A, Wilson J, Jallow M, Sisay-Joof F and others. 2008. Common variation in the ABO glycosyltransferase is associated with susceptibility to severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Human molecular genetics* 17(4):567-576.

- Goebel T, Waters MR, and O'Rourke DH. 2008. The late Pleistocene dispersal of modern humans in the Americas. *Science (New York, NY)* 319(5869):1497-1502.
- Gonzalez-Jose R, Bortolini MC, Santos FR, and Bonatto SL. 2008. The peopling of America: craniofacial shape variation on a continental scale and its interpretation from an interdisciplinary view. *American journal of physical anthropology* 137(2):175-187.
- Gorodezky C, Alaez C, Vazquez-Garcia MN, de la Rosa G, Infante E, Balladares S, Toribio R, Perez-Luque E, and Munoz L. 2001. The genetic structure of Mexican Mestizos of different locations: tracking back their origins through MHC genes, blood group systems, and microsatellites. *Human immunology* 62(9):979-991.
- Greenberg JH, Turner CG, and Zegura SL. 1986. The settlement of the Americas: a comparison of the linguistic, dental, and genetic evidence. *Curr Anthropol* 27:477-497.
- Greenberg JH, Turner CG, and Zegura SL. 1986. The settlement of the Americas: a comparison of the linguistic, dental, and genetic evidence. *Curr Anthropol* 27:477-497.
- Grunnet N, Steffensen R, Bennett EP, and Clausen H. 1994. Evaluation of histo-blood group ABO genotyping in a Danish population: frequency of a novel O allele defined as O2. *Vox sanguinis* 67(2):210-215.
- Guo SW, and Thompson EA. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48(2):361-372.
- Guthrie R. 2001. Origin and causes of the mammoth steppe: a story of cloud cover, woolly mammoth tooth pits, buckles, and inside-out Beringia. *Quaternary Science Reviews* 20:549-574.
- Halverson MS, and Bolnick DA. 2008. An ancient DNA test of a founder effect in Native American ABO blood group frequencies. *American journal of physical anthropology* 137(3):342-347.
- Helgason A, Sigurethardottir S, Gulcher JR, Ward R, and Stefansson K. 2000. mtDNA and the origin of the Icelanders: deciphering signals of recent population history. *American journal of human genetics* 66(3):999-1016.
- Henry SM. 2001. Molecular diversity in the biosynthesis of GI tract glycoconjugates. A blood-group-related chart of microorganism receptors. *Transfus Clin Biol* 8(3):226-230.
- Hirszfeld L, and Hirszfeld H. 1919. Essai d'application des methods au problème des Races. *Anthropologie* 29:505-537.
- Hoelzel A. 1999. Impact of population bottlenecks on genetic variation genetic portrait of the peopling of the Americas. *PLoS Biol* 3:965-975.
- Hofreiter M, and Stewart J. 2009. Ecological change, range fluctuations and population dynamics during the Pleistocene. *Curr Biol* 19(14):R584-594.
- Holliday VT. 2009. Geoaerchaeology and the search for the first Americans. *Catena* 78:310-322.
- Horai S, Kondo R, Nakagawa-Hattori Y, Hayashi S, Sonoda S, and Tajima K. 1993. Peopling of the Americas, founded by four major lineages of mitochondrial DNA. *Molecular biology and evolution* 10(1):23-47.
- Hudson R, Laclette JP, Lomelí C, Mancilla R, Morales M, Ostrosky P, and Rojas E. 2007. Código Ético para el Personal Académico del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM México, D.F.

- Jackson BA, Wilson JL, Kirbah S, Sidney SS, Rosenberger J, Bassie L, Alie JA, McLean DC, Garvey WT, and Ely B. 2005. Mitochondrial DNA genetic diversity among four ethnic groups in Sierra Leone. *American journal of physical anthropology* 128(1):156-163.
- Jantz RL, and Owsley DW. 2001. Variation among early North American crania. *American journal of physical anthropology* 114(2):146-155.
- Jobling M A, Hurles M, and Tyler-Smith C. 2004. *Into new found lands. Human evolutionary genetics: origin, peoples & disease* New York: Garland Publishing. p 339-372.
- Kang SH, Fukumori Y, Ohnoki S, Shibata H, Han KS, Nishimukai H, and Okubo Y. 1997. Distribution of ABO genotypes and allele frequencies in a Korean population. *Jpn J Hum Genet* 42(2):331-335.
- Karafet TM, Zegura SL, Posukh O, Osipova L, Bergen A, Long J, Goldman D, Klitz W, Harihara S, de Knijff P and others. 1999. Ancestral Asian source(s) of new world Y-chromosome founder haplotypes. *American journal of human genetics* 64(3):817-831.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution* 16(2):111-120.
- Kitchen A, Miyamoto MM, and Mulligan CJ. 2008. A three-stage colonization model for the peopling of the Americas. *PLoS ONE* 3(2):e1596.
- Kolman CJ, Sambuughin N, and Bermingham E. 1996. Mitochondrial DNA analysis of Mongolian populations and implications for the origin of New World founders. *Genetics* 142(4):1321-1334.
- Lambeck K, Esat TM, and Potter EK. 2002. Links between climate and sea levels for the past three million years. *Nature* 419(6903):199-206.
- Landsteiner K. 1901. Über Agglutinationserscheinungen normalen menschlichen Blutes. *Wien Klin Wschr* 14:1132-1134.
- Lewis PO, and Zaykin D. 2001. Genetic Data Analysis (GDA): Computer program for the analysis of allelic data. p Available at: <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>.
- Lisker R. 1981. *Estructura genética de la población mexicana*. Mexico: Salvat.
- Lisker R, Ramirez E, and Babinsky V. 1996. Genetic structure of autochthonous populations of Meso-America: Mexico. *Human biology; an international record of research* 68(3):395-404.
- Livi-Bacci M. 2006. The depopulation of Hispanic America after the conquest. *Popul Dev Rev* 32:199-232.
- Llop E, Henriquez H, Moraga M, Castro M, and Rothhammer F. 2006. Brief communication: Molecular characterization of O alleles at the ABO locus in Chilean Aymara and Huilliche Indians. *American journal of physical anthropology* 131(4):535-538.
- Malhi RS, Eshleman JA, Greenberg JA, Weiss DA, Schultz Shook BA, Kaestle FA, Lorenz JG, Kemp BM, Johnson JR, and Smith DG. 2002. The structure of diversity within New World mitochondrial DNA haplogroups: implications for the prehistory of North America. *American journal of human genetics* 70(4):905-919.
- Marionneau S, Cailleau-Thomas A, Rocher J, Le Moullac-Vaidye B, Ruvoen N, Clement M, and Le Pendu J. 2001. ABH and Lewis histo-blood group antigens, a model for the meaning of oligosaccharide diversity in the face of a changing world. *Biochimie* 83(7):565-573.

- Merriwether DA, Rothhammer F, and Ferrell RE. 1995. Distribution of the four founding lineage haplotypes in Native Americans suggests a single wave of migration for the New World. *American journal of physical anthropology* 98(4):411-430.
- Mourant A. 1985. *Blood relations: blood groups and anthropology*. New York: Oxford University Press.
- Mourant AE, Kopec AC, and Domaniewska-Sobczak K. 1976. *The distribution of the human blood groups*: Oxford University Press.
- Mulligan CJ, Hunley K, Cole S, and Long JC. 2004. Population genetics, history, and health patterns in native americans. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 5:295-315.
- Mulligan CJ, Kitchen A, and Miyamoto MM. 2008. Updated three-stage model for the peopling of the Americas. *PLoS ONE* 3(9):e3199.
- Muschel LH. 1966. Blood groups, disease, and selection. *Bacteriological reviews* 30(2):427-441.
- Nei M, Maruyama T, and Chakraborty. 1975. The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution* 29:1-10.
- Nei M, and Li WH. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76(10):5269-5273.
- Ogasawara K, Bannai M, Saitou N, Yabe R, Nakata K, Takenaka M, Fujisawa K, Uchikawa M, Ishikawa Y, Juji T and others. 1996. Extensive polymorphism of ABO blood group gene: three major lineages of the alleles for the common ABO phenotypes. *Human genetics* 97(6):777-783.
- Olsson ML, and Chester MA. 1996a. Evidence for a new type of O allele at the ABO locus, due to a combination of the A2 nucleotide deletion and the Ael nucleotide insertion. *Vox sanguinis* 71(2):113-117.
- Olsson ML, and Chester MA. 1996b. Frequent occurrence of a variant O1 gene at the blood group ABO locus. *Vox sanguinis* 70(1):26-30.
- Olsson ML, Santos SE, Guerreiro JF, Zago MA, and Chester MA. 1998. Heterogeneity of the O alleles at the blood group ABO locus in Amerindians. *Vox sanguinis* 74(1):46-50.
- Pena SD, Santos FR, Bianchi NO, Bravi CM, Carnese FR, Rothhammer F, Gerelsaikhan T, Munkhtuja B, and Oyunsuren T. 1995. A major founder Y-chromosome haplotype in Amerindians. *Nature genetics* 11(1):15-16.
- Perego UA, Achilli A, Angerhofer N, Accetturo M, Pala M, Olivieri A, Kashani BH, Ritchie KH, Scozzari R, Kong QP and others. 2009. Distinctive Paleo-Indian migration routes from Beringia marked by two rare mtDNA haplogroups. *Curr Biol* 19(1):1-8.
- Pfeiffer H, Forster P, Ortmann C, and Brinkmann B. 2001. The results of an mtDNA study of 1,200 inhabitants of a German village in comparison to other Caucasian databases and its relevance for forensic casework. *International journal of legal medicine* 114(3):169-172.
- Picornell A, Gomez-Barbeito L, Tomas C, Castro JA, and Ramon MM. 2005. Mitochondrial DNA HVRI variation in Balearic populations. *American journal of physical anthropology* 128(1):119-130.
- Pinto F, Gonzalez AM, Hernandez M, Larruga JM, and Cabrera VM. 1996. Genetic relationship between the Canary Islanders and their African and Spanish ancestors inferred from mitochondrial DNA sequences. *Annals of human genetics* 60(Pt 4):321-330.

- Pitulko VV, Nikolsky PA, Giryay EY, Basilyan AE, Tumskoy VE, Koulakov SA, Astakhov SN, Pavlova EY, and Anisimov MA. 2004. The Yana RHS site: humans in the Arctic before the last glacial maximum. *Science (New York, NY)* 303(5654):52-56.
- Ramachandran S, Deshpande O, Roseman CC, Rosenberg NA, Feldman MW, and Cavalli-Sforza LL. 2005. Support from the relationship of genetic and geographic distance in human populations for a serial founder effect originating in Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(44):15942-15947.
- Rando JC, Cabrera VM, Larruga JM, Hernandez M, Gonzalez AM, Pinto F, and Bandelt HJ. 1999. Phylogeographic patterns of mtDNA reflecting the colonization of the Canary Islands. *Annals of human genetics* 63(Pt 5):413-428.
- Rangel-Villalobos H, Munoz-Valle JF, Gonzalez-Martin A, Gorostiza A, Magana MT, and Paez-Riberos LA. 2008. Genetic admixture, relatedness, and structure patterns among Mexican populations revealed by the Y-chromosome. *American journal of physical anthropology* 135(4):448-461.
- Reynolds J, Weir BS, and Cockerham CC. 1983. Estimation of the Coancestry Coefficient: Basis for a Short-Term Genetic Distance. *Genetics* 105(3):767-779.
- Rodriguez-Delfin LA, Rubin-de-Celis VE, and Zago MA. 2001. Genetic diversity in an Andean population from Peru and regional migration patterns of Amerindians in South America: data from Y chromosome and mitochondrial DNA. *Human heredity* 51(1-2):97-106.
- Rosenberg NA, Pritchard JK, Weber JL, Cann HM, Kidd KK, Zhivotovsky LA, and Feldman MW. 2002. Genetic structure of human populations. *Science (New York, NY)* 298(5602):2381-2385.
- Ross AH, Ubelaker DH, and Falsetti AB. 2002. Craniometric variation in the Americas. *Human biology; an international record of research* 74(6):807-818.
- Roubinet F, Despiau S, Calafell F, Jin F, Bertranpetit J, Saitou N, and Blancher A. 2004. Evolution of the O alleles of the human ABO blood group gene. *Transfusion* 44(5):707-715.
- Roubinet F, Kermarrec N, Despiau S, Apoil PA, Dugoujon JM, and Blancher A. 2001. Molecular polymorphism of O alleles in five populations of different ethnic origins. *Immunogenetics* 53(2):95-104.
- Rousset F, and Raymond M. 1995. Testing heterozygote excess and deficiency. *Genetics* 140(4):1413-1419.
- Rowe JA, Handel IG, Thera MA, Deans AM, Lyke KE, Kone A, Diallo DA, Raza A, Kai O, Marsh K and others. 2007. Blood group O protects against severe *Plasmodium falciparum* malaria through the mechanism of reduced rosetting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(44):17471-17476.
- Ruiz-Palacios GM, Cervantes LE, Ramos P, Chavez-Munguia B, and Newburg DS. 2003. *Campylobacter jejuni* binds intestinal H(O) antigen (Fuc alpha 1, 2Gal beta 1, 4GlcNAc), and fucosyloligosaccharides of human milk inhibit its binding and infection. *The Journal of biological chemistry* 278(16):14112-14120.
- Saitou N, and Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution* 4(4):406-425.

- Salas A, Richards M, De la Fe T, Lareu MV, Sobrino B, Sanchez-Diz P, Macaulay V, and Carracedo A. 2002. The making of the African mtDNA landscape. *American journal of human genetics* 71(5):1082-1111.
- Salzano FM. 2007. The prehistoric colonization of the Americas. In: Crawford MH, editor. *Anthropological Genetics, Theory Methods and Applications*. first edition ed. New York: Cambridge Academic Press. p 433-455.
- Salzano FM, and Callegari-Jacques SM. 2006. Amerindian and non-Amerindian autosome molecular variability: a test analysis. *Genetica* 126(1-2):237-242.
- Santos FR, Pandya A, Tyler-Smith C, Pena SD, Schanfield M, Leonard WR, Osipova L, Crawford MH, and Mitchell RJ. 1999. The central Siberian origin for native American Y chromosomes. *American journal of human genetics* 64(2):619-628.
- Santos FR, Rodriguez-Delfin L, Pena SD, Moore J, and Weiss KM. 1996. North and South Amerindians may have the same major founder Y chromosome haplotype. *American journal of human genetics* 58(6):1369-1370.
- Scurr T. 2004. The peopling of the New World: perspectives from molecular anthropology. *Ann Rev Anthropol* 33:551-583.
- Schroeder KB, Schurr TG, Long JC, Rosenberg NA, Crawford MH, Tarskaia LA, Osipova LP, Zhadanov SI, and Smith DG. 2007. A private allele ubiquitous in the Americas. *Biol Lett* 3(2):218-223.
- Schurr TG. 2004. The peopling of the New World: perspectives from molecular anthropology. . *Annu Rev Anthropol* 33:551-583.
- Schurr TG, Ballinger SW, Gan YY, Hodge JA, Merriwether DA, Lawrence DN, Knowler WC, Weiss KM, and Wallace DC. 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.
- Schurr TG, and Sherry ST. 2004. Mitochondrial DNA and Y chromosome diversity and the peopling of the Americas: evolutionary and demographic evidence. *Am J Hum Biol* 16(4):420-439.
- Seymour RM, Allan MJ, Pomiankowski A, and Gustafsson K. 2004. Evolution of the human ABO polymorphism by two complementary selective pressures. *Proceedings* 271(1543):1065-1072.
- Stone AC, and Stoneking M. 1998. mtDNA analysis of a prehistoric Oneota population: implications for the peopling of the New World. *American journal of human genetics* 62(5):1153-1170.
- Storry JR, and Olsson ML. 2009. The ABO blood group system revisited: a review and update. *Immunohematology* 25(2):48-59.
- Tajima F. 1983. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics* 105(2):437-460.
- Tajima F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123(3):585-595.
- Tamm E, Kivisild T, Reidla M, Metspalu M, Smith DG, Mulligan CJ, Bravi CM, Rickards O, Martinez-Labarga C, Khusnutdinova EK and others. 2007. Beringian standstill and spread of Native American founders. *PLoS ONE* 2(9):e829.
- Tarazona-Santos E, Carvalho-Silva DR, Pettener D, Luiselli D, De Stefano GF, Labarga CM, Rickards O, Tyler-Smith C, Pena SD, and Santos FR. 2001. Genetic differentiation in South Amerindians is related to environmental and

- cultural diversity: evidence from the Y chromosome. *American journal of human genetics* 68(6):1485-1496.
- Tarazona-Santos E, and Santos FR. 2002. The peopling of the Americas: a second major migration? *American journal of human genetics* 70(5):1377-1380; author reply 1380-1371.
- Torrioni A, Schurr TG, Cabell MF, Brown MD, Neel JV, Larsen M, Smith DG, Vullo CM, and Wallace DC. 1993. Asian affinities and continental radiation of the four founding Native American mtDNAs. *American journal of human genetics* 53(3):563-590.
- Torrioni A, Schurr TG, Yang CC, Szathmary EJ, Williams RC, Schanfield MS, Troup GA, Knowler WC, Lawrence DN, Weiss KM and others. 1992. Native American mitochondrial DNA analysis indicates that the Amerind and the Nadene populations were founded by two independent migrations. *Genetics* 130(1):153-162.
- Underhill PA, Jin L, Zeman R, Oefner PJ, and Cavalli-Sforza LL. 1996. A pre-Columbian Y chromosome-specific transition and its implications for human evolutionary history. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(1):196-200.
- Volodko NV, Starikovskaya EB, Mazunin IO, Eltsov NP, Naidenko PV, Wallace DC, and Sukernik RI. 2008. Mitochondrial genome diversity in arctic Siberians, with particular reference to the evolutionary history of Beringia and Pleistocenic peopling of the Americas. *American journal of human genetics* 82(5):1084-1100.
- Wang N, Zhou X, Tan FK, Foster MW, Arnett FC, and Chakraborty R. 2004. Genetic signatures of pre-expansion bottleneck in the Choctaw population of Oklahoma. *American journal of physical anthropology* 124(4):373-379.
- Wang S, Lewis CM, Jakobsson M, Ramachandran S, Ray N, Bedoya G, Rojas W, Parra MV, Molina JA, Gallo C and others. 2007. Genetic variation and population structure in native Americans. *PLoS Genet* 3(11):e185.
- Watkins WM. 1980. Biochemistry and Genetics of the ABO, Lewis, and P blood group systems. *Advances in human genetics* 10:1-136, 379-185.
- Weir BS. 1996. *Genetic data analysis II: methods for discrete population genetic data*. Sunderland, MA: Sinauer.
- Yamamoto F, Clausen H, White T, Marken J, and Hakomori S. 1990. Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. *Nature* 345(6272):229-233.
- Yamamoto F, McNeill PD, Yamamoto M, Hakomori S, Bromilow IM, and Duguid JK. 1993. Molecular genetic analysis of the ABO blood group system: 4. Another type of O allele. *Vox sanguinis* 64(3):175-178.
- Yang BC, Zeng JQ, Yu Q, Liang YL, Su YQ, and Deng ZH. 2007. Molecular polymorphism of O alleles in the Chinese Han population. *Ann Clin Lab Sci* 37(1):71-74.
- Yip SP. 2000. Single-tube multiplex PCR-SSCP analysis distinguishes 7 common ABO alleles and readily identifies new alleles. *Blood* 95(4):1487-1492.
- Yip SP. 2002. Sequence variation at the human ABO locus. *Annals of human genetics* 66(Pt 1):1-27.
- Yip SP, Choi PS, Lee SY, Leung KH, El-Zawahri MM, and Luqmani YA. 2006. ABO blood group in Kuwaitis: detailed allele frequency distribution and identification of novel alleles. *Transfusion* 46(5):773-779.

- Zazula GD, Froese DG, Schweger CE, Mathewes RW, Beaudoin AB, Telka AM, Harington CR, and Westgate JA. 2003. Palaeobotany: Ice-age steppe vegetation in east Beringia. *Nature* 423(6940):603.
- Zegura SL, Karafet TM, Zhivotovsky LA, and Hammer MF. 2004. High-resolution SNPs and microsatellite haplotypes point to a single, recent entry of Native American Y chromosomes into the Americas. *Molecular biology and evolution* 21(1):164-175.
- Zhivotovsky LA, Rosenberg NA, and Feldman MW. 2003. Features of evolution and expansion of modern humans, inferred from genomewide microsatellite markers. *American journal of human genetics* 72(5):1171-1186.

Apéndice 1

 WILEY InterScience®

[Home](#) / [Life Sciences](#) / [Biological Anthropology](#)

 **AJPA named one of the top 10 most influential journals of the century!**
-The Special Libraries Association

 **American Journal of Physical Anthropology**
Early View (Articles online in advance of print)
Published Online: 27 Oct 2009
Copyright © 2009 Wiley-Liss, Inc., A Wiley Company

- [Get Sample Copy](#)
- [Recommend to Your Librarian](#)
- [Save Journal to My Profile](#)
- [Set E-Mail Alert](#)
- [Email this page](#)
- [Print this page](#)
- [RSS web feed \(What is RSS?\)](#)

Published on behalf of
 American Association of Physical Anthropologists
[Go to Society Site](#)

• [Save Article to My Profile](#) • [Download Citation](#) • [Previous Abstract](#) | [Next Abstract](#) >

Abstract | [References](#) | [Full Text: PDF \(Size: 228K\)](#) | [Related Articles](#) | [Citation Tracking](#)

Research Article
Blood group O alleles in Native Americans: Implications in the peopling of the Americas
Benito Estrada-Mena ¹, F. Javier Estrada ², Raúl Ulloa-Arvizu ³, Miriam Guido ¹, Rocío Méndez ⁸, Ramón Coral ⁴, Thelma Canto ⁵, Julio Granados ^{2 6}, Rodrigo Rubí-Castellanos ⁷, Héctor Rangel-Villalobos ⁷, Alejandro García-Carrancá ^{1 8 *}

Blood Group O Alleles in Native Americans: Implications in the Peopling of the Americas

Benito Estrada-Mena,¹ F. Javier Estrada,² Raúl Ulloa-Arvizu,³ Miriam Guido,¹ Rocío Méndez,⁸ Ramón Coral,⁴ Thelma Canto,⁵ Julio Granados,^{2,6} Rodrigo Rubí-Castellanos,⁷ Héctor Rangel-Villalobos,⁷ and Alejandro García-Carrancá^{1,8*}

¹Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City, México

²Escuela de Medicina, Universidad Panamericana (UP), Mexico City, México

³Departamento de Genética y Bioestadística, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), UNAM, Mexico City, México

⁴Laboratorio Multidisciplinario, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional (IPN) y Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE), Mexico City, México

⁵Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi, Universidad Autónoma de Yucatán (UAY), Mérida, Yucatán, México

⁶Departamento de Inmunología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas Salvador Zubirán (INCMSZ), Secretaría de Salud (SSa), Mexico City, México

⁷Instituto de Investigación en Genética Molecular, Centro Universitario de la Ciénege-Universidad de Guadalajara (UCI-UdeG), Ocotlán, Jalisco, México

⁸Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, División de Investigación Básica, Instituto Nacional de Cancerología, (INCan), SSa, Mexico City, México

KEY WORDS genetic drift; founder effect; ABO; blood groups; Americas peopling; Native American populations

ABSTRACT All major ABO blood alleles are found in most populations worldwide, whereas the majority of Native Americans are nearly exclusively in the O group. O allele molecular characterization could aid in elucidating the possible causes of group O predominance in Native American populations. In this work, we studied exon 6 and 7 sequence diversity in 180 O blood group individuals from four different Mesoamerican populations. Additionally, a comparative analysis of genetic diversity and population structure including South American populations was performed. Results revealed no significant differences among Mesoamerican and South American groups, but showed significant differences within population groups attributable to previously detected differences in genetic drift and founder effects throughout the American continent. Interestingly, in all

American populations, the same set of haplotypes O¹, O^{1V}, and O^{1V(G542A)} was present, suggesting the following: (1) that they constitute the main genetic pool of the founding population of the Americas and (2) that they derive from the same ancestral source, partially supporting the single founding population hypothesis. In addition, the consistent and restricted presence of the G542A mutation in Native Americans compared to worldwide populations allows it to be employed as an Ancestry informative marker (AIM). Present knowledge of the peopling of the Americas allows the prediction of the way in which the G542A mutation could have emerged in Beringia, probably during the differentiation process of Asian lineages that gave rise to the founding population of the continent. *Am J Phys Anthropol* 142:85–94, 2010. © 2009 Wiley-Liss, Inc.

In contrast to the high diversity of their cultures and languages, contemporary Native American populations show a low level of genetic diversity. This pattern could have been formed from a population bottleneck of moderate intensity during or after the peopling of the Americas (Rosenberg et al., 2002; Zhivotovsky et al., 2003; Battilana et al., 2006). It is now widely accepted that the ancestors of Native Americans arrived from Asia via Beringia; however, the debate on timing, place(s) of origin, and number of waves of migration persists (Mulligan et al., 2004; Schurr, 2004; Goebel et al., 2008).

A three-wave migration theory has proposed that Amerind, Na-Dene, and Aleut-Eskimo are language families that represent three separate migrations to America that occurred in this order (Greenberg et al., 1986). This theory has received support from early analysis of ABO blood groups, mitochondrial DNA (mtDNA), and several autosomal markers (Torrioni et al., 1993; Cavalli-Sforza

et al., 1994). Although the three-wave theory has been criticized, mainly for claiming the existence of a linguis-

Grant sponsor: PAPIIT (PAPIIT, UNAM); Grant number: IN212895; Grant sponsor: The Third World Academy of Sciences (TWAS).

*Correspondence to: Alejandro García-Carrancá, PhD, Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, Instituto Nacional de Cancerología, Av. San Fernando No. 22, Col. Sección XVI, Tlalpan, 14080 México, D.F., México. E-mail: carranca@biomedicas.unam.mx

Received 26 November 2008; accepted 25 August 2009

DOI 10.1002/ajpa.21204

Published online 27 October 2009 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

tic unity of the Amerind family, this theory has been the reference hypothesis over the past two decades against which new genetic data are compared (Bolnick et al., 2004; Schurr, 2004; González-José et al., 2008).

The majority of contemporary Native American populations exhibit five different mtDNA (A, B, C, D, and X) and two Y chromosome (C and Q) founding haplogroups. Although earlier studies of both mtDNA and Y chromosome suggested multiple migrations to the Americas, more recently scientists advocate that both sets of data are consistent with the single migration model (Schurr et al., 1990; Torroni et al., 1992; Merriwether et al., 1995; Bonatto and Salzano, 1997; Zegura et al., 2004; Tamm et al., 2007; Achilli et al., 2008; Fagundes et al., 2008b; Goebel et al., 2008). A unique allele at autosomal microsatellite locus D9S1120 is present in all Native American populations studied, including Na-Dene and Aleut-Eskimo, and in related western Beringian groups (Schroeder et al., 2007). Such a distribution is best explained by assuming that the same founding population contributed to all modern Native American populations (Zhitovskiy et al., 2003; Schroeder et al., 2007; Wang et al., 2007).

The molecular basis of the ABO blood groups has been well established (Yamamoto et al., 1990). This locus exhibits three major alleles: A, B and O. A and B alleles encode glycosyltransferases that either add *N*-acetylgalactosamine or galactose to various glycoconjugates to form A and B antigens. Both alleles differ from each other by seven nucleotide positions, resulting in four amino acid substitutions in the corresponding glycosyltransferases. On the other hand, several O alleles encoding inactive -usually truncated- enzymes have been described; the two most frequent are O¹ (O01) and O^{1v} (O02). These alleles differ in exons 6 and 7 by nine nucleotide substitutions and exhibit a point deletion in exon 6 (G261-) (Chester and Olsson, 2001). Such common deletion induces a frame shift that creates a premature stop codon (nucleotides 352–354), resulting in a truncated (117- amino-acid) protein that is enzymatically inactive. Other variants of O¹ and O^{1v} alleles that differ by a few point mutations have been described (Yamamoto et al., 1993; Olsson and Chester, 1996a). In addition, rare O alleles which do not contain the G261 deletion have been described, including a silent O allele (O2 or O03) observed only in Europeans and at low frequencies in sub-Saharan Africans (Yip, 2000; Grunnet et al., 1994; Yamamoto et al., 1993) and alleles O3 (or O08), O4, and O5, which also display inactivating mutations (Yamamoto et al., 1990; Chester and Olsson, 2001).

Although blood group ABO polymorphisms are distributed worldwide, they exhibit remarkable variations in their frequencies among different populations. Surprisingly, the O allele, although not functional, is the most abundant, ranging from 61% to 98%. The geographical distribution of ABO alleles is remarkably different in the Americas with respect to other parts of the world. In North America, Na-Dene populations have A and O blood groups, whereas Eskimo populations have A, B, and O blood groups (Cavalli-Sforza et al., 1994). In contrast, phenotypic studies of ABO blood groups have revealed that all other Native American populations from North, Central, and South America belong nearly exclusively to the O group (Mourant et al., 1976; Lisker, 1981).

Three hypotheses have been proposed to explain the high frequency of O blood type in Native Americans. First, a founder effect occurred during the initial peopling of the Americas. Second, natural selection of the O

blood group is associated with infectious diseases. O individuals are more resistant to infectious agents that utilize the A and B antigens as receptors and produce anti-A and anti-B antibodies, which potentially protect them against infectious agents expressing A and B motifs (Mourant, 1985; Cavalli-Sforza et al., 1994). Third, genetic drift related to population-size reduction as a consequence of European contact. Evidence from archaeological and historical studies indicate that European contact and colonialism led to significant indigenous population decline (Cook and Borah, 1971; Ramenovsky, 1987; Mulligan et al., 2004; Seymour et al., 2004; Halverson and Bolnick, 2008).

The aim of this study was to characterize the diversity and distribution of molecular polymorphisms of O alleles among several Native American groups from Mesoamerica and to compare these with other indigenous populations from America. Proposals are discussed based on the entire analysis in an attempt to provide additional evidence on the events involved during the peopling of the Americas that gave rise to the contemporary diversity of ABO alleles among Native American populations.

MATERIALS AND METHODS

Allele nomenclature

Major blood group O alleles were named according to the unofficial nomenclature of Olsson and Chester (Olsson and Chester, 1996b) followed when useful, by alternative names conferred by other authors in parentheses (Roubinet et al., 2004).

Sample collection and blood group serology

Blood samples were collected in EDTA from 180 unrelated Mesoamerican individuals of phenotype O, including 37 Nahuas from Guerrero, 50 Mazahuas from the State of Mexico, 50 Mayas from Yucatán, and 43 Mexican-Mestizos from Mexico City (see Fig. 1). The ABO blood type was confirmed by serological methods using anti-A, anti-B, and anti-AB antibodies, according to the manufacturer's instructions (Immucor Gamma). Mexican-Mestizos with phenotype A were used as controls.

All individuals participated voluntarily and informed written consent was obtained prior to the collection of each blood sample. This research received ethical approval from the Bioethics Committee of the Biomedical Research Institute at the National Autonomous University of Mexico. To perform a comparative analysis of genetic diversity and population structure, we used previously reported data on O alleles from 301 South American individuals from nine populations (see Fig. 1).

For DNA analysis, we obtained a dataset with O allele sequences from exons 6 and 7 from Cayapas from Ecuador (35 individuals) and Aymaras from Bolivia (63 individuals) reported previously (Roubinet et al., 2001). For additional comparative analysis, frequencies of O¹, O^{1v}, and O^{1v(G542A)} alleles from RFLP-PCR assays were compiled from the following groups: Arara (*n* = 15), Kayapo (*n* = 16), and Yanomama (*n* = 17) from the Amazon region of Brazil (a total of 48 individuals) (Chester and Olsson et al., 2001); 62 Parakana Indians (Yupi tribe) from Brazil (Barjas-Castro et al., 2003), and Chilean subjects from Aymara (*n* = 84), Huilliche (*n* = 75), and Santiago (Mestizo) populations (*n* = 82) (Llop et al., 2006) (see Fig. 1). In addition, people from the Asian



Fig. 1. Geographical location of Mesoamerican populations studied herein, including those previously reported South American populations used for comparison.

populations of Japan ($n = 278$), China ($n = 80$), and Korea ($n = 141$) were included for some analyses (Chester and Olsson, 2001), as properly indicated in the text.

DNA preparation, amplification of exons 6 and 7, and sequencing

Genomic DNA was prepared from peripheral blood leukocytes using proteinase K (Roche Diagnostics, Meylan, France), followed by phenol-chloroform extraction. PCR amplifications were performed in a final volume of 50 μ l containing the following: 50 mM MgCl₂, 1.5 μ l; 2 mM dNTPs 5 μ l; 2 U of Taq Polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA); 200-300 ng of genomic DNA, and 1 μ M final for each primer. Pairs of primers ABO-1/2 and -3/8 were employed for amplification of exons 6 and 7, respectively, according to Ogasawara et al. (1996). The authors targeted ABO 187-bp (exon 6) and 737-bp (exon 7) genomic fragments. Amplicons were analyzed in 2.0% agarose gels and subsequently purified according to the manufacturer's instructions (QIAGEN Qiaquick gel extraction kit). Amplified products were directly sequenced applying the Big Dye Terminator cycle sequencing kit into the ABI Prism 310 genetic analyzer, according to the manufacturer's instructions (Applied Biosystems). Direct sequencing of amplified products produced sequences of exon 6 and exon 7 of 180 individuals with O phenotype. Mutations were confirmed by sequencing both sense and antisense strands. Characterization of the different O alleles was confirmed by RFLP-PCR with MboI (646 nt), DdeI (771 nt), and NheI (542 nt) restriction enzymes (Olsson et al., 1998).

Sequence analysis

After editing exon 6 and exon 7 sequences, a dataset of sequences with 826 bases was constructed. Because of different substitution rates between O allele transition and transversion, sequence data were analyzed utilizing distances corrected for multiple hits by the two-parameter model of Kimura (Kimura, 1980). Using this distance, we estimated nucleotide diversity within (π_i) and between (π_{ij}) populations. Exact tests were performed in order to evaluate the pairwise population differentiation (Rousset and Raymond, 1995). From a normalized π_{ij} matrix, a Multidimensional scaling (MDS) plot was generated using SPSS software version 10.0 for Windows. After defining Mesoamerican and South American groups, we conducted a hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA), allowing partitioning of total genetic variance within and among populations. Variance components were then employed to compute fixation indexes and their significance was tested using a non-parametric permutation approach (Excoffier et al., 1992). All computations were carried out using the AMOVA test implemented in the ARLEQUIN 3.11 package (Excoffier et al., 2005). To evaluate the relationship among haplotypes, a median joining network was performed with a free phylogenetic Network software (<http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm>) (Bandelt et al., 1999).

Furthermore, to compare Mesoamerican data with those from South America (analyzed by RFLP-PCR), unbiased estimates were calculated for expectations of Hardy-Weinberg equilibrium (H_E), observed heterozygosity (H_O), and fixation index ($F = (H_E - H_O)/H_E$); only Native American populations with available genotype distribution were included for this purpose. A Markov Chain test was used to evaluate Hardy-Weinberg equilibrium (Guo and Thompson, 1992); if F index value was positive, a deficit or excess of heterozygosity hypothesis was tested by population. This test is more powerful than the general Hardy-Weinberg equilibrium (Rousset and Raymond, 1995). With population frequencies of the three predominant O alleles/haplotypes observed in Native American populations (O^I , O^{IV} , and $O^{IV(G542A)}$), coancestry coefficient was calculated with available data on American and Asian populations (Reynolds et al., 1983) using the Genetic Data Analysis (GDA) program version 1.1 (Lewis and Zaykin, 2001). This genetic distance was preferred because genetic drift is assumed to be the main factor acting in genetic differentiation among closely related populations or for short-term evolution (Reynolds et al., 1983; Weir 1996). We computed an unrooted tree from the coancestry coefficient using Neighbour-Joining (NJ) methodology (Saitou and Nei, 1987). In this case, NJ tree was preferred because it allowed us to include additional populations without overlap regarding the population's names. To investigate whether Isolation-by-distance (IBD) could explain genetic differentiation among Native American groups, the correlation between genetic and geographic distances among these populations were checked. Assuming there was a single source for Native American populations, the serial funding model predicts a linear decline of genetic diversity from the source location (Ramachandran et al., 2005; Wang et al., 2007). Thus, we evaluated whether heterozygosity diminishes when distance with respect to geographic origin of Native American ancestors (presumably Beringia) is increased. The statistical significance of

TABLE 1. Nucleotide sequence variation in exons 6 and 7 of O haplotypes observed in Native American populations

Hp	Allele/position	E6			E7					
		261	297	498	538	542	646	681	771	829
1	A1	G	A	C	C	G	T	G	C	G
	O1v	-	G	*	*	*	A	A	T	A
2	O1v542	-	G	*	*	A	A	A	T	A
3	O1	-	*	*	*	*	*	*	*	*
4	O05	-	G	*	*	*	*	*	*	*
5	Ov7	-	G	*	*	*	A	*	T	A
6	O32	-	G	*	T	*	A	A	T	A
7	O33	-	G	T	*	*	A	A	T	A

Base changes shown with reference to the A1 sequence.

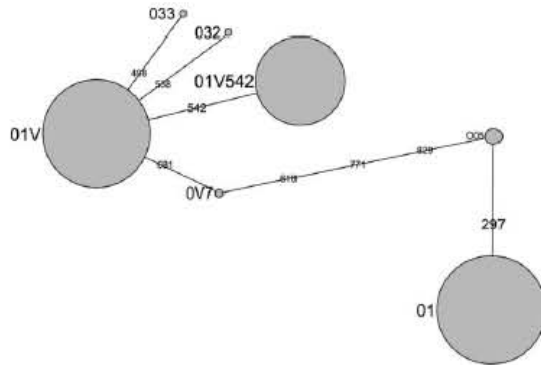


Fig. 2. Network joining tree of the seven O haplotypes observed in Native American populations from Mesoamerica and South America. The size of the circles is related to the frequency of the haplotype in the studied populations.

these correlations was evaluated by the Mantel test. Distances in kilometers between populations were computed employing geographic coordinates with the Great Circle Calculator program (<http://www.gb3pi.org.uk/great.html>). Finally, the Tajima D test was performed, and significant *P* values were estimated for Native American populations with available sequence data for exons 6 and 7.

RESULTS

Direct sequences from exon 6 and exon 7 amplicons of the ABO gene from 37 Nahua, 50 Mazahua, 50 Mayan, and 43 Mexican-Mestizo individuals were obtained. All subjects included in the present study were blood group O and homozygous for the G261 deletion, which is characteristic of the O¹ (O01) and O^{1v} (O02) alleles. Sequence variation of haplotypes found in Native American populations is shown in Table 1. A total of four different haplotypes were found in Mesoamerican populations (Hp 1-4). Each haplotype was attributed to a particular O allele (such as O1, O1v, and others) using the relevant positions in exon 6 and exon 7 as defined by Roubinet et al. (2004). Mutational events connecting these haplotypes and their frequencies, represented by circle size, are presented in a network-joining tree (see Fig. 2). The three haplotypes, i.e., O¹, O^{1v}, and O^{1v(G542A)} (O11), accounted for the majority of the sequences. One rare haplotype was found as well (O05). In agreement with previous reports, the G542A mutation was exclusively

associated with the O^{1v} allele in these four Mexican populations.

Table 2 depicts haplotype frequencies, haplotype diversity, and nucleotide diversity for Mesoamerican populations, together with previously studied Cayapa and Aymara populations from South America. The most frequent haplotype found in these populations was the O^{1v} haplotype, except in the Cayapas from Ecuador, where haplotype O¹ was predominant (51.4%). All Native American populations studied had the O^{1v(G542A)} haplotype, while the frequency of the O^{1v(G542A)} haplotype was higher in Mesoamerican than in South American populations, yet another four haplotypes were detected at low frequencies. The O05 haplotype was observed in Nahua, Maya, and Cayapa populations; the O^{v7} haplotype was only present in Cayapas, while O32 and O33 haplotypes were detected in Aymara population from Bolivia (Table 2).

Haplotype diversity (*H*) was higher in the four Mesoamerican populations (*H* > 0.60) than in the two South American populations (*H* < 0.60). Conversely, nucleotide diversity within population (π_i) was higher in Cayapas, followed by Mestizos and Mazahuas; with the lowest values observed in Nahuas and Mayas (Table 2). For nucleotide diversity between populations (π_{ij}), higher values were obtained between Cayapa and Maya ($\pi_{ij} = 0.197$) and between Cayapa and Nahua populations ($\pi_{ij} = 0.184$), while lowest values were both between Mazahua and Mestizo as well as between Nahua and Maya populations ($\pi_{ij} = 0$). Nucleotide diversity values between Cayapa and all other populations were significant (Table 3). Among Native Mesoamerican populations, Maya was different from Mazahua and Mestizo populations (*P* < 0.05), while Nahua was only different from Mestizo populations (*P* < 0.05). This differentiation pattern was represented in a MDS plot (Fig. 3A). Interestingly, the Bolivian Aymara was close to Mesoamerican populations, whereas Cayapa was the most differentiated population. The aforementioned exceptional characteristics of the Cayapas regarding the remaining Native American populations could involve different processes as follows: (a) founder effects and/or genetic drift as described in Amerindian groups (Wang et al., 2007); (b) European admixture, and (c) population sampling bias (e.g., undetected inbreeding). Although we were unable to discard any of these explanations, they did present the highest nucleotide diversity (π_i), a number of different haplotypes, and genetic differentiation (π_{ij} and *P* values) with respect to Native American populations (Tables 2 and 3) (Fig. 3A and 3B), favoring the European admixture proposal.

Analysis of molecular variance (AMOVA) revealed the variability supplied by the O haplotypes among subjects

TABLE 2. Sequence diversity parameters in Native American O alleles

Haplotype	Nahua	Mazahua	Maya	Mexican Mestizo	Cayapa	Aymara Bol
O1v	0.554	0.400	0.520	0.477	0.4140	0.595
O1v542	0.243	0.280	0.280	0.163	0.0429	0.119
O1	0.203	0.320	0.180	0.360	0.5140	0.27
O05	0	0	0.020	0	0.0143	0
Ov7	0	0	0	0	0.0143	0
O32	0	0	0	0	0	0.008
O33	0	0	0	0	0	0.008
N	74	100	100	86	70	126
Nh	3	3	4	3	5	5
H	0.6009	0.6659	0.6246	0.6235	0.5698	0.563
$\pi_s (\times 10^{-3})$	2.435	3.154	2.419	3.158	3.16	2.718

Hp, Haplotype; N, number of chromosomes; Nh, number of haplotypes; H, haplotypic diversity.

TABLE 3. Pairwise nucleotide diversity (π_{ij}) (below diagonal) and their P values (above diagonal) among Native American populations

	Nahua	Mazahua	Maya	Mestizo	Cayapa	Aymara Bol
Nahua		0.135	0.973	0.018	0.000	0.207
Mazahua	0.020		0.045	0.405	0.000	0.126
Maya	-0.011	0.023		0.018	0.000	0.126
Mestizo	0.044	-0.002	0.051		0.027	0.108
Cayapa	0.184	0.079	0.197	0.040		0.000
Aymara B	0.007	0.007	0.015	0.008	0.109	

Parameters according to the Kimura model.

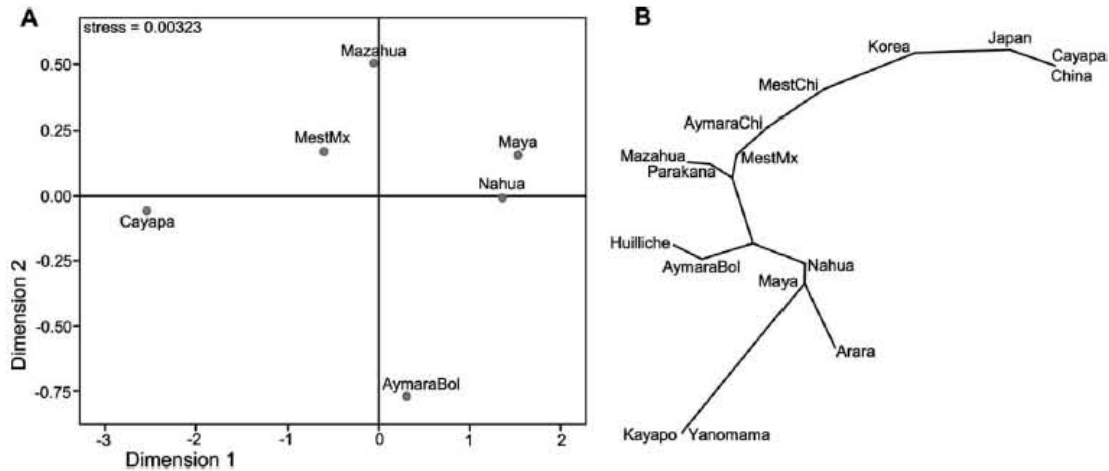


Fig. 3. A: Multidimensional scaling plot based on pairwise nucleotide diversity (π_{ij}) among Native American populations; B: Neighbor-joining tree between 13 American and three Asian populations based on the three predominant O haplotypes in Native Americans.

in Mesoamerica populations ($F_{IT} = 12.1\%$; $P = 0.033$); the majority of this variability represents differentiation among individuals within populations ($F_{IT} = 10.4\%$; $P = 0.059$). When the two South American populations were included as a second group in the AMOVA test, the majority of the genetic variation was within populations ($F_{IT} = 13.2\%$; $P = 0.01$), with low and non-significant differentiation resulting among these regions ($F_{CT} = 0.4\%$; $P = 0.264$). Although most of this variability represents differences among individuals within populations ($F_{IS} = 8.7\%$; $P = 0.062$), Mesoamerican and South Amer-

ican groups displayed significant differentiation within populations ($F_{SC} = 0.046$; $P = 0.001$).

Table 4 shows gene diversity (H_E), and fixation index (F_{IS}) of O alleles for Mesoamerican populations, together with South American populations with available genotypes previously obtained by RFLP-PCR. As displayed by haplotype diversity (H), genetic diversity (H_E) was higher in Mesoamerican than in South American populations. Mazahuas and Mestizos exhibited the highest values in genetic diversity ($H_E = 0.62$), whereas the Huilliches presented the lowest values ($H_E = 0.46$). Some

TABLE 4. Genetic diversity (H_E), fixation index (F_{IS}) and P values based on O allele frequencies of nine Native American populations

Population	n	H_E	F_{IS}	P value
Nahua	37	0.586	0.180	0.04
Mazahua	50	0.621	-0.117	0.12
Maya	50	0.601	-0.047	0.30
Mestizo	43	0.618	0.202	0.02
Amazonian	48	0.543	-0.144	0.18
Aymara c	84	0.585	-0.119	0.05
Huilliche	75	0.462	0.084	0.38
Cayapa	35	0.537	0.082	0.38
Aymara Bol	63	0.544	-0.051	0.64

n , number of individuals.

populations showed an excess of homozygotes (positive F_{IS} values), while others exhibited a deficit in homozygotes (negative F_{IS} values). However, all groups with homozygote deficit were within Hardy-Weinberg equilibrium ($P > 0.05$), whereas Nahuas and Mexican Mestizo groups demonstrated a significant excess of homozygotes ($P \leq 0.05$).

For comparative purposes, the distribution of the three predominant O alleles/haplotypes observed in Native Americans (O^1 , O^{1v} , and $O^{1v(G542A)}$) is graphically presented in a total of 13 American and three Asian populations (see Fig. 4). It was particularly noteworthy that haplotype $O^{1v(G542A)}$ was exclusively observed in American but not in Asian populations, ranging from 0.042-0.56 in the Cayapa and Yanomama tribes, respectively. Among American populations, the highest frequency of haplotype O^1 was observed in Cayapas (0.53), followed by Chilean Mestizos from Santiago (0.40) and Mexican Mestizos (0.36). Conversely, the lowest frequency of O^1 was observed in the Araras (0.03), followed by the Yanomama (0.09). Finally, the highest frequency of haplotype O^{1v} was observed in the Huilliches from Chile (0.7) as well as in the Araras from Brazil (0.67) (see Fig. 4).

Population data from Figure 4 were used to construct a NJ dendrogram based on coancestry coefficient distances (Fig. 3B). The NJ tree displayed a broad landscape of genetic relationships among 16 populations based exclusively on three O alleles/haplotypes (O^1 , O^{1v} , and $O^{1v(G542A)}$). Thus, care must be taken in terms of making extensive inferences about the origin and evolution regarding such populations. Finally, correlation between genetic and geographic distance was not significant among Native American populations. Although the Mantel test was repeated eliminating the Cayapa group, considering this was the most differentiated-and probably admixed- group, no significant correlation was established between genetic and geographical distances ($P > 0.05$). The correlation test was repeated only with South American populations (without Cayapas), rendering a slight correlation ($r^2 = 0.2857$; $P = 0.047$), which does not support the IBD model. Similarly, linear decline of genetic diversity of O haplotypes with geographic distance from the source location (Beringia) was not significant ($p > 0.05$). Finally, Tajima D for testing possible selection scenarios concerning O haplotypes in six Native American populations rendered positive, but non-significant, values (data not shown).

DISCUSSION

The first recognized human polymorphisms were described among the ABO blood groups (Landsteiner,

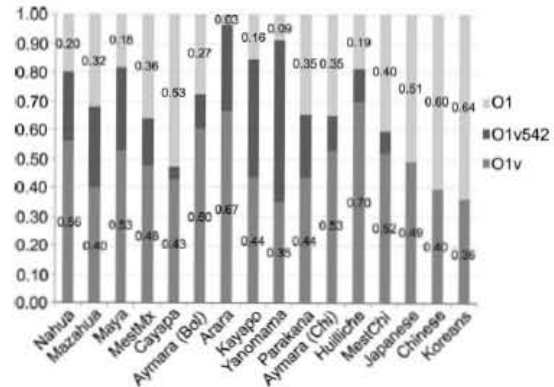


Fig. 4. Allele distribution in 13 American and three Asian populations of the three predominant O haplotypes found in Native American populations (O^1 , O^{1v} , and $O^{1v(G542A)}$).

1901). Although this still constitutes the most important blood system in transfusion and transplantation practices, ABO blood groups were first used for anthropological purposes and showed wide variations among individuals of different ethnic origins (Hirsfeld and Hirsfeld, 1919). Since the elucidation of the molecular basis of ABO genotypes, genetic polymorphisms of this locus have been extensively researched at the nucleotide level, demonstrating the existence of several O alleles among different populations of the world (Chester and Olsson, 2001; Yip, 2002).

To our knowledge, the present work provides the first report of O allele molecular polymorphisms among Native Americans from Mesoamerica (Mexico). Analysis of sequences from exons 6 and 7 from O alleles showed that all the studied populations present the O^1 (O01) and the O^{1v} (O02) haplotypes. In agreement with previous reports on Native Americans from South America, the frequencies of the haplotype O^{1v} obtained in this study are higher than those of haplotype O^1 (except for those of the Cayapa group, see Fig. 4) in contrast to those of worldwide populations (Olsson et al., 1998; Chester and Olsson, 2001; Roubinet et al., 2001; Barjas-Castro et al., 2003; Roubinet et al., 2004; Llop et al., 2006).

The $O^{1v(G542A)}$ haplotype was found in both Mesoamerican and South American populations (see Fig. 4). The constant presence of G542A mutation in all Native American populations supports the employment of G542A as the Ancestry informative marker (AIM) related with the Native American component. However, its presence requires testing in at least European and African populations to confirm and/or determine its value as the AIM for studying admixed populations.

We must consider that occasionally, the $O^{1v(G542A)}$ allele has been reported in certain European and Middle Eastern persons (Olsson et al., 1998; Yip, 2000; Yip et al., 2006). Two main possibilities explain this observation: Gene flow, and recurrent mutation. Regarding the first possibility, there are several examples of Native American genetic flow into Europe, most probably mediated through individuals of admixed ancestry (e.g., Hispanic or Latin American populations). The best evidence probably stems from deeper inspection of published

mtDNA sequences. In fact, Native American lineages A2, C1, and D1 can be easily recognized in several populations across the continent, as attested by the different reports from Europe (Pinto et al., 1996; Rando et al., 1999; Crespillo et al., 2000; Helgason et al., 2000; Pfeiffer et al., 2001; Behar et al., 2004; Picornell et al., 2005). Examples of Native American mtDNA introgression are also available for a few African populations (Salas et al., 2002; Jackson et al., 2005). Although we have no specific examples of gene flow of Native American alleles via Latin Americans in Middle Eastern populations, it is important to note the absence or low frequency of the G542A in the Middle East (e.g., Kuwait <1%) and no reports of this mutation in a variety of Asian populations (Kang et al., 1997; Ogasawara et al., 1996; Yip, 2000; Roubinet et al., 2004; Yip et al., 2006; Yang et al., 2007). Taken together, the probability that recurrent mutations could explain the irregular and occasional presence of G542A in Europe and the Middle East appears negligible, whereas it is more plausible that G542A has been dispersed throughout the world via Latin American gene flow.

Regarding the origin of $O^{1v(G542A)}$, this haplotype displayed a close relationship (one-step mutation) with O^{1v} (see Fig. 2), the most frequent haplotype in the majority of Native Americans. This fact supports that the G542A mutation originated in the O^{1v} haplotype, which occurs very frequently in Asian populations (Ogasawara et al., 1996; Kang et al., 1997; Yip, 2000; Roubinet et al., 2004; Yip et al., 2006; Yang et al., 2007). Recent evidence, primarily from mtDNA concerning the peopling of the Americas (Tamm et al., 2007; Fagundes et al., 2008; Mulligan et al., 2008) allows us to infer that such mutation could have occurred during one of the following moments: (i) in Asian ancestors of Native Americans prior to reaching Beringia; (ii) during the time when Native American ancestors paused in Beringia, or (iii) during the population expansion to the Americas toward the end of the last glacial maximum (LGM), (18,000–15,000 Years before the present (ybp). As mentioned previously, to our knowledge, the $O^{1v(G542A)}$ haplotype has been persistently and (almost) exclusively found in Native American, and not Asian, populations (see Fig. 4), such a finding does not support that the G542A mutation arose in Asian ancestors before arriving to Beringia. On the other hand, if this mutation arose during the population expansion, it would be difficult to explain the wide distribution of the $O^{1v(G542A)}$ haplotype throughout the entirety of Native American populations studied to date. As a result, it appears more plausible that the G542A mutation took place in Beringia, according to the Beringian incubation model (BIM), which suggests that Asian migrants were isolated for an extended period of time prior to entering the Americas giving rise to founder lineages differentiated from Asian subclades in Native American ancestors (Tamm et al., 2007). The exclusive presence of the $O^{1v(G542A)}$ haplotype in Beringia and its absence in Asian populations (e.g., Central Asia) would be a substantial contribution to the BIM from the O blood group perspective.

The geographic distribution of the ABO blood groups is rather complex in the Americas. In North America, Eskimo populations have A, B, and O blood groups, whereas Na-Dene and other populations have A and O blood groups, and all other Native American populations from North, Central, and South America belong nearly exclusively to group O (Cavalli-Sforza et al., 1994). How

can such different geographical distributions of ABO alleles be explained? Regarding this matter, two useful working hypotheses concerning the peopling of the Americas were observed: (i) the classic three-wave model proposed by Greenberg et al., (1986), and (ii) the recent three-stage model that accentuates a single origin (Fagundes et al., 2008a; Mulligan et al., 2008; Perego et al., 2009). However, there is general agreement that Eskimo-Aleuts and Na-Dene Indians represent the last significant population expansion in the New World (Shurr and Sherry, 2004; Tamm et al., 2007; González-José et al., 2008; Volodko et al., 2008). Thus, the emergence of circumartic groups will not be addressed here.

Phylogeographic distribution of autosomal private allele D9S1120 and of Y-chromosomal and mitochondrial variants ubiquitous to the Americas suggests that all contemporary Native Americans are descended from a common founding population (Zegura et al., 2004; Schroeder et al., 2007; Tamm et al., 2007; Wang et al., 2007; González-José et al., 2008; Kitchen et al., 2008; Dillehay 2009). Similarly, distribution of O alleles among all Native American and Mestizo populations (see Fig. 4) suggests that O^{1v} , $O^{1v(G542A)}$, and O^1 alleles are part of the original ABO genetic pool present among the first Native Americans. This consistent presence of all three O haplotypes in Native American groups in both Mesoamerican and South American regions is in agreement with the single founding population hypothesis. On the contrary, absence of predominant lineages shared among Native populations from Mesoamerica and South America, which was not observed, would support multiple migration models. In addition, although wide distribution of the same three O haplotypes throughout America does not allow us to discard specific hypotheses concerning the peopling of the Americas, it is in agreement with the strong population expansion toward the end of the Last glacial maximum (LGM), indicating a rapid settlement of the New World, presumably along the Pacific coastal route (Fagundes et al., 2008; Kitchen et al., 2008; Mulligan et al., 2008). As described, our results partially support recent proposals concerning the peopling of the New World; however, O haplotypes must be obtained from Asian and American Native populations (especially Siberia and North America, respectively) to confirm these hypotheses from the O group scenario.

Native Americans from Central and South America (and some from North America) are unique in having nearly lost the A and B alleles completely. Three hypotheses have been proposed to explain the high frequency of blood type O. First, a founder effect occurred during the initial peopling of the Americas; second, natural selection of the O blood group associated with some selective advantage not yet identified, and third, genetic drift related with European contact-associated population decline. In a recent study, the ABO frequencies observed between precontact and extant Native Americans from the same region were not significantly different, suggesting that events following European contact did not alter the ABO diversity pattern (Halverson and Bolnick, 2008). However, this statement should be confirmed in different regions of the continent to discard alternative hypothesis. Regarding natural selection, the fact that haplotypes O^1 and O^{1v} both constitute null alleles and, in principle have identical selective values, supports the notion that chance (e.g., founder effect and random genetic drift) could be responsible for both the predominance of O^{1v} haplotypes and the O group fixation. In

agreement with this inference, nonsignificant Tajima D values were obtained in all the populations studied herein. Even if genetic drift was responsible for (near) fixation of the O group in American populations, it is difficult to definitively exclude the effect of natural selection with the data available from this study.

Genetic structure analysis (AMOVA) for Native American populations displayed non-significant differences between Mesoamerica and South America. However, differentiation among populations into groups was observed. This result could involve differential patterns of genetic drift and gene flow prior to European contact, as previously inferred with mtDNA, Y-chromosome, and autosomal Short tandem repeats (STR) analysis, both in South America (Rodríguez-Delfin et al., 2001; Tarazona-Santos et al., 2001) and in Mesoamerica (Wang et al., 2007; Rangel-Villalobos et al., 2008). However, admixture bias by post-European contact not should be disregarded, because the former has been detected and/or inferred in Cayapas (this study) and in Mesoamerican populations (Lisker et al., 1996; Bonilla et al., 2005).

For Mesoamerican and South American populations, consistent correlation was not found between (i) genetic distances and geographic distances and (ii) linear decline of genetic diversity with geographic distance from the presumably Native American source in Beringia. This relates to distribution of the private Native American allele at locus D9S1120, which deviates from the genome-wide pattern and does not show a north-to-south frequency gradient (Wang et al., 2007). Such distributions are most easily explained by the spatial diffusion of initially rare variants during the peopling of the Americas, rather than by natural selection throughout the continent. Lack of support for the IBD model has been obtained in Mesoamerican populations with Y-linked markers, suggesting a complex scenario influenced by elevated gene flow between Native American populations in certain regions and in particular demographic histories (Rangel-Villalobos et al., 2008), as has also been described for South American populations (Rodríguez-Delfin et al., 2001; Tarazona-Santos et al., 2001; Wang et al., 2007).

CONCLUSIONS

Frequency distribution of the same haplotypes, i.e., O¹, O^{1v}, and O^{1v(G542A)}, both in Mesoamerican and South American populations suggest that (1) these constitute the main genetic pool of the first Native American populations, and (2) they derive from the same ancestral source, partially supporting the single founding population. The consistent and restricted presence of the G542A mutation in Native Americans allows it to be used as an Ancestry informative marker (AIM). Present knowledge of the peopling of the Americas may suggest that G542A could have emerged in Beringia during the differentiation of Asian lineages that gave rise to the founding population of the Americas. Further studies of ABO sequence variation, including North American and North Asian populations (e.g., Siberia), are needed to confirm such observation.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. Claudio Bravi, the editors, and anonymous reviewers, for their useful comments and suggestions, Elizabeth Langley for grammar review of

the manuscript, as well as all the persons who generously donated their blood samples to make this study possible. Finally, the authors thank CONACyT-México for the fellowship granted to BEM.

LITERATURE CITED

- Achilli A, Perego UA, Bravi CM, Coble MD, Kong QP, Woodward SR, Salas A, Torroni A, Bandelt HJ. 2008. The phylogeny of the four pan-American mtDNA haplogroups: implications for evolutionary and disease studies. *PLoS ONE* 3:e1764.
- Bandelt HJ, Forster P, Rohl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16:37–48.
- Barjas-Castro ML, Soares MC, Menezes RC, Carvalho MH, Costa FF, Saad ST. 2003. ABO blood group in Amerindians from Brazilian Amazon. *Ann Hum Biol* 30:220–224.
- Battilana J, Fagundes NJ, Heller AH, Goldani A, Freitas LB, Tarazona-Santos E, Munkhbat B, Munkhtuvshin N, Krylov M, Benevolenskaia L, Arnett FC, Batzer MA, Deininger PL, Salzano FM, Bonatto SL. 2006. Alu insertion polymorphisms in Native Americans and related Asian populations. *Ann Hum Biol* 33:142–160.
- Behar DM, Hammer MF, Garrigan D, Villemers R, Bonne-Tamir B, Richards M, Gurwitz D, Rosengarten D, Kaplan M, Della Pergola S, Quintana-Murci L, Skorecki K. 2004. MtDNA evidence for a genetic bottleneck in the early history of the Ashkenazi Jewish population. *Eur J Hum Genet* 12:355–364.
- Bolnick DA, Shook BA, Campbell L, Goddard I. 2004. Problematic use of Greenberg's linguistic classification of the Americas in studies of Native American genetic variation. *Am J Hum Genet* 75:519–522.
- Bonatto SL, Salzano FM. 1997. A single and early migration for the peopling of the Americas supported by mitochondrial DNA sequence data. *Proc Nat Acad Sci USA* 94:1866–1871.
- Bonilla C, Gutiérrez G, Parra EJ, Kline C, Shriver MD. 2005. Admixture analysis of a rural population of the state of Guerrero Mexico. *Am J Phys Anthropol* 128:861–869.
- Cavalli-Sforza LL, Menozzi P, Piazza A. 1994. The history and geography of human genes. Princeton, NJ: Princeton University Press.
- Chester MA, Olsson ML. 2001. The ABO blood group gene: a locus of considerable genetic diversity. *Transfus Med Rev* 15:177–200.
- Cook SF, Borah W. 1971. Essays in population history: Mexico and the Caribbean. Berkeley, CA: University of California Press.
- Crespillo M, Luque JA, Paredes M, Fernández R, Ramírez E, Valverde JL. 2000. Mitochondrial DNA sequences for 118 individuals from northeastern Spain. *Int J Legal Med* 114(1–2):130–132.
- Dillehay TD. 2009. Probing deeper into first American studies. *Proc Nat Acad Sci USA* 106:971–978.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 1:47–50.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479–491.
- Fagundes NJ, Kanitz R, Bonatto SL. 2008a. A reevaluation of the Native American mtDNA genome diversity and its bearing on the models of early colonization of Beringia. *PLoS ONE* 3:e3157.
- Fagundes NJ, Kanitz R, Eckert R, Valls AC, Bogo MR, Salzano FM, Smith DG, Silva WA Jr., Zago MA, Ribeiro-dos-Santos AK, Santos SE, Petzl-Erler ML, Bonatto SL. 2008b. Mitochondrial population genomics supports a single pre-Clovis origin with a coastal route for the peopling of the Americas. *Am J Hum Genet* 82:583–592.

- Goebel T, Waters MR, O'Rourke DH. 2008. The late Pleistocene dispersal of modern humans in the Americas. *Science* 319:1497–1502.
- González-José R, Bortolini MC, Santos FR, Bonatto SL. 2008. The peopling of America: craniofacial shape variation on a continental scale and its interpretation from an interdisciplinary view. *Am J Phys Anthropol* 137:175–187.
- Greenberg JH, Turner CG, Zegura SL. 1986. The settlement of the Americas: a comparison of the linguistic, dental, and genetic evidence. *Curr Anthropol* 27:477–497.
- Grunnet N, Steffensen R, Bennett EP, Clausen H. 1994. Evaluation of histo-blood group ABO genotyping in a Danish population: frequency of a novel O allele defined as O2. *Vox Sang* 67:210–215.
- Guo SW, Thompson EA. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48:361–372.
- Halverson MS, Bolnick DA. 2008. An ancient DNA test of a founder effect in Native American ABO blood group frequencies. *Am J Phys Anthropol* 137:342–347.
- Helgason A, Sigureth ardóttir S, Gulcher JR, Ward R, Stefánsson K. 2000. mtDNA and the origin of the Icelanders: deciphering signals of recent population history. *Am J Hum Genet* 66:999–1016.
- Hirszfeld L, Hirszfild H. 1919. Essai d'application des methods au problème des Races. *Anthropologie* 29:505–537.
- Jackson BA, Wilson JL, Kirbah S, Sidney SS, Rosenberger J, Bassie L, Alie JA, McLean DC, Garvey WT, Ely B. 2005. Mitochondrial DNA genetic diversity among four ethnic groups in Sierra Leone. *Am J Phys Anthropol* 128:156–163.
- Kang SH, Fukumori Y, Ohnoki S, Shibata H, Han KS, Nishimukai H, Okubo Y. 1997. Distribution of ABO genotypes and allele frequencies in a Korean population. *Jpn J Hum Genet* 42:331–335.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16:111–120.
- Kitchen A, Miyamoto MM, Mulligan CJ. 2008. A three-stage colonization model for the peopling of the Americas. *PLoS ONE* 3:e1596.
- Landsteiner K. 1901. Über Agglutinationserscheinungen normalen menschlichen Blutes. *Wien Klin Wschr* 14:1132–1134.
- Lewis PO, Zaykin D. 2001. Genetic Data Analysis (GDA): Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d16c). Available at: <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>.
- Lisker R. 1981. Estructura genética de la población mexicana. México: Salvat.
- Lisker R, Ramírez E, Babinsky V. 1996. Genetic structure of autochthonous populations of Mesoamerica: Mexico. *Hum Biol* 68:395–404.
- Llop E, Henriquez H, Moraga M, Castro M, Rothhammer F. 2006. Brief communication: molecular characterization of O alleles at the ABO locus in Chilean Aymara and Huilliche Indians. *Am J Phys Anthropol* 131:535–538.
- Merriwether DA, Rothhammer F, Ferrell RE. 1995. Distribution of the four founding lineage haplotypes in Native Americans suggests a single wave of migration for the New World. *Am J Phys Anthropol* 98:411–430.
- Mourant AE. 1985. Blood relations: blood groups and anthropology. New York, New York: Oxford University Press.
- Mourant AE, Kopec AC, Domaniewska-Sobczak K. 1976. The distribution of the human blood groups and other polymorphisms. London: Oxford University Press.
- Mulligan CJ, Hunley K, Cole S, Long JC. 2004. Population genetics, history, and health patterns in Native Americans. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 5:295–315.
- Mulligan CJ, Kitchen A, Miyamoto MM. 2008. Updated three-stage model for the peopling of the Americas. *PLoS ONE* 3:e3199.
- Ogasawara K, Bannai M, Saitou N, Yabe R, Nakata K, Takenaka M, Fujisawa K, Uchikawa M, Ishikawa Y, Juji T, Tokunaga K. 1996. Extensive polymorphism of ABO blood group gene: three major lineages of the alleles for the common ABO phenotypes. *Hum Genet* 97:777–783.
- Olsson ML, Chester MA. 1996a. Evidence for a new type of O allele at the ABO locus, due to a combination of the A2 nucleotide deletion and the Ael nucleotide insertion. *Vox Sang* 71:113–117.
- Olsson ML, Chester MA. 1996b. Frequent occurrence of a variant O1 gene at the blood group ABO locus. *Vox Sang* 70:26–30.
- Olsson ML, Santos SE, Guerreiro JF, Zago MA, Chester MA. 1998. Heterogeneity of the O alleles at the blood group ABO locus in Amerindians. *Vox Sang* 74:46–50.
- Perego UA, Achilli A, Angerhofer N, Accetturo M, Pala M, Olivieri A, Kashani BH, Ritchie KH, Scozzari R, Kong QP, Myres NM, Salas A, Semino O, Bandelt HJ, Woodward SR, Torroni A. 2009. Distinctive Paleo-Indian migration routes from Beringia marked by two rare mtDNA haplogroups. *Curr Biol* 19:1–8.
- Picornell A, Gómez-Barbeito L, Tomàs C, Castro JA, Ramon MM. 2005. Mitochondrial DNA HVRI variation in Balearic populations. *Am J Phys Anthropol* 128:119–130.
- Pinto F, González AM, Hernández M, Larruga JM, Cabrera VM. 1996. Genetic relationship between the Canary Islanders and their African and Spanish ancestors inferred from mitochondrial DNA sequences. *Ann Hum Genet* 60(Part 4):321–330.
- Ramachandran S, Deshpande O, Roseman CC, Rosenberg NA, Feldman MW, Cavalli-Sforza LL. 2005. Support from the relationship of genetic and geographic distance in human population from serial founding effect originating in Africa. *Proc Nat Acad Sci USA* 102:15942–15947.
- Ramenenovsky AF. 1987. Vectors of death: the archeology of European contact. Albuquerque, NM: University of New Mexico Press.
- Rando JC, Cabrera VM, Larruga JM, Hernández M, González AM, Pinto F, Bandelt HJ. 1999. Phylogeographic patterns of mtDNA reflecting the colonization of the Canary Islands. *Ann Hum Genet* 63(Part 5):413–428.
- Rangel-Villalobos H, Muñoz-Valle JF, González-Martín A, Gorostiza A, Magaña MT, Páez-Riberos LA. 2008. Genetic admixture, relatedness and structure patterns among Mexican populations revealed by the Y-chromosome. *Am J Phys Anthropol* 135:448–461.
- Reynolds J, Weir BS, Cockerham CC. 1983. Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics* 105:767–779.
- Rodríguez-Delfín L, Rubin-de-Celis VE, Zago MA. 2001. Genetic diversity in and Andean population from Peru and regional migration patterns of Amerindians in South America: data from Y chromosome and mitochondrial DNA. *Hum Hered* 51:97–106.
- Rosenberg NA, Pritchard JK, Weber JL, Cann HM, Kidd KK, Zhivotovsky LA, Feldman MW. 2002. Genetic structure of human populations. *Science* 298:2381–2385.
- Roubinet F, Despiau S, Calafell F, Jin F, Bertranpetit J, Saitou N, Blancher A. 2004. Evolution of the O alleles of the human ABO blood group gene. *Transfusion* 44:707–715.
- Roubinet F, Kermarrec N, Despiau S, Apoll PA, Dugoujon JM, Blancher A. 2001. Molecular polymorphism of O alleles in five populations of different ethnic origins. *Immunogenetics* 53:95–104.
- Rousset F, Raymond M. 1995. Testing heterozygote excess and deficiency. *Genetics* 140:1413–1419.
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406–425.
- Salas A, Richards M, De la Fe T, Lareu MV, Sobrino B, Sánchez-Diz P, Macaulay V, Carracedo A. 2002. The making of the African mtDNA landscape. *Am J Hum Genet* 71:1082–1111.
- Schroeder KB, Schurr TG, Long JC, Rosenberg NA, Crawford MH, Tarskaia LA, Osipova LP, Zhadanov SI, Smith DG. 2007. A private allele ubiquitous in the Americas. *Biol Lett* 3:218–223.
- Schurr TG. 2004. The peopling of the New World: perspectives from molecular anthropology. *Annu Rev Anthropol* 33:551–583.
- Schurr TG, Sherry ST. 2004. Mitochondrial DNA and Y chromosome diversity and the peopling of the Americas: evolutionary and demographic evidence. *Am J Hum Biol* 16:420–439.

- Seymour RM, Allan MJ, Pomiankowski A, Gustafsson K. 2004. Evolution of the human ABO polymorphism by two complementary selective pressures. *Proceedings* 271:1065–1072.
- Tamm E, Kivisild T, Reidla M, Metspalu M, Smith DG, Mulligan CJ, Bravi CM, Rickards O, Martínez-Labarga C, Khusnutdinova EK, Fedorova SA, Golubenko MV, Stepanov VA, Gubina MA, Zhadanov SI, Ossipova LP, Damba L, Voevoda MI, Dipierri JE, Villems R, Malhi RS. 2007. Beringian standstill and spread of Native American founders. *PLoS ONE* 2(9):e829.
- Tarazona-Santos E, Carvalho-Silva DR, Pettener D, Luiselli D, De Stefano GF, Martínez-Labarga C, Rickards O, Tyler-Smith C, Pena SDJ, Santos FR. 2001. Genetic differentiation in South Amerindians is related to environmental and cultural diversity: evidence from the Y chromosome. *Am J Hum Genet* 68:1485–1496.
- Torroni A, Schurr TG, Cabell MF, Brown MD, Neel JV, Larsen M, Smith DG, Vullo CM, Wallace DC. 1993. Asian affinities and continental radiation of the four founding Native American mtDNAs. *Am J Hum Genet* 53:563–590.
- Torroni A, Schurr TG, Yang CC, Szathmary EJ, Williams RC, Schanfield MS, Troup GA, Knowler WC, Lawrence DN, Weiss KM, Wallace DC. 1992. Native American mitochondrial DNA analysis indicates that the Amerind and the Nadene populations were founded by two independent migrations. *Genetics* 130:153–162.
- Volodko NV, Starikovskaya EB, Mazunin IO, Eltsov NP, Naidenko PV, Wallace DC, Sukernik RI. 2008. Mitochondrial genome diversity in Arctic Siberians, with particular reference to the evolutionary history of Beringia and Pleistocene peopling of the Americas. *Am J Hum Genet* 82:1084–1100.
- Wang S, Lewis CM, Jakobsson M, Ramachandran S, Ray N, Bedoya G, Rojas W, Parra MV, Molina JA, Gallo C, Mazzotti G, Poletti G, Hill K, Hurtado AM, Labuda D, Klaritz W, Barantes R, Bortolini MC, Salzano FM, Petzl-Erler ML, Tsuneto LT, Llop E, Rothhammer F, Excoffier L, Feldman MW, Rosenberg NA, Ruiz-Linares A. 2007. Genetic variation and population structure in Native Americans. *PLoS Genet* 3:e185.
- Weir BS. 1996. *Genetic data analysis II: methods for discrete population genetic data*. Sunderland, MA: Sinauer.
- Yamamoto F, Clausen H, White T, Marken J, Hakomori S. 1990. Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. *Nature* 345:229–233.
- Yamamoto F, McNeill PD, Yamamoto M, Hakomori S, Bromilow IM, Duguid JK. 1993. Molecular genetic analysis of the ABO blood group system, Part 4. Another type of O allele. *Vox Sang* 64:175–178.
- Yang BC, Zeng JQ, Yu Q, Liang YL, Su YQ, Deng ZH. 2007. Molecular polymorphism of O alleles in the Chinese Han population. *Ann Clin Lab Sci* 37:71–74.
- Yip SP. 2000. Single-tube multiplex PCR-SSCP analysis distinguishes 7 common ABO alleles and readily identifies new alleles. *Blood* 95:1487–1492.
- Yip SP. 2002. Sequence variation at the human ABO locus. *Ann Hum Genet* 66(Part 1):1–27.
- Yip SP, Choi PS, Lee SY, Leung KH, El-Zawahri MM, Luqmani YA. 2006. ABO blood group in Kuwaitis: detailed allele frequency distribution and identification of novel alleles. *Transfusion* 46:773–779.
- Zegura SL, Karafet TM, Zhivotovskiy LA, Hammer MF. 2004. High-resolution SNPs and microsatellite haplotypes point to a single, recent entry of Native American Y chromosomes into the Americas. *Mol Biol Evol* 21:164–175.
- Zhivotovskiy LA, Rosenberg NA, Feldman MW. 2003. Features of evolution and expansion of modern humans, inferred from genomewide microsatellite markers. *Am J Hum Genet* 72:1171–1186.