

ESTANDARIZACIÓN DE METODOLOGÍAS DE ADN ANTIGUO Y SUS APORTACIONES AL ESTUDIO BIOCULTURAL DE POBLACIONES PREHISPÁNICAS

Ana Julia Aguirre Samudio,¹ Blanca Z. González Sobrino², Lilia Solís Arrieta,³ Alejandro Terrazas Mata⁴, Annick Daneels Verriest², Carlos Serrano Sánchez², Abigail Meza Peñaloza², Gustavo Ramírez Castilla⁵

¹ Universidad Nacional Autónoma de México, Programa de Becas Posdoctorales, Instituto de Investigaciones Antropológicas

² Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Investigaciones Antropológicas

³ Laboratorio de Microscopía Electrónica, Instituto Nacional de Rehabilitación

⁴ Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Investigaciones Antropológicas, Área de Prehistoria y Evolución Humana,

⁵ Centro inah-Tamaulipas

Resumen: El estudio del adn antiguo (adna) extraído de huesos cuya antigüedad es de cientos o miles de años es de gran importancia para el análisis de genética poblacional y aporta información a los estudios de arqueología, ciencias forenses y evolución. El adna se encuentra fragmentado en secuencias cortas y ha sufrido modificaciones químicas *postmortem*, por lo que es especialmente susceptible a la contaminación. En el presente estudio se muestran los primeros resultados de la estandarización de técnicas de extracción y amplificación de adna, y se analiza el estado de conservación de las fibras de colágena con microscopía electrónica de transmisión. Se analizaron fragmentos de fémur, costilla, vértebra y falange de restos óseos humanos, mamut y caballo de varios sitios arqueológicos. De los protocolos usados para la extracción de adna, sólo en los extractos del método de silica se obtuvo adna de calidad con resultados de amplificación y genotipificación de muestras de fémur y falanges (Veracruz y Teotihuacan). En éstas también se conservaron las fibras de colágena, lo que sustenta la presencia de adna. Se observaron marcadas diferencias entre los métodos de extracción y finalmente se estandarizó el método para una amplificación exitosa.

Palabras clave: adn antiguo; colágena; restos óseos.

Methologies for the analysis of an ancient dna: contribution to biocultural study of pre-hispanic populations

Abstract: dna extracted from hundreds or thousands of year old bones is very important for the population of genetic studies. It contributes to the archaeological, forensic, and evolutionary analysis. The ancient dna (dnaa) is rapidly degraded into short fragments and show chemical *post-mortem* modifications. For this reasons, it is especially susceptible to contamination. We show the first results of our standardized protocols of dnaa extraction and amplification techniques in our laboratory. The Electronic Microscope Transmission analysis showed collagen fibers persevered in the ancient tissue. We analyzed human, mammoth, and horse bones from archaeological sites. We observed marked differences between fragments of femur, rib, vertebra, and phalanx. Different extraction methodologies have been reported of dnaa, and we observed the silica-based method rendered amplified products obtained from femur and phalanxes (from Veracruz and Teotihuacan). These results coincide with the preserved collagen fibers observed in the same sample; it could support the presence of dnaa. The methodology used in this work was appropriated and we obtained amplification success.

Keywords: ancient dna; collagen; remains.

Introducción

El adn es el material genético contenido en el núcleo celular y las mitocondrias; normalmente es resistente a posibles daños ambientales tales como hidrólisis, oxidación y daño químico inducido por la ruptura de enlaces de nucleótidos y radiación ultravioleta. En los organismos vivos, los errores y el daño en las células son corregidos por la reparación enzimática y otros mecanismos celulares. Sin embargo, después de la muerte, el sistema de reparación de las células deja de funcionar y el adn empieza a degradarse rápidamente rompiéndose en pequeños fragmentos (Pääbo 1985) debido a reacciones de oxidación e hidrólisis (Pääbo *et al.* 2004). Mucha de la fragmentación ocurre en las primeras horas del deceso antes de que el tejido pierda su hidratación. Bajo estas circunstancias, el adn empieza a absorberse hacia una matriz mineralizada, lo cual le permite escapar de la degradación microbiana (Pääbo *et al.* 2004). La modificación química del adn fragmentado es tan extensa que sólo se espera recuperar 1 % de sus moléculas en restos de sitios arqueológicos (Pääbo 1989; Pääbo *et al.* 1989) y es imposible recuperar fragmentos mayores de 500 pares de bases (pb) de longitud.

A pesar del deterioro producido por la degradación, se ha demostrado que algunas secuencias de adn pueden ser recuperadas de huesos y tejidos momificados

(Hagelberg y Sykes 1989; Horai *et al.* 1989). Tal es el caso de momias egipcias de hace 2 400 años (Pääbo 1985), huesos de soldados de la guerra civil de Estados Unidos de 1862 (Fisher *et al.* 1993) y restos de soldados de la guerra de Vietnam de 1980 (Holland *et al.* 1993).

Se puede reconstruir parte de la historia con la obtención del adn antiguo (adna) y su análisis, permitiendo a los arqueólogos, antropólogos, paleontólogos y evolucionistas responder a ciertas preguntas y obtener información innovadora para interpretar y tratar de entender sucesos del pasado, estructuras de parentesco, patrones de migración, estratos sociales y estructura de las poblaciones humanas.

Aunque los primeros trabajos sobre el adn antiguo se publicaron a mediados de 1980 (Bär *et al.* 1988; Holland *et al.* 1993), las aportaciones de mayor peso se realizaron con el empleo de la reacción en cadena de la polimerasa (pcr, por sus siglas en inglés), cuya función es la de reproducir secuencias de adn en un gran número de copias de pequeñas regiones en un periodo corto de tiempo. De esta forma, se ha analizado el adn de una hoja fósil de magnolia de entre 17 y 20 millones de años (Golenberg *et al.* 1990, 1991), del fósil de un dinosaurio de 80 millones de años (Woodward *et al.* 1994), o de los fósiles más antiguos de insectos conservados en ámbar, de entre 120 y 135 millones de años. Sin embargo, estos trabajos fueron criticados por falta de reproducibilidad o autenticidad (Hedges y Henikoff 1995).

Los problemas más comunes al trabajar adna son de tipo metodológico dada la degradación de la molécula con el tiempo, las condiciones ambientales (temperatura, pH, humedad, efecto de materiales asociados) y los posibles falsos positivos por la contaminación. Debido a la controversia acerca de la fidelidad de los resultados, se ha propuesto una serie de criterios de autenticidad.

Varios laboratorios dedicados al estudio de adna han propuesto una guía para el manejo del material antiguo (Cooper y Poinar 2000; Pääbo *et al.* 2004; Gilbert *et al.* 2005). Estos cuidados, que enlistamos a continuación, pueden convertirse en protocolos de rutina para evitar la contaminación con el adn moderno que ha estado en contacto con el material antiguo, de manera que sea posible reproducir y autenticar las moléculas purificadas.

1. Separar las áreas de trabajo. Dada la distinta susceptibilidad del material en cada paso para el manejo de adna, es conveniente contar con distintos espacios en el laboratorio: uno para la limpieza, otro para la extracción, otro para la amplificación con pcr. Además, las superficies de trabajo y los especímenes se deben radiar con luz ultravioleta.
2. Utilizar controles. Durante todo el proceso los contaminantes pueden interferir, por lo que es conveniente usar controles negativos en la extrac-

ción y en la amplificación durante la reacción de pcr (esto significa que de este tipo de muestra no debe obtenerse resultado alguno, pues de lo contrario constataríamos que hubo contaminación).

3. Reproducir los experimentos en otros laboratorios de investigación de manera independiente.
4. Duplicar los experimentos. Para obtener un resultado consistente, es conveniente hacer duplicaciones en distintos momentos durante el procedimiento.
5. Clonación y secuenciación de los productos. La clonación de adna amplificado y no amplificado permite medir la degradación inicial, la posible contaminación y la unión de los oligonucleótidos en la reacción de pcr.
6. Verificar el tamaño de la molécula de pcr. Dado que la degradación sólo permite obtener fragmentos menores de 500 pb, los productos de mayor tamaño deben ser interpretados con precaución.
7. Tener como control otras moléculas que hayan sobrevivido al desgaste temporal. Un ejemplo son las fibras de colágena o la racemización de aminoácidos; si su presencia es escasa es poco probable que haya adn en la muestra.
8. Contar con muestras de otras especies antiguas relacionadas con los humanos.
9. Medir la cantidad de moléculas de adn mediante pcr en tiempo real.

Estos criterios de autenticidad del adna en poblaciones han sido discutidos en revisiones detalladas en las que, además, se exponen los criterios del investigador, en especial en los estudios sobre poblaciones humanas (Willerslev y Cooper 2005; Malmström *et al.* 2005; Montiel y García Sívoli 2007). Algunas medidas preventivas para evitar la contaminación del adna, ya sea en el área de trabajo, en la excavación o durante el procesamiento de las muestras son: usar guantes y cubrir bocas, emplear instrumental limpio y desechable, dejar secar el material que esté húmedo en un cuarto o espacio aislado para evitar la proliferación de microorganismos, guardar la pieza con el sedimento del suelo sin limpiar para mantener microambiente y evitar el aumento de la temperatura en el lugar de almacenaje.

Por otra parte, una forma para mejorar el rendimiento de la amplificación del adn es seleccionar muestras que estén bien preservadas en su morfología e histología, eliminando huesos quemados o cocinados y que tengan señales evidentes de alteraciones estructurales. Dichas muestras deben presentar proteínas óseas preservadas, principalmente las fibras de colágena tipo I, que constituye 90 % de

la fase orgánica del hueso. Estas fibras se han observado a través de Microscopía Electrónica de Transmisión (met) en huesos fósiles de *Tyranosaurus rex* (Armitage 2001; Götherström *et al.* 2002; Monsalve *et al.* 2008).

El objetivo de este trabajo fue estandarizar las técnicas de extracción y amplificación de adna, así como determinar la presencia de fibras de colágena como indicadoras de la preservación de las biomoléculas óseas en restos de varios sitios arqueológicos de México, lo que contribuirá al aporte de datos genéticos y el estudio de las poblaciones prehispánicas.

Material y métodos

Las muestras se obtuvieron de cuatro sitios arqueológicos. El primero incluye los restos óseos del entierro 29 (se tomaron cuatro muestras de fémur y falange) depositado en la ofrenda de una residencia palaciega ubicada en la Plataforma Este, que conforma el límite sur y este de la plaza principal del sitio arqueológico La Joya, en San Martín Garabato, a unos 15 km del puerto de Veracruz. El depósito está fechado por medio de asociación cerámica hacia el año 700 dC con una antigüedad de 1 300 años. Detalles de la excavación se reportan en la tesis de Velasco González (2009). Al segundo sitio, Altamira, Tamaulipas, corresponden los entierros 6 y 8; se analizaron restos óseos de costilla y vértebra, fechados entre 200 y 400 dC por asociación cerámica (Ramírez Castilla 2004).

El tercer sitio, La Ventilla, fue un barrio habitacional de Teotihuacan. Se analizaron partes de fémur humano. Posiblemente estos materiales fueron manipulados por los mismos teotihuacanos, ya que se trata de artefactos encontrados fuera del contexto de un entierro. Su antigüedad corresponde a la fase Tlamimilolpa (200-400 dC). El cuarto sitio fue El Arca, en el noroeste de Sonora, en el cual se encontraron restos de mamut (*Mamuthus columbi*) y caballo (*Equus crassidens*). Los restos atribuidos a un caballo se colectaron directamente y proceden de la superficie de depósitos sedimentarios, fuera del contexto y es imposible asegurar la antigüedad. Sin embargo, hay certeza en cuanto a que corresponden al Pleistoceno tardío. Los restos de mamut se encontraron *in situ*, parcialmente enterrados en el depósito y sin evidencias de arrastre, por lo que se consideran inalteradas y pertenecen al Pleistoceno terminal.

Técnica de Microscopía Electrónica de Barrido (meb)

Las muestras (fémur, costilla y falange humano y hueso compacto de *E. crassidens*) fueron lavadas y secadas a 37 °C durante 72 horas. Posteriormente, se colocaron

en un portamuestras de aluminio cubiertas de cinta de carbón y se observó la morfología ósea de manera directa en el microscopio electrónico de barrido ambiental XL-30 (*Phillips Electronics*, Holanda) con electrones gaseosos secundarios y en modo de bajo vacío por ser muestras poco conductoras. La cuantificación de los elementos químicos óseos se realizó con un dispersor de rayos X (edax – New XL-30, eua) integrado al meb de manera semicuantitativa con diez análisis a través de un patrón cruzado. Las condiciones de trabajo del edax fueron 30 Kv, 5 de spot, 10 % de tiempo muerto y 2 200 cuentas por minuto.

*Técnica de Microscopía Electrónica de Transmisión (met)
para determinar fibras de colágena*

Las muestras de fémur y falange de restos arqueológicos humanos fueron procesadas con la técnica de met. Fueron cortadas en fragmentos de 5 mm³ de espesor, se descalcificaron por inmersión en ácido clorhídrico (2.5 %) durante diez minutos a 37 °C. Posteriormente, se lavaron con agua destilada y detergente por una hora para neutralizar el pH ácido, se fijaron en glutaraldehído al 2.5 % en un amortiguador salino de fosfato (pbs) 0.1 molar a un pH 7.4 a temperatura ambiente (ta) y se lavaron en pbs cuatro veces por cinco minutos. Se posfijaron con tetraóxido de osmio (1 %) por una hora, se lavaron con pbs y se deshidrataron en concentraciones ascendentes de alcohol etílico (de 50 hasta 100 %) por 10 minutos cada una a ta y con agitación constante. Se infiltraron e incluyeron con resina plástica (epon-812) a 60 °C por 24 horas. Los cortes semifinos de 400 nm de grosor fueron teñidos con azul de toluidina (1 %) para seleccionar las áreas de corte. Los cortes finos se realizaron de 80 nm de espesor colocados en rejillas de cobre de 200 mesh, contrastadas con acetato de uranilo (4 %) en solución acuosa durante 30 minutos y citrato de plomo (0.3 %) por 20 minutos. Dichas rejillas se lavaron con agua destilada abundantemente, eliminando el exceso de la solución de contraste y se dejaron secar. Las observaciones se realizaron en el microscopio electrónico de transmisión tecnai-10 (*Phillips Electronics*, Holanda).

Método de Extracción de adn

Se utilizó ropa de cirujano desechable y se trabajó en cuartos aislados tanto para la extracción como para la reacción de pcr del adna. En ambos casos, el área completa se limpió con cloro y se esterilizó con luz ultravioleta. Se usaron como control muestras de los investigadores y restos óseos de otras especies antiguas (*Mamuthus columbi* y *Equus crassidens*), considerando el punto 8 de los criterios

de autenticación, en el que no deben amplificar con los oligonucleótidos para humanos. Se pusieron a prueba y compararon cuatro métodos de extracción publicados (Parr *et al.* 1996; Alonso *et al.* 2003; Rohland y Hofreiter 2007) y un *kit* comercial de extracción (*GeneClean®*) del *FastPrep-24 sample preparation system*. Estos métodos incluyen protocolos de purificación con fenol cloroformo, ultrafiltración mediante columnas y unión de moléculas a silica. Se usaron entre 1 g y 500 mg de polvo de hueso según si el material era hueso poroso o compacto. Fueron sometidos a digestión con proteinasa k durante 16-20 horas. Se usaron controles negativos sin muestra durante el proceso de extracción de adn, con el objeto de descartar eventos de contaminación. En todos los protocolos se usó una centrífuga refrigerada Z300 K (*Labnet*).

Se llevaron a cabo varios ensayos de pcr. El propósito fue medir la calidad del adna resultante de las extracciones con todos los protocolos mencionados y obtener genotipos para compararlos con poblaciones prehispánicas o modernas. Las condiciones de la pcr fueron realizadas con *AmpliTaq Gold® polymerase* (*Applied Biosystems*), descritos por Römler *et al.* (2006), variando la concentración de una a dos unidades en presencia de 1 mg/ml de bsa (albúmina de suero bovino) y con *Master Mix Syber Green*, las cuales son enzimas de alta fidelidad de reacción. Se hicieron pruebas de inhibición con pcr usando adn moderno y adn antiguo como controles positivos, y como controles negativos se usaron extractos de mamut y de caballo, así como muestras sin adn. Se usaron 2 marcadores mitocondriales para reconocer los haplotipos C (utilizando la enzima Hinc II, marca *Invitrogen*) y A (digestión con la enzima Hae III, *Invitrogen*); las secuencias de los oligonucleótidos y condiciones de pcr para ambas regiones se describen en Parr *et al.* (1996). También se usaron los marcadores nucleares de tirosin-hidroxilasa humana (tohl, oligonucleótidos sentido 5' GTGGGTGAAAAGCTCCCGATTAT 3', antisentido 5' ATTCAAAGGGTATCTGGGCTCTGG 3') y de la lipoproteína-lipasa humana (lpl) (oligonucleótidos sentido 5' ATCTGACCAAGGATAGTGGGATATA 3' y antisentido 5' CCTGGGTAAGTGAAGGAGACTGTGTC 3'), ubicados en los cromosomas 11 y 8 respectivamente. Las condiciones de pcr para tohl y lpl fueron: desnaturalización a 94 °C/5 minutos, 45 ciclos a 94 °C/1 minuto, 55 °C/40 segundos, 72 °C/35 segundos y 72 °C/10 minutos. El producto de la amplificación fue observado en geles de agarosa *MetaPhor®* al 3 % y poliacrilamida al 20 %; la resolución se hizo con tinción de bromuro de etidio.

Resultados y discusión

Microscopía Electrónica de Barrido (meb)

Las micrografías del fémur muestran los sistemas de Havers, que se caracterizan por ser estructuras cilíndricas con un diámetro de aproximadamente 236 micras y alineadas paralelamente al eje óseo longitudinal, el cual forma diez o más anillos lamelares dispuestos alrededor de un canal vascular central (figura 1a). En cambio, en las muestras de caballo no se observaron sistemas de Havers y todo el material era difuso (figura 1B). En el análisis de elementos químicos con edax observamos altos porcentajes de calcio y fósforo (36 y 17 %, respectivamente). Además, durante la aplicación del ácido clorhídrico para descalcificar la muestra, siguiendo los protocolos de la técnica met, ésta se disolvió completamente en menos de dos minutos, lo que indicaba que no había materia orgánica. Por lo tanto, estas observaciones son indicadores de que las biomoléculas (como colágena y adn) estaban degradadas, en concordancia con lo reportado por Götherström *et al.* (2002) con respecto a la sobrevivencia de éstas.

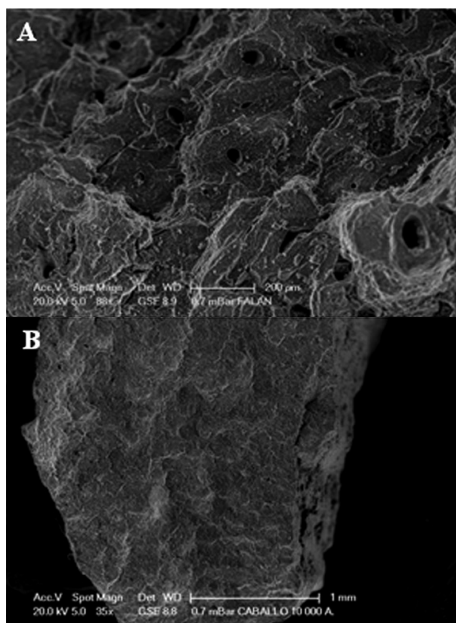


Figura 1. a) Imagen de hueso cortical de fémur en el que se aprecian los sistemas de Havers bien organizados con su canal vascular. b) Imagen de hueso cortical de tibia de caballo con 10 000 años de antigüedad.

En las muestras de costilla y falange, compuestas principalmente de hueso esponjoso, hay osteonas en forma de disco o ramas y no tienen canales vasculares en su interior. Sin embargo, el hueso de la costilla era muy frágil y se pulverizaba, impidiendo realizar cortes y apreciar la estructura interna; no obstante, se logró observar escasas trabéculas óseas con reducido tamaño y contraídas, indicadores de pérdida estructural (figura 2a). En la falange se observó una estructura trabecular ordenada, con zonas de resorción ósea, actividad que se lleva a cabo durante la vida del individuo y es dependiente de la estimulación mecánica. Estos elementos quedaron registrados en los componentes del hueso, aunque las células ya no se observaron (figura 2b). Además, en el tejido se apreció un vaso sanguíneo con células endoteliales y sanguíneas (figura 2c), lo cual indica una buena preservación de la materia orgánica ósea. De acuerdo con estos resultados, es claro que los procesos de fosilización y preservación ósea estuvieron determinados por las condiciones ambientales, el tipo de hueso y, en su caso, el tipo de depósito del entierro, lo que permitió que pudieran conservarse proteínas como la colágena; esto sugiere también que moléculas como el adn están sobreviviendo a la hostilidad microambiental.

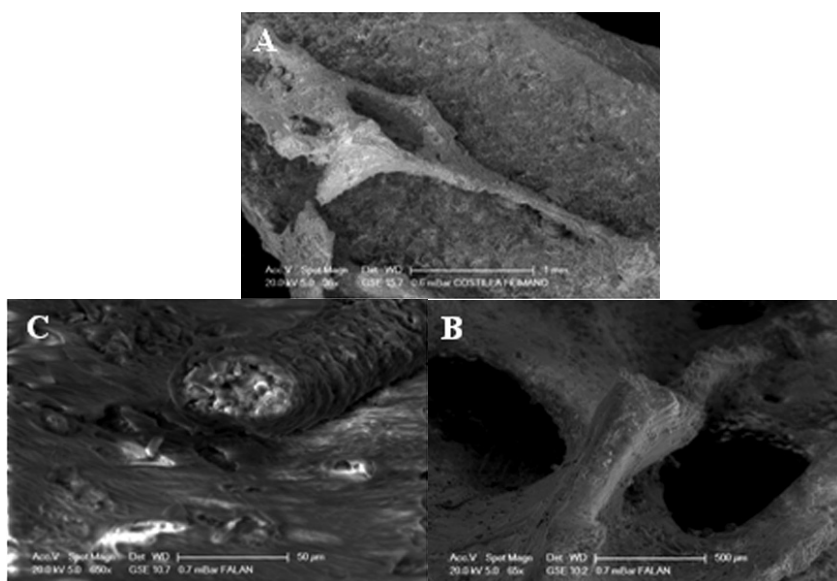


Figura 2. a) Hueso de costilla de humano (antigüedad de 1 300 años), con pocas trabéculas óseas muy desgastadas. b) Falange, muestra una estructura trabecular bien organizada y preservada. c) Vaso sanguíneo encontrado en la falange, el grado de su preservación fue mayor que la costilla.

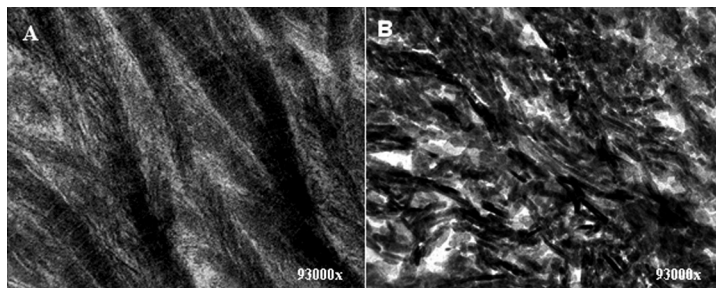


Figura 3. Micrografías electrónicas de fibrillas de colágena. A) Hueso trabecular de falange que muestra su característico patrón de estriación transversal. B) Hueso cortical de fémur, en el cual se ha perdido el ordenamiento de la colágena y sus estriaciones transversales.

Microscopía Electrónica de Transmisión (met)

Las muestras de caballo y costilla de humano no fueron procesadas para met ya que se disolvieron totalmente durante la descalcificación, a pesar de que se usaron soluciones de concentración más baja que la reportada en la literatura (Koon *et al.* 2003), lo cual nos indicó que sólo había materia inorgánica.

En la muestra de falange (figura 3A) se pudo observar la colágena dispuesta de forma azarosa, lo cual es normal en el hueso; también en el tejido se distinguen fibrillas paralelas que presentaban estriaciones transversales, claras y oscuras en toda su longitud. Por el contrario, la muestra de fémur mostró paquetes densos de colágena, pero las fibras eran más delgadas y pequeñas que las de la falange, y la mayoría perdió las estriaciones transversales. Además, en ciertas áreas no se observaba ninguna organización tisular (figura 3B).

Análisis de adn

Se realizaron tres experimentos con el protocolo de fenol-cloroformo, con el objeto de estandarizar la extracción. El adn de las muestras de los restos óseos mostró un patrón constante en cuanto a su índice de calidad (≈ 1.3). Los datos indican que el adna está degradado; sin embargo, las muestras de falange y fémur mostraron mayor cantidad de adn (cuadro 1).

Fue posible observar el adn en los geles de agarosa siguiendo todos los protocolos descritos; sin embargo, con el método de fenol-cloroformo la purificación no fue completa y los contaminantes impidieron medir el tamaño de los fragmentos de adn. Ninguna de las muestras extraídas mediante este método, ni

Cuadro 1. *Promedio de tres mediciones de la cantidad de adn en cada una de las muestras óseas. Resultados a partir del protocolo de fenol-cloroformo*

Muestra	Absorbancia 260 nm	Absorbancia 280 nm	Calidad del producto	Concentración aproximada (µg/µl)
E 1	0.41	0.31	1.3	538.4
E 2	0.294	0.204	1.4	382.7
H-Tam_vert 1	0.370	0.249	1.4	481.5
H-Tam_vert 2	0.152	0.083	1.4	198.0
H-Tam_cost 1	0.453	0.325	1.4	589.1
H-Tam_cost 2	0.498	0.365	1.4	647.5
H-Joya_fal 1	1.496	0.961	1.6	1945.4
H-Joya_fal 2	1.342	0.889	1.5	1744.7
<i>Equus c. 1</i>	0.415	0.309	1.3	538.8
<i>Equus c. 2</i>	0.294	0.203	1.4	383.2
Control saliva	0.081	0.011	7.09	100.9

E= Equus , H = humano, Tam =Tamaulipas, Joya = Veracruz, vert = vértebra, cost = costilla, fal = falange.

Cuadro 2. *Comparación de los diferentes métodos de extracción de adn antiguo*

Metodología	Abs. 260 nm	Abs. 260 nm	Calidad	Calidad	Conc. µg \µl	Conc. µg \µl	pcr Teot., La Joya
	Teot.	La Joya	Teot.	LaJoya	Teot.	La Joya	
Fenol-Cloroformo-OH	0.116	0.146	2.78	2.19	189.2	182.2	-
Fenol- Centricon	0.348	0.955	1.64	1.5	434.8	1193.9	-
Silica-T guanidine	0.104	0.143	3.7	3.19	129.9	178.3	+
Silica NaCl	0.173	0.114	1.48	1.47	432.4	290.5	-
GeneClean	0.165	0.154	1.37	1.59	192.7	206.7	+

Teot = Teotihuacan, Abs.: absorbancia en nanómetros. Conc.: concentración en microgramos por microlitros.

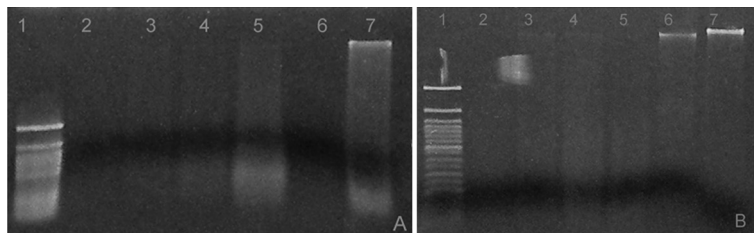


Figura 4. Gel de agarosa al 0.8 % en el que se observa el adn antiguo extraído con el método de silica. Pozo 1, marcador de peso molecular (50 pb); pozos 2-5, muestras prehispánicas de La Joya (A) y de Teotihuacan (B). A) Pozos 2-5, adn antiguo entre 350-400 pb; pozo 6, control negativo sin adn y control de adn moderno (de saliva), se observa adn de alto peso molecular. B) Pozo 7, se observa el adn de una muestra de mamut.

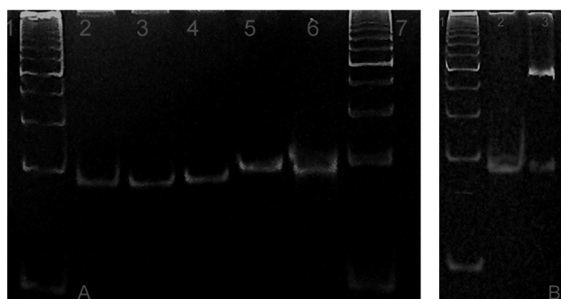


Figura 5. A) Digestión de la amplificación de adn mitocondrial (Hinc = 2-4 y Hae III, 5-6) de muestras de La Joya, Veracruz, pozos 2-3; pozo 4, control positivo. B) Amplificación de muestras de La Joya con el marcador nuclear LPL. B; 2, adna; 3, adn moderno. Se observan diferentes genotipos para las dos muestras, verificando la no contaminación con adn moderno. Marcador de peso molecular, 1 y 7 (A y B).

con adecuaciones, como fueron los varios lavados con fenol, generó un producto de amplificación (cuadro 2), lo que sugiere que el material nucleico requiere otro tratamiento durante la purificación. Con los protocolos, en donde utilizamos silica-sal tiocianato de guanidina y el *kit* comercial para el aislamiento de adn (figura 4), las muestras se purificaron exitosamente permitiendo que la enzima Taq polimerasa amplificara los productos de marcadores tanto de adn mitocondrial como nuclear (figura 5).

Podemos decir que el éxito del análisis de adna depende de cuánto se conserva, la relación paleoclimática del sitio de excavación, la edad del fósil y la energía de activación de la reacción de depurinización, lo que es equivalente a

la tasa del deterioro biomolecular según Smith *et al.* (2003). Cualquier cambio de temperatura de 15 °C y un pH 7 (fisiológico) altera el adn soluble. Un adn mitocondrial extraído de hueso fresco puede ser recuperado en 2.5×10^{11} /g. Se ha calculado que se requiere 0.4 g de hueso para obtener fragmentos de 105 pb para amplificar exitosamente un adna de un espécimen de Neandertal a 10 °C y pH 7.4 de aproximadamente 15 mil años de antigüedad (Smith *et al.* 2003).

Para manejar el material nucleico en el laboratorio se requiere: 1) un manejo cuidadoso de esterilidad, 2) separación de áreas para evitar la contaminación de los extractos durante el procedimiento hasta la obtención de un genotipo, 3) tratamiento de pcr para evitar una incorporación incorrecta de bases y sustituciones nucleotídicas que ocurren durante el ciclaje de la reacción. El uso de la enzima uracilo-adn glicosilasa (Hofreiter *et al.* 2001) evita malas interpretaciones en el momento de los análisis de secuencia y filogenias entre especies.

Por otra parte, en nuestra experiencia, la muestra extraída una vez almacenada a 4 °C, debe ser procesada inmediatamente para la pcr debido a que empieza a degradarse. Éste fue el caso de los experimentos realizados con la muestra de Teotihuacan que estuvo almacenada a 4 °C: su estado manifestó degradación, por lo que se logró un resultado parcial de esta muestra.

Se observaron fibras de colágena y adn de los restos óseos del entierro de La Joya, Veracruz, los cuales fueron analizados con dos tipos de marcadores genéticos, cuyos genotipos fueron obtenidos (figura 5). Con la serie de los experimentos realizados, pudo evaluarse la calidad de la molécula purificada y comprobarse la presencia de adna utilizable para el análisis de genética poblacional.

Conclusión

Las muestras de los entierros tanto del sitio de La Joya como los de La Ventilla estaban suficientemente conservados, de manera que pudieron observarse las características histológicas de la colágena y se obtuvo un producto de amplificación de los marcadores mitocondriales y lpl. Las fibras de colágena de falange presentaron mejor preservación que las del fémur, ya que sus fibras estaban más pequeñas y contraídas, aunque los datos sugieren que ambos tipos de muestras contienen otras moléculas que sobreviven en las células óseas, como se confirmó con el procedimiento de obtención del adn. Los métodos de extracción que dieron un mejor grado de purificación fueron los que emplean silica, lo cual fue evaluado por el rendimiento de la reacción de pcr. En este sentido, se obtuvieron genotipos para marcadores moleculares de tamaño pequeño como Hinc II y Hae III, obtenidos de las mitocondrias (que en la célula son abundantes y aumenta

la probabilidad de obtener adn aunque el material esté degradado). También fue posible amplificar los fragmentos de adn usando el marcador nuclear *lpl*, cuyo producto fue tenue comparado con los marcadores mitocondriales, pero que indica que su tamaño pequeño es apropiado para este tipo de muestra biológica en estudios de antropología molecular. Esta serie de datos nos confirma que la metodología de extracción con silica, de pcr y el uso de muestras de huesos de tipo cortical pueden dar óptimos resultados para estudios de genética que se encuentran en un contexto arqueológico.

Finalmente diremos que las diferencias de las muestras de los restos óseos que corresponden a contextos arqueológicos distintos, como son los del presente estudio, fueron de gran relevancia para la estandarización de métodos de obtención y caracterización de adna, pues sus condiciones paleoambientales fueron distintas. Estos resultados constituyen una plataforma para los futuros estudios encaminados a la evaluación de frecuencias genéticas y subsecuentes interpretaciones sobre eventos poblaciones de migración, dispersión y diversidad. Con la obtención de los genotipos de muestras de varios sitios arqueológicos se pueden comparar poblaciones de distintas épocas con análisis filodemográficos, así como evaluar la estructura poblacional a nivel de subpoblaciones y familias. Sin embargo, es importante mencionar que no es posible calcular con precisión dichas estructuras de poblaciones con pocos individuos y/o muestras, ya que la distancia temporal requiere de otro tipo de datos para poder asumir hipótesis sobre la composición de los grupos, la herencia directa de pobladores de otras épocas de los mismos sitios ocupados o los movimientos poblacionales y eventos de deriva génica a los que fueron sometidos. Parte importante de los resultados incluye, también, la posibilidad de ampliar el conocimiento sobre los procesos ocurridos en el momento del contacto español y sus consecuencias en la diversidad y distribución poblacional en las distintas regiones culturales, tanto durante la Colonia como en la actualidad.

Agradecimientos

Este trabajo de investigación se realizó con una beca del Programa de Becas Posdoctorales de la unam, en el Instituto de Investigaciones Antropológicas. Parte de este trabajo fue financiado por los proyectos papiit IN402507 y conacyt P48481.

Referencias

Alonso, Antonio, Pablo Martín, Cristina Albarrán, Pilar García, Dragan Primorac, Oscar García, Lourdes Fernández de Simón, Julia García-Hirschfeld, Manuel Sancho y José Fernández-Piqueras

- 2003 Specific Quantification of Human Genomes from Low Copy Number dna Samples in Forensic and Ancient dna Studies, *Croatian Medical Journal* 44 (3): 273-280.

Armitage, Mark

- 2001 [en línea] Scanning Electron Microscope study of mummified collagen fibers in fossil tyrannosaurus rex bone, *Creation Research Society Quarterly Journal* 38 (2): 61-66, <www.creationresearch.org/crsq/articles/38/38_2/Trex.htm> [consulta: 29 de noviembre del 2009].

Bär, Walter, Adelgunde Kratzer, Marco Mächler y Walter Schmit

- 1988 Postmortem stability of adn, *Forensic Science International* 39 (1): 59-70.

Cooper, Alan y Hendrick Poinar

- 2000 Ancient adn: Do it right or not at all, *Science* 289 (5482): 1139.

Fisher, D. L., M. Holland, L. Mitchell, P. S. Sledzik, A. W. Wilcox, M. Wadhams y V. W. Weedn

- 1993 Extraction, evaluation, and amplification of adn from decalcified and undecalcified United States civil war bone, *Journal of Forensic Sciences* 38 (1): 60-68.

Gilbert, M. Thomas, Hans-Jürgen Bandelt, Michael Hofreiter e Ian Barnes

- 2005 Assessing ancient dna studies, *Trends in Ecology and Evolution* 20 (10): 541-544.

Golenberg, Edward

- 1991 Amplification and analysis of miocene plant fossil dna, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 333 (1268): 419-427.

Golenberg, Edward, David Giannasi, Michael Clegg, Charles Smiley, Mary Durbin, David Henderson y Gerard Zurawski

- 1990 Chloroplast dna sequence from a miocene Magnolia species, *Nature* 344 (6267): 656-658.

- Götherström, Anders, Collins M. J., Anders Angerbjörn y Kerstin Lidén
2002 Bone preservation and dna amplification, *Archaeometry* 44 (3): 395-404.
- Hagelberg, Erika y Bryan Sykes
1989 Ancient bone dna amplified, *Nature* 342 (6249): 485.
- Hedges, Blair y Mary Henikoff Schweitzer
1995 Detecting dinosaur dna, *Science* 268 (5214): 1191-1194.
- Hofreiter, Michael, David Serre, Hendrik Poinar, Melanie Kuch y Svante Pääbo
2001 Ancient dna, *Nature Reviews Genetics* 2: 353-359.
- Holland, Mitchell, Deborah Fisher, Mitchell Lloyd, William Rodríguez, James Canik, Carl Merril y Victor Weedn
1993 Mitochondrial dna sequence analysis of human skeletal remains: identification of remains from the Vietnam war, *Journal of Forensic Sciences* 38 (3): 542-553.
- Horai, Satoshi, Kenji Hayasaka, Kumiko Murayama, Noriyuki Wate, Hiroko Koike y Nobuyuki Nakai
1989 dna amplification from ancient human skeletal remains and their sequence analysis, *Proceedings of the Japan Academy, Series B: Physical and Biological Sciences* 65 (10): 229-233.
- Koon, H.E.C., R.A. Nicholson y M.J. Collins
2003 A practical approach to the identification of low temperature heated bone using tem, *Journal of Archaeological Science* 30 (11): 1393-1399.
- Malmström, Helena, Jan Storá, Love Dalén, Gunilla Holmlund y Anders Götherström
2005 Extensive human dna contamination in extracts from ancient dog bones and teeth, *Molecular Biological Evolution* 22 (10): 2040-2047.
- Monsalve, Maria Victoria, E. Humphrey, David Walker C., Caudia Cheung, Wayne Vogl y Mike Nimmo
2008 Brief communication: State of preservation of tissues from Ancient human remains found in a glacier in Canada, *American Journal of Physical Anthropology* 137: 348-355.

Montiel, Rafael y Carlos García Sívoli

- 2007 Los criterios de autenticidad de adn antiguo y su uso en estudios poblacionales humanos, *Boletín Antropológico* 25 (70): 215-229.

Pääbo, Svante

- 1985 Molecular cloning of ancient Egyptian mummy dna, *Nature* 314: 644-645.
1989 Ancient dna: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification, *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 86 (6): 1939-1943.

Pääbo, Svante, Russell Higuci y Allan Wilson

- 1989 Ancient dna and the polymerase chain reaction, *Journal of Biological Chemistry* 264 (17): 9709-9712.

Pääbo, Svante, Hendrik Poinar, David Serre, Viviane Jaenicke-Després, Juliane Hebler, Nadin Rohland, Melani Kuch, Johannes Krause, Linda Vigilant y Michael Hofreiter

- 2004 Genetic analyses from ancient DNA, *Annual Review of Genetics* 38: 645-79.

Parr, Ryan L., Shawn W. Carlyle y Dennis H. O'Rourke

- 1996 Ancient dna analysis of Fremont Amerindians of the Great Salt Lake Wetlands, *American Journal of Physical Anthropology* 99: 507-518.

Ramírez Castilla, Gustavo

- 2004 Costumbres funerarias en la cuenca lacustre del Pánuco. Yamile Lira López y Carlos Serrano (eds.), *Prácticas funerarias en la costa del Golfo de México*, Instituto de Antropología de la Universidad Veracruzana-Instituto de Investigaciones Antropológicas, Universidad Nacional Autónoma de México-Asociación Mexicana de Antropología Biológica, México: 23-44.

Rohland, Nadin y Michael Hofreiter

- 2007 Ancient dna extraction from bones and teeth, *Nature Protocols* 2 (7): 1756-1762.

Römpler, Holger, Paul Dear, Johannes Krause, Matthias Meyer, Nadin Rohland, Torsten Schöneberg, Helen Spriggs, Mathias Stiller y Michael Hofreiter

- 2006 Multiplex amplification of ancient dna, *Nature Protocols* 1 (2): 720-728.

Smith, Colin, Andrew Chamberlain, Michael Riley, Chris Stringer y Matthew Collins

- 2003 [en línea] The thermal history of human fossils and the likelihood of successful DNA amplification, *Journal of Human Evolution*, 45: 203-217, <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6WJS-49TNX04-1&_user=945819&_coverDate=09%2F30%2F2003&_alid=1705338307&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_origin=search&_zone=rslt_list_item&_cdi=6886&_sort=r&_st=13&_docanchor=&view=c&_ct=405&_acct=C000048981&_version=1&_urlVersion=0&_userid=945819&md5=6161c143d9762a9f39c4b989815e70a9&searchtype=a> [consulta: 18 de abril de 2010].

Velasco González, Jesús Ernesto

- 2009 *Estudio biocultural en restos óseos del Clásico (200-750 d.C.) en el centro de Veracruz. Patrones fúnebres, de salud y desgaste dental en individuos de distinto rango en una misma entidad política*, tesis, Escuela Nacional de Antropología e Historia, México.

Willerslev, Eske y Alan Cooper

- 2005 Ancient dna, *Proceedings of the Royal Society of Biological Sciences* 272 (1558): 3-16.

Woodward, S., N.J. Weyand y M. Bunell

- 1994 dna sequence from Cretaceous period bone fragments, *Science* 266: 1229-1232.