

**EXTRACCIÓN Y AMPLIFICACIÓN DE ADN MITOCONDRIAL PROVENIENTE DE RESTOS  
ÓSEOS AMERINDIOS DEL PERIODO MUISCA TARDIO EN LA SABANA DE BOGOTÁ  
PARA EL ESTUDIO DE RELACIONES DE PARENTESCO MATRILINEAL**

**DIANA PATRICIA SANCHEZ BERNAL**

**TRABAJO DE GRADO  
Presentado como el requisito parcial  
Para optar al título de**

**Bióloga**

**Alberto Gómez Gutiérrez, PhD  
Director**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
CARRERA DE BIOLOGIA  
Bogotá D.C.  
Noviembre 27 de 2009**

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

### **Artículo 23 de la Resolución No13 de julio de 1946**

"La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus tesis de grado".

EXTRACCIÓN Y AMPLIFICACIÓN DE ADN MITOCONDRIAL PROVENIENTE DE RESTOS  
ÓSEOS AMERINDIOS DEL PERIODO MUISCA TARDIO EN LA SABANA DE BOGOTA PARA  
EL ESTUDIO DE RELACIONES DE PARENTESCO MATRILINEAL

DIANA PATRICIA SANCHEZ BERNAL

APROBADO

---

Alberto Gómez Gutiérrez, PhD  
Director

---

Ignacio Briceño Balcázar, MD, PhD  
Par Académico

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi Familia por todo su apoyo durante mi carrera y por enseñarme a ser una persona responsable.

A mi director Alberto Gómez Gutiérrez PhD., por su confianza, guía y conocimiento durante todo el desarrollo del trabajo.

A Ignacio Briceño Balcázar, MD, PhD, por su colaboración y asesoría durante el desarrollo del trabajo.

A Andrea Casas por su paciencia, asesoría y colaboración incondicional en todos los aspectos del desarrollo de este trabajo.

Al Instituto de Genética Humana de la Pontificia Universidad Javeriana por el préstamo de infraestructura y equipos, así como por la financiación de todos los materiales y reactivos utilizados.

Al Laboratorio de Identificación Humana del Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia por el préstamo de sus instalaciones y equipos para elaborar una parte experimental de este trabajo.

Al Laboratorio de Antropología Física de la Universidad de Los Andes por la colaboración en el acceso a las muestras óseas del yacimiento arqueológico de Tibanica (Soacha, Cundinamarca).

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>RESUMEN.....</b>	<b>6</b>
<b>INTRODUCCION.....</b>	<b>7</b>
<b>MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>8</b>
ADN Mitocondrial (ADNmt).....	8
ADN antiguo.....	8
Poblamiento de América.....	10
Poblamiento de Sur América.....	11
Los Muiscas.....	12
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>12</b>
Sujetos de estudio.....	13
Maceración y digestión del tejido óseo.....	15
Extracción.....	15
Re-extracción con Kit de Corpogen (purificación).....	16
Amplificación.....	16
Análisis de los datos.....	17
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>18</b>
Muestra 1.....	18
Muestra 2.....	20
Muestra 3.....	23
Muestra 4.....	25
<b>DISCUSION.....</b>	<b>29</b>
Muestra 1.....	30
Muestra 2.....	31
Muestra 3.....	33
Muestra 4.....	34
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>36</b>
<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>37</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>38</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>41</b>

## RESUMEN

El propósito de este proyecto es extraer y amplificar el ADN de individuos pertenecientes a entierros correspondientes a las altas jerarquías en una muestra poblacional proveniente del hallazgo arqueológico de la vereda de Tibanica, Soacha, en la Sabana de Bogotá, gracias al hallazgo en este lugar de una aldea perteneciente a la sociedad Muisca del periodo Tardío (1200-1600 d.C.) con un total de 586 tumbas con restos óseos, algunas de las cuales contenían ajuares funerarios como vasijas, cuentas y figuras en orfebrería, entre otros objetos. En particular, se busca determinar si individuos pertenecientes a los entierros de las altas jerarquías están relacionados o no por línea materna. Para responder a esta pregunta se buscó, en primer lugar, estandarizar la extracción y la amplificación de ADN a partir de restos óseos de más de 500 años de antigüedad. A partir de esta extracción y amplificación, se podrán obtener las secuencias de la región hipervariable (HVS I) del ADN mitocondrial (ADNmt) proveniente de estos fragmentos óseos antiguos. Los resultados muestran que fue posible extraer y amplificar el ADN antiguo en 3 de 3 individuos procesados. Este ADN está siendo sometido actualmente a análisis de autenticidad, y a partir de éste se podrán establecer las secuencias genéticas correspondientes que podrán ser comparadas primero con la secuencia *Cambridge Reference Sequence* CRS, y luego entre sí, para establecer eventuales filiaciones con individuos del mismo cementerio y con otras poblaciones amerindias y no amerindias reportadas en la literatura científica.

## ABSTRACT

The purpose of this project is to extract and amplify DNA from individuals belonging to funerals for the upper hierarchy in a population sample from the archaeological discovery of Tibanica, Soacha, in the Sabana of Bogotá, a village belonging to the society Muisca Late period (1200-1600 AD) with a total of 586 tombs with human remains, some of which contained funerary offerings such as pottery, beads and gold figures, among other items. In particular, it seeks to determine whether individuals belonging to the burials of the upper hierarchy are related or not in their maternal lineages. To answer this question we first attempted, to standardize the extraction and amplification of DNA from skeletal remains of more than 500 years old. From this extraction and amplification may be obtained sequences of the hypervariable region (HVS I) of mitochondrial DNA (mtDNA) from these ancient bone fragments. The results show that it was possible to extract and amplify ancient DNA in 3 of 3 individuals who were carefully processed. This DNA is currently undergoing analysis of authenticity, and the corresponding genetic sequences may be compared first with the CRS sequence, and then each other, to establish possible affiliations will be established with other individuals in the same cemetery and in other Amerindian and non-Amerindian populations reported in the scientific literature.

## **1. INTRODUCCION**

La mayoría de las investigaciones que se han llevado a cabo en poblaciones precolombinas para conocer la historia del poblamiento de América, se han hecho principalmente a partir de estudios arqueológicos y antropológicos basados en caracterizaciones de tipo morfológico y cultural, centrándose en los artefactos encontrados.

Recientemente, se ha encontrado que mediante otro tipo de datos y aproximaciones directas como los estudios genéticos y moleculares, se pueden caracterizar y conocer los mecanismos evolutivos que han modulado el genoma de las poblaciones humanas. Sin embargo, la mayoría de las hipótesis y teorías planteadas sobre el poblamiento de América basadas en estudios genético-moleculares provienen de muestras de indígenas actuales, lo que hace que proporcionen sólo una prueba indirecta de los procesos históricos que han formado a través de largos períodos de tiempo.

No obstante, se ha venido realizando una cantidad creciente de estudios con ADN extraído de restos antiguos, ya que a partir del ADN antiguo se pueden confirmar o descartar filiaciones propuestas por otras aproximaciones científicas, como las que se basan en tipificaciones moleculares de comunidades contemporáneas. Para esto, se utilizan secuencias obtenidas a partir de ADN mitocondrial (ADNmt) que, debido a su alta tasa de mutación y comparación con el ADN nuclear, permite mayor resolución en escalas de tiempo cortas y, como es heredado exclusivamente por línea materna y se asume una recombinación nula, se puede discriminar y cuantificar la relación genética entre individuos y poblaciones emparentadas, aunque se trate de poblaciones alejadas en el tiempo.

El presente proyecto busca, principalmente, lograr la estandarización de la extracción y la amplificación del ADN conservado en restos óseos antiguos, para luego poder obtener la secuencia de la región hipervariable (HVS I) de la región control de ADN mitocondrial proveniente de fragmentos óseos de más de 500 años de antigüedad. Con base en esta información se podrán establecer las relaciones genéticas entre individuos pertenecientes a los entierros correspondientes a las altas jerarquías en una muestra poblacional muisca del hallazgo arqueológico de la vereda de Tibanica, Soacha, en la sabana de Bogotá. Además de evaluar la eficiencia de los métodos de extracción y amplificación de ADN antiguo provenientes de muestras de diferentes individuos se podrá responder la pregunta planteada por los antropólogos de si los individuos pertenecientes a los entierros de las altas jerarquías están relacionados o no por línea materna, y se podrá generar y aportar información sobre los haplotipos y los haplogrupos presentes en los fragmentos óseos de la población muestreada. De esta forma se podrá brindar información que pueda ser usada como guía para determinar en forma directa los linajes mitocondriales presentes en poblaciones humanas antiguas, de modo que se puedan evaluar patrones de residencia, migración y relaciones genéticas de los grupos aborígenes.

## **2. MARCO TEÓRICO Y REVISIÓN DE LITERATURA:**

### **2.1 El ADN Mitocondrial (ADNmt):**

El ADN mitocondrial (ADNmt) es un genoma circular pequeño de aproximadamente 16,5 Kb de tamaño (Hedman *et al*, 2007) localizado dentro de la mitocondria en el citoplasma de la célula. El ADNmt codifica para solo 13 polipéptidos, los cuales son subunidades esenciales para la generación de energía en la mitocondria. Adicionalmente, el mtDNA posee una gran región no codificadora conocida como Región Control o *D-loop*, ubicada entre las posiciones 16.024 y 576 (Brandon *et al*, 2005). Dentro de esta secuencia, se han descrito dos segmentos con tasas de mutación mayores a la de la región codificante, los cuales han sido denominados *Segmentos Hipervariables I y II* (HVS I y HVS II) (Brandon *et al*, 2005).

El ADNmt presenta una tasa de mutación 5 a 10 veces más alta que el DNA nuclear (Excoffier & Langaney, 1989) y, como consecuencia, la población humana actualmente alberga un alto nivel de polimorfismos específicos en su ADNmt, cuyo análisis ha permitido la reconstrucción del proceso de poblamiento del hombre prehistórico (Wallace *et al*, 1999). Además, el mtDNA es heredado estrictamente por línea materna provocando que a lo largo de la historia de los linajes femeninos humanos, se hayan ido acumulando mutaciones neutras y deletéreas por miles de años y, por tanto, dada la recombinación nula que sufren estas moléculas, el número de diferencias en la secuencia del mtDNA que existe entre dos individuos es proporcional al tiempo desde que estos compartieron un mismo ancestro materno (Wallace, 1995). El ADN mitocondrial ha probado ser útil para elucidar afinidad genética de las poblaciones humanas.

El hecho de que no se produzca recombinación en el ADNmt, permite el seguimiento de los “*haplogrupos*”, constituidos por genes que están muy cercanos y pasan en bloque a sus descendientes sin que haya recombinación entre genes paternos y maternos. En el caso del ADNmt, todos los genes y regiones entre éstos, como la Región Control, pasan también en bloque. Sin embargo, al ser escasas las mutaciones en la región codificante del ADNmt, se ha determinado que todas las poblaciones que existen en el mundo actualmente se representan en aproximadamente 15 haplogrupos distintos siendo el resto variaciones dentro de esos haplogrupos, lo cual puede ser denominado, a nivel individual, como “*haplotipo*”.

De esta manera, el análisis de la variación genética en las secuencias de nucleótidos de ADN mitocondrial ha permitido desentrañar aspectos evolutivos sobre el origen de las poblaciones humanas modernas y la aclaración de los antiguos patrones de la migración humana.

### **2.2 ADN antiguo:**

El ADN antiguo es aquel que es obtenido de los restos de organismos muertos, o de restos humanos del período histórico (últimos 30.000 años) y período prehistórico (más de 30.000



años de antigüedad) (Poinar y Poinar, 1995). Con este ADN, se tiene la posibilidad de prospectar en forma directa los linajes mitocondriales presentes en poblaciones humanas antiguas de modo que se puedan evaluar patrones de residencia, migración y relaciones genéticas de los grupos aborígenes (Moraga *et al*, 2001; Mooder *et al*, 2005), proporcionando un medio de seguimiento de cambios genéticos ocurridos en épocas pasadas (Gilbert *et al*, 2005), lo que permite confirmar o refutar hipótesis planteadas con base en evidencias obtenidas a partir de ADN actual (Silva *et al*, 2008).

A pesar de las ventajas que se presentan al trabajar con ADN antiguo, la extracción y la amplificación exitosa del ADN de restos humanos antiguos es particularmente difícil porque cuando un organismo muere, su ADN normalmente es degradado por nucleasas endógenas, por esto, en especímenes antiguos, por lo general, no se conservan las estructuras celulares e incluso, debido a modificaciones químicas, puede ser difícil obtener el ADN en una solución acuosa. Es decir, solo bajo circunstancias afortunadas, como desecación rápida, bajas temperaturas o altas concentraciones de sal, los polinucleótidos pueden conservarse antes de que todos los ácidos nucleicos sean reducidos a mononucleótidos (Baubliene *et al*, 2003).

Por otra parte, los restos antiguos a menudo contienen una gran cantidad de inhibidores de PCR que interfieren con la amplificación del ADN y que son co-purificados con el ADN antiguo. Así, los métodos de extracción de ADN antiguo deben hacer frente a un número de factores que a veces son difíciles de conciliar (Rohland & Hofreiter, 2007). Estos factores pueden proceder tanto del medio ambiente de los restos en forma de ácidos húmicos, ácidos fúlvicos, tanino, o bien por degradación en la muestra biológica. Es decir, el ADN antiguo es modificado en exceso y estas modificaciones, las cuales son principalmente atribuidas a procesos oxidativos, son responsables de la baja tasa de recuperación del ADN intacto de especímenes arqueológicos (Kalmar *et al*, 2000).

Los factores que comúnmente impiden la amplificación del ADN de restos antiguos pueden variar entre los tipos de sitios de entierro, ya que las características del ambiente en el que se encuentra depositada una muestra, pueden retardar e incluso detener el proceso de degradación. Los factores que más afectan son la temperatura, pH, humedad y la presencia de ciertos componentes del suelo. Las temperaturas bajas favorecen la conservación óptima del hueso, sin embargo si la temperatura es elevada no garantiza la correcta conservación del material genético aunque conduzca a otras situaciones favorables como sequedad y ausencia de microorganismos (Höss *et al*, 1996).

Cuando el ADN puede ser recuperado de restos antiguos, el tipo de muestra más recomendable son los dientes y huesos antiguos, porque estos, además de servir como material de referencia para la antropología biológica, también, tienen muchas ventajas con respecto a otros materiales excavados (Baubliene *et al*, 2003), pues estos son más abundantes que los restos de tejido blando y generalmente están mejor preservados (Kalmar *et al*, 2000). Esto puede deberse al bajo contenido en agua y en enzimas en tales tejidos, aunque también se ha propuesto que el ADN podría resultar “secuestrado” por la hidroxiapatita de los mismos, lo

que lo protegería de la acción de las enzimas degradadoras y otros efectos deletéreos ambientales. Esto causa, que el hueso generalmente se conserve en los entierros y sea el material más abundante en los sitios arqueológicos. Cuando el material es bien preservado, es bastante fácil de coleccionar, y por esta razón que muchos museos en todo el mundo contienen extensas colecciones osteológicas (Baubliene *et al*, 2003).

### **2.3 Poblamiento de América:**

La considerable diversidad cultural, complejidad lingüística y variación biológica de los nativos americanos ha sido atribuida a múltiples migraciones de individuos asiáticos a las Américas (Torrioni *et al*, 1992). De hecho, algunos investigadores han indicado que todas las tribus amerindias descendieron desde un pequeño grupo de Siberianos cazadores-recolectores quienes cruzaron el estrecho de Bering en una sola migración hace 12.000 a 15.000 años (Schurr *et al*, 1990). Greenberg *et al*. (1986) propusieron un modelo basado en evidencias genéticas, lingüísticas y dentales según el cual tres migraciones transberingias distintas que ocurrieron durante el Pleistoceno tardío hacia la colonización del Nuevo Mundo. La primera migración se produjo hace 15.000 a 30.000 años. Sus descendientes, los *Amerindios*, ocuparon América del Sur, Centroamérica y parte de América del Norte. Los indios *Na-Dene* son los descendientes de la segunda migración hace 10.000 a 15.000 años. La última migración se produjo hace 6.000 a 9.000 años y dio lugar a los *Eskimo-Aleutianos* (Monsalve *et al*, 1996; Torrioni *et al*, 1992).

Dentro de las evidencias genéticas, se encuentran las evidencias brindadas por ADNmt que muestran concordancia con el modelo de migración a través del Estrecho de Bering, y con base en las cuales se propuso que los primeros colonizadores del Nuevo Mundo podían agruparse en cuatro haplogrupos mitocondriales denominados A, B, C y D, mientras que un quinto haplogrupo X, se limitaría a América del Norte (Melton *et al*, 2007). Todos los haplogrupos del ADNmt se asocian con varias mutaciones puntuales situadas en la región de control (CR) del genoma mitocondrial (Schurr *et al*, 1990, Torrioni *et al*, 1992, Monsalve *et al*, 1996). Las frecuencias de haplogrupos ADNmt difieren entre las poblaciones y a menudo se correlaciona con la afiliación cultural, familia lingüística, o ubicación geográfica. Las poblaciones que suelen compartir haplotipos fundadores tienden a ser geográficamente restringidas, lo que indica mutaciones más recientes. Esta restricción geográfica sugiere que las poblaciones estrechamente relacionadas comparten varios haplotipos derivados que son idénticos o difieren en algunas mutaciones (Melton *et al*, 2007).

El panorama más aceptado de las migraciones transberingias, basado en evidencias de mtDNA, plantea que una o varias migraciones de grupos humanos que poseían los haplogrupos A, C y D atravesaron Beringia por tierra y llegaron al actual territorio de Alaska. Muchos años más tarde, arribó a América una segunda oleada con el haplogrupo B, pero esta vez ocurrió a lo largo de las costas empleando la navegación como medio de transporte (lo cual se deduce

debido a la ausencia de este haplogrupo en Siberia) (Wallace, 1995). Por otro lado, se ha propuesto que la diversidad genética de los nativos americanos actuales debió haberse reducido considerablemente después del arribo de los conquistadores europeos, por lo cual es posible que muchos de los haplotipos que ingresaron con los inmigrantes asiáticos pudieron haber desaparecido (Schurr *et al.*, 1990). Si esta hipótesis es cierta, ello significaría que los estudios de ADNmt en restos humanos antiguos deberán presentar mayor diversidad de haplotipos que los nativos actuales (Stone & Stoneking, 1998). Una vez que los primeros pobladores cruzaron América del Norte dejando huellas de su presencia en varios sitios arqueológicos, se desplazaron por América Central hacia América del Sur (Monsalve *et al.*, 1996).

## **2.4 Poblamiento de Sur América:**

Según Bennett & Bird (1964), cazadores nómadas, pescadores y recolectores cruzaron el Istmo de Panamá y ocuparon la región andina después de transitar por los valles de los ríos Cauca y Magdalena hace aproximadamente 12.000 años. Posteriormente un grupo migró hacia el este de Venezuela y Guyana, y la mayoría de los migrantes se desplazó hacia el sur hasta llegar al noreste argentino. Posteriormente los nómadas poblaron las altiplanicies del Este de Brasil y se expandieron hacia las Pampas y Patagonia para llegar a Tierra del Fuego hace 9.000 años (Monsalve *et al.*, 1996). Sin embargo, el número de migraciones en el continente sigue sin resolverse y el tema ha sido extensamente debatido (Dillehay, 2003; Pucciarelli, 2004).

Algunos investigadores abogan por una sola población fundadora de América del Sur (Moraga *et al.*, 2000), donde se propone que las poblaciones actuales de Amerindios son descendientes directos de la primera migración del Pleistoceno y que la ocupación del territorio impidió migraciones subsecuentes (Fusselli *et al.*, 2003; Melton *et al.*, 2007). Otros están a favor del modelo de dos migraciones (Keyeux *et al.*, 2002), donde se propone que los primeros pobladores (no-mongoloides) arribaron al continente durante el Pleistoceno tardío – Holoceno temprano (~ 15.000 AAP), pero fueron reemplazados posteriormente por otra migración (~10.000 AAP) de individuos con rasgos mongoloides cuya descendencia encontramos en los indígenas actuales (Pucciarelli, 2004). Recientemente, Keyeux *et al.* (2002) observaron 25 poblaciones indígenas de Colombia en donde se encontró una distribución irregular de los haplogrupos mitocondriales nativos Americanos, interrelacionados con diferentes rutas migracionales restringidas por las barreras geográficas naturales de nuestro territorio, específicamente por la cordillera de los Andes, que permite la posibilidad de rutas internas de desplazamiento diferentes, como por la vía de la costa Caribe hacia el Orinoco amazónico y a lo largo del Pacífico (Keyeux *et al.*, 2002),

Esta ruta de migración está asociada con los grupos de lengua Chibcha (Melton *et al.*, 2007), cuyas poblaciones se distribuyen desde la zona oriental de Honduras hasta la costa oriental de Lago de Maracaibo y a través de la cual han divergido varios lenguajes relacionados, en un espectro de tiempo aproximado de 7000 años (Melton *et al.*, 2007).

Se cree que la diferenciación de subfamilias regionales que comenzó hace 5.000 años a causa del cambio a la agricultura y la adaptación a un estilo de vida sedentario (Melton *et al*, 2007).

Una de estas subfamilias regionales es la población muisca, con una amplia zona de distribución en los Andes colombianos y donde su complejidad social, económica y política fue una de las más notables del territorio colombiano en la época prehispánica.

## **2.5 Los Muiscas:**

Evidencias arqueológicas parecen indicar que los muiscas llegaron al altiplano cundiboyacense en sucesivas oleadas migratorias procedentes del norte del país y que, una vez asentados en el altiplano, lograron una integración regional. Se constituyeron en los grupos tardíos de mayor densidad de población, habiendo alcanzado un alto nivel de organización sociopolítica enmarcado en el concepto de cacicazgos, con una economía que se sustentaba en la producción de productos agrícolas, y en donde los excedentes de producción se utilizaban para el sostenimiento de labores especializadas de tiempo completo en el campo político, económico y artesanal. El poder político tenía un carácter permanente, y era heredado familiarmente (Rodríguez, 1999).

## **1. MATERIALES Y METODOS:**

### **3.1 Población de estudio:**

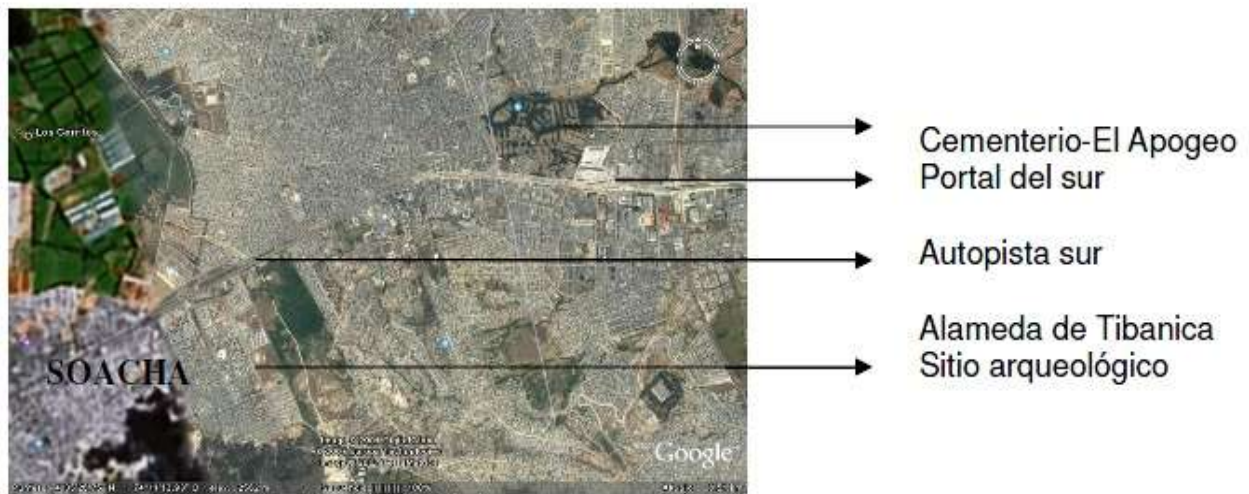
Las muestras destinadas a este estudio corresponden a fragmentos óseos de 10 individuos provenientes de entierros correspondientes a las altas jerarquías de un yacimiento arqueológico ubicado en el terreno en donde se construyó posteriormente la urbanización Alameda de Tibanica (Soacha), una aldea perteneciente a la sociedad Muisca del periodo Tardío (1200-1600 d.C.). En la Tabla 1 se relacionan las muestras que fueron puestas a disposición por el equipo de trabajo del Laboratorio de Arqueología y Antropología Física de la Universidad de los Andes.

A partir de estas muestras se tomaron los huesos que aparecen resaltados en negrilla para la correspondiente extracción de ADN.

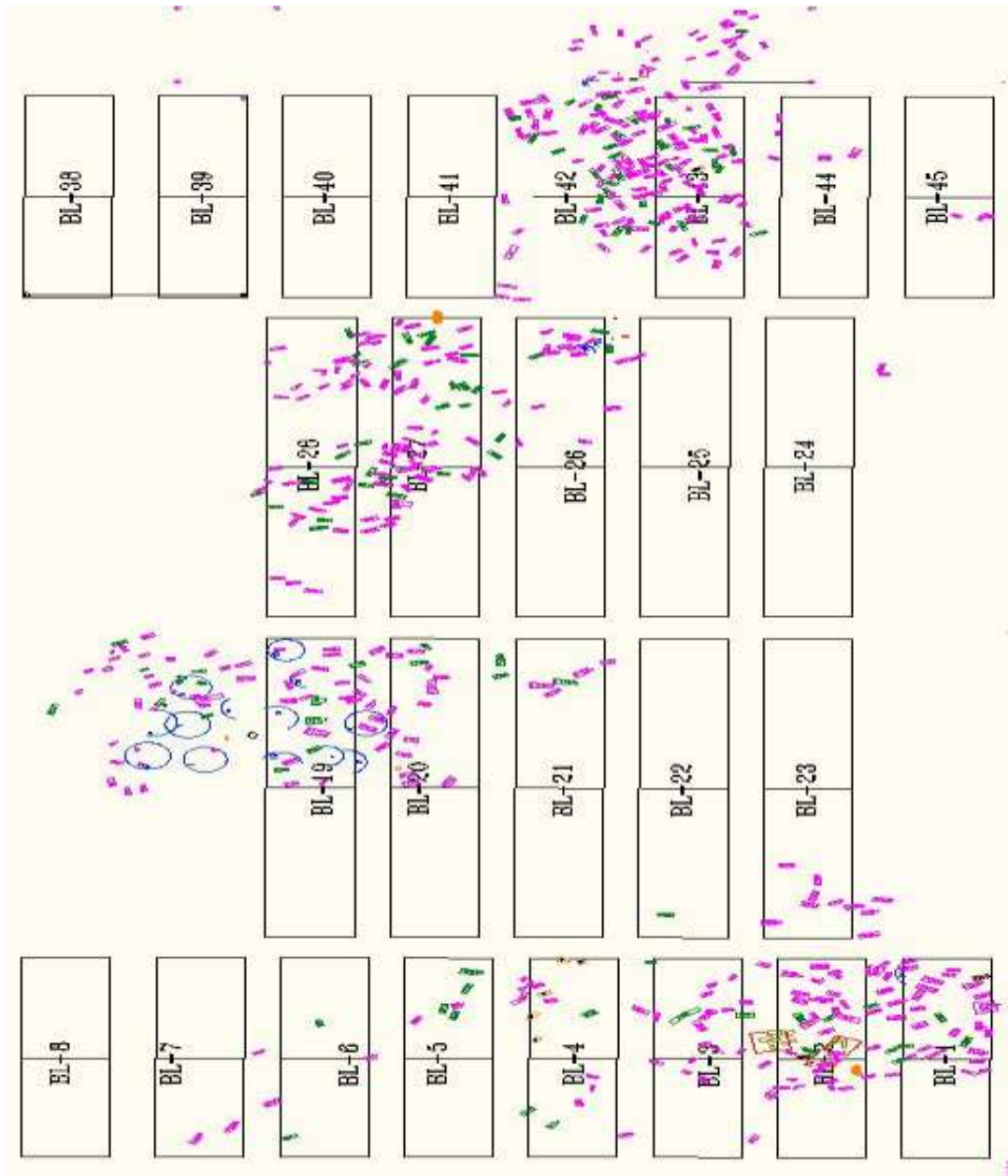
**Tabla 1.** Descripción de los individuos hallados en Tibanica (Soacha) y la nomenclatura empleada para denominar la población de estudio.

ID	Tipo de muestra
M3198 A	Costilla, diente, cráneo
M3198 B	Diente, cráneo
<b>M2834 ind 1</b>	Costilla, <b>fémur izq</b> , <b>fémur der</b> , tibia
<b>M2834 ind 2</b>	Fémur, <b>fémur</b> , tibia
M 3210 ind 1	Costilla, fémur
<b>M1038</b>	Costilla, <b>fémur</b> , tibia
M1042	Costilla, fémur
M816	Radio, tibia, diente
M930	Costilla, fémur, diente
M951	Costilla, fémur, cráneo
M1028	Cubito, cráneo
M3117	Costilla

En la Figura 1 se muestra una fotografía aérea del sector arqueológico, y en la Figura 2 se representa la distribución de los entierros en el contexto de la excavación.



**Figura 1.** Ubicación del sitio arqueológico Alameda de Tibanica



**Figura 2.** Distribución de los entierros en el contexto de la excavación en el sector de Tibanica. Las tumbas correspondientes a los individuos M2834 ind1, M2834 ind2 y M1038 (puntos de color naranja) están localizadas respectivamente en los sectores BL-27, BL-27 y BL-2. Las tumbas en verde han sido clasificadas por los arqueólogos y antropólogos como de alta jerarquía en la medida en que los restos óseos presentaron ajuar asociado.

### **3.2 Maceración y digestión del tejido óseo:**

- De acuerdo con el protocolo sugerido por Kalmar *et al.* (2000), inicialmente se eliminó la superficie del fragmento óseo (2 gr aproximadamente) lijando suavemente el hueso con una lija estéril.
- El hueso se sumergió en SDS al 10% por un instante y luego se lavó con abundante agua estéril.
- Por último, el hueso se sumergió en alcohol durante 2 min y se lavó con abundante agua.
- Se sumergió en hipoclorito de sodio al 2% durante 5 min y se lavo con abundante agua.
- Los fragmentos de hueso se dejaron secar a temperatura ambiente durante 24 horas.
- A continuación, el fragmento se envolvió en papel aluminio estéril y se pulverizó golpeándolo fuertemente.
- El hueso pulverizado se colocó en un tubo Falcon® estéril de 15 ml.
- Se adicionaron 5 ml de una solución jabonosa compuesta por 4,7 ml de buffer de lisis celular y 300 µl de solución de proteinasa K en una concentración de 0.75 mg/ml.
- La reacción se colocó en shaker a 55 °C durante 48 horas.

<b>Buffer de Lisis Celular</b>
50 ml de EDTA 0.5 M pH: 8.0
200 ml de SDS al 10%
Completar a 1000 ml con H2O destilada.
No Autoclavar.

### **3.3 Extracción ADN hueso antiguo**

- Los tubos Falcon® se centrifugaron a 3000 r.p.m. por 5 minutos.
- El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo Falcon® estéril con una micropipeta
- Se adicionó al sobrenadante 900µl de solución precipitante de proteínas (Acetato de amonio 10M).

<b>Solución Precipitante de Proteínas</b>
385,4 g de Acetato de Amonio
Completar a 500 ml con H2O destilada.
Autoclavar.

- Se mezcló suavemente por inversión, varias veces hasta completar homogenización.
- Se llevó al congelador (-20°C) por 5 minutos.
- Se centrifugó a 4000 r.p.m. por 20 minutos.

- Se tomó el sobrenadante, se llevo a un nuevo tubo Falcon® y se repitieron todos los pasos para extracción anteriormente mencionados (900 µl de solución precipitante, mezclar por inversión, llevar a -20°C por 5 min y centrifugar a 4000 rpm por 20 min).
- Se adicionó el sobrenadante a un tubo Falcon® que contenía 3 ml de Isopropanol (100%) frío.
- Se esperaron unos minutos y se mezcló suavemente los tubos por inversión hasta observar la aparición del ADN (burbujas).
- Se colocaron los tubos a -20°C por 15 minutos.
- Se centrifugaron a 5000 r.p.m. por 30 minutos.
- Se descartó el sobrenadante y se conservó el pellet.
- Se dejaron secar los tubos invertidos sobre papel absorbente en el horno a 37°C por 1 hora.
- Se re-suspendió el pellet de ADN en 200 µl de agua estéril.
- Se dejó a temperatura ambiente por 24 horas.

### **3.4 Re-extracción con Kit de Corpogen (purificación)**

- El contenido obtenido anteriormente se llevó a tubos eppendorff (1,5 ml) con micropipeta. luego Vortex.
- Se añadió, 200 µl de la solución # 2 del Kit de Corpogen (buffer de lisis) el cual debe estar a temperatura ambiente.
- Se mezcló suavemente por inversión durante 5 minutos
- Se agitaron los tubos a 37°C (Shaker) por 1 hora
- Se adicionó un volumen equivalente a la suma de los volúmenes anteriores (aprox 400 µl) de solución precipitante (solución salina No 3 del kit Corpogen). Vortex.
- Se llevaron los tubos a congelación (-20°C) por 15 minutos.
- Se centrifugó a 3.000 r.p.m. por 5 minutos.
- Se tomó el sobrenadante y se puso en otro tubo.
- Se adicionaron 400 µl de isopropanol frío al 90%. Mezclar por inversión.
- Se centrifugaron los tubos a 13.000 r.p.m. por 10 minutos.
- Se descartó el sobrenadante y se conservó el pellet
- Se dejaron secar los tubos invertidos sobre papel absorbente a 37°C por 1 hora.
- Se re-suspendió el pellet en 50 µl de solución de reconstitución del Kit de Corpogen.
- Se dejó secar a temperatura ambiente por 24 horas.

### **3.5 Amplificación**

Para el caso del presente estudio, las condiciones de amplificación se estandarizaron con base en el protocolo propuesto por Vigilant *et al* (1989), utilizando ADNmt extraído de restos óseos de pobladores Muisca de la Sabana de Bogotá.



El protocolo de amplificación, empleando el kit Tucan Taq® de Corpogen (Taq polimerasa, buffer 10X y MgCl<sub>2</sub> 25mM) se describe a continuación:

1. Solución de amplificación: Buffer 1X, 2.0mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM dNTPs, 0,3μM de cada primer y 1,0 U/μl de Taq polimerasa en un volumen final de 25μl.
2. Regiones amplificadas: la amplificación se realiza con un conjunto de 2 pares de *primers* que amplifican segmentos sobrelapantes de la región HVS I del ADNmt, de tal forma que se pueda posteriormente armar la secuencia completa del mismo. El juego de *primers* utilizados son:

**Tabla 2.** *Primers* empleados para la amplificación

<b>Primer</b>		<b>Secuencia</b>	<b>Pb</b>	<b>Referencia</b>
BR13	L16209	5'- CCATGCTTACAAGCAAGT - 3'	18	Higuchi <i>et al.</i> 1988
BR12	H16401	5' – TGATTTACGGAGGATGGTG - 3'	20	Vigilant <i>et al.</i> , 1989

3. Ciclos de amplificación: Dada la dificultad en la amplificación de ADN arcaico, fue necesaria la implementación de un sistema de dos amplificaciones sucesivas, en la segunda de las cuales se emplea el producto de la amplificación de la primera como fuente de ADN (re amplificación).

Los ciclos de temperatura seguidos para el par de *primers* consistieron en 33 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1 minuto, anillamiento a 55 °C por 1 minuto y elongación a 72 °C por 1 minuto.

### **3.6 Análisis de los datos:**

El análisis de los resultados de la presente investigación se hará con base en los geles correspondientes a cada extracción y amplificación, los cuales permitirán visualizar la presencia o ausencia de contaminación con base en los controles negativos y positivos incluidos en cada preparación. Estos resultados serán tabulados para indicar la correcta obtención y amplificación del ADN a partir de los restos óseos de manera específica en cada una de las muestras procesadas.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 MUESTRA 1: M2834 ind 1 fémur 1. Adulto de más de 35 años de edad.**

Esta muestra se procesó en el Instituto de Genética Humana (IGH) Pontificia Universidad Javeriana

#### **4.1.1 Extracción de ADN**

Se siguieron los protocolos de extracción y re extracción de ADN descritos en la sección de materiales y métodos.

#### **4.1.2 Amplificación del ADN:**

Antes de empezar la amplificación del ADN extraídos se trataron de eliminar inhibidores de PCR realizando las siguientes diluciones: 1/2; 1/4; 1/8; 1/16; 1/32

Inmediatamente después de hacer las diluciones, se procedió a realizar la primera PCR, con su respectivo control negativo, además un Control Positivo, para verificar que la muestra de ADN arcaico no se contaminó con el ADN de la persona que lo manipuló. Los controles y las muestras se sirvieron en el orden en que aparecen relacionadas a continuación.

##### **4.1.2.1 Primera PCR:**

1. DNA de Diana Sánchez (Control Positivo)
2. M2834 ind 1 (Dilución 1/2)
3. M2834 ind 1 (Dilución 1/4)
4. M2834 ind 1 (Dilución 1/8)
5. M2834 ind 1 (Dilución 1/16)
6. M2834 ind 1 (Dilución 1/32)
7. Control negativo de extracción
8. Control negativo de PCR (agua + reactivos)

Por último se sirvió el Master Mix, para iniciar las reacciones de amplificación de manera sincronizada

**4.1.2.2 Re-amplificación:** se utilizaron los productos de la primera PCR y un Control Negativo de Re-amplificación:

1. DNA de Diana Sánchez (Control Positivo)
2. M2834 ind 1 (Dilución 1/2)

3. M2834 ind 1 (Dilución 1/4)
4. M2834 ind 1 (Dilución 1/8)
5. M2834 ind 1 (Dilución 1/16)
6. M2834 ind 1 (Dilución 1/32)
7. Control negativo de extracción
8. Control negativo de PCR (Producto de CN de la primera PCR + reactivos)
9. Control Negativo de re amplificación (agua + reactivos)

Por último se sirvió el Master Mix, con el propósito de iniciar las reacciones de amplificación de manera sincronizada.

#### **4.1.3 Visualización del ADN:**

En la tabla 3 se observan los productos de la re-amplificación de la muestra M2834 ind 1, en un gel de agarosa al 2%.

**Tabla 3.** Visualización productos amplificados de la muestra M2834 ind 1

CARRIL	PRODUCTO	BANDA
1	ADN Diana	+++
2	M2834 ½	-
3	M2834 ¼	-
4	M2834 1/8	++
5	M2834 1/16	++
6	M2834 1/32	++
7	PESO MOLECULAR	+++
8	ADN Diana	+++
9	M2834 ½	+
10	M2834 ¼	++
11	M2834 1/8	+++
12	M2834 1/16	+++
13	M2834 1/32	+++
14		
15	CN extracción	+++
16		
17	CN PCR 1	+++
18	CN re amplificación	-
19		

Pozos 1-6 y 15: Primera PCR; Pozos 8-13 y 17-18: re amplificación. (+++) Significa banda nítida. (++) Banda tenue. (+) Banda muy tenue. (-) No hay banda. **(+++)** resultados anómalo

## **4.2 MUESTRA 2: M2834 ind 1 fémur 2. Adulto de más de 35 años de edad.**

Esta muestra se procesó en el Laboratorio de Identificación Humana, Instituto de Genética, Universidad Nacional de Colombia

### **4.2.1 Extracción de ADN:**

Este procedimiento se realizó en una cabina de extracción con las siguientes condiciones previas a la extracción de ADN:

1. Se limpió la cabina con hipoclorito de Sodio al 2%
2. Se limpiaron las micropipetas con alcohol al 70%
3. Se colocaron las puntas, tubos, guantes, bata, gorro, tapabocas, reactivos y micropipetas de luz UV durante 30 minutos.

Luego se empezó la extracción de ADN, y para este caso en la re-extracción, se utilizaron nuevas alícuotas del Kit de purificación de Corpogen.

Se colocaron a temperatura ambiente durante media hora un tubo con la muestra M2438 y un tubo con el CN de extracción.

### **4.2.2 Amplificación de ADN:**

Previo a la amplificación de DNA se siguió el siguiente protocolo:

1. La PCR se realizó en un cuarto exclusivo para PCR
2. Se limpió el mesón de PCR con hipoclorito de Sodio al 2%
3. Se limpiaron las micropipetas con alcohol al 70%
4. Se colocaron las puntas, tubos, guantes, bata, gorro, tapabocas y micropipetas de luz UV durante 30 minutos.

#### 4.2.2.1 Primera PCR:

Se sirvió el Master Mix en cada tubo

1. Control negativo de PCR (agua + reactivos)
2. Control negativo de extracción
3. M2834 ind 1 (Dilución 1/2)
4. M2834 ind 1 (Dilución 1/4)
5. M2834 ind 1 (Dilución 1/8)
6. M2834 ind 1 (Dilución 1/16)
7. M2834 ind 1 (Dilución 1/32)
8. DNA de Diana Sánchez (Control Positivo)

4.2.2.2 Re-amplificación: se utilizaron los productos de la primera PCR y un Control Negativo. se siguió el mismo protocolo de limpieza y se sirvieron los reactivos en el siguiente orden:

Se sirvió el Master Mix en cada tubo

1. Control negativo de re amplificación (agua + reactivos)
2. Control negativo de PCR (producto del CN de la primera PCR)
3. Control negativo de extracción
4. M2834 ind 1 (Dilución 1/2)
5. M2834 ind 1 (Dilución 1/4)
6. M2834 ind 1 (Dilución 1/8)
7. M2834 ind 1 (Dilución 1/16)
8. M2834 ind 1 (Dilución 1/32)
9. DNA de Diana Sánchez (Control Positivo)

#### 4.2.3 Visualización de ADN:

**Tabla 4.** Visualización de productos amplificados de la muestra M2834 ind 1 fémur 2

CARRIL	PRODUCTO	BANDA
1	CN extracción	-
2	CN PCR 1	-
3	CN extracción re amplificación	+++
4	CN PCR re amplificación	++
5	CN re amplificación	-
6		
7	M2834 1/2	-
8	M2834 1/4	-
9	M2834 1/8	-
10	M2834 1/16	-
11	M2834 1/32	-
12	ADN Diana	+++
13	PESO MOLECULAR	+++
14		
15	M2834 1/2	-
16	M2834 1/4	-
17	M2834 1/8	++
18	M2834 1/16	++
19	M2834 1/32	++
20	ADN Diana	+++

Pozos 1-2 y 7-12: Primera PCR; Pozos 3-5 y 15-20: re amplificación. (+++) Significa banda nítida. (++) Banda tenue. (-) No hay banda. **(+++); (++) Resultados anómalos**

### **4.3 MUESTRA 3: M2834 ind 2 fémur: Individuo de 15 – 20 años de edad**

Esta muestra se procesó en el Laboratorio de Identificación Humana, Instituto de Genética, Universidad Nacional de Colombia

#### **4.3.1 Extracción de ADN:**

Este procedimiento se realizó en una cabina de extracción con las siguientes condiciones previas a la extracción de ADN:

1. Se cambiaron las alícuotas de los reactivos de extracción y de PCR.
2. Se esterilizaron puntas y tubos eppendorff
3. Se limpió la cabina con hipoclorito de Sodio al 2%
4. Se limpiaron las micropipetas con alcohol al 70%
5. Se colocaron las puntas, tubos, guantes, bata, gorro, tapabocas, reactivos y micropipetas de luz UV durante 30 minutos.

En este hubo ciertos cambios en la extracción del ADN:

- a. Se dejaron secando toda la noche dentro de la cabina de extracción
- b. El ADN se re suspendió en 200 µl de agua y se puso en un shaker a 56°C para que el ADN se hidrate.
- c. Se dejaron a temperatura ambiente durante una hora.
- d. Se colocó en SpeedVac durante 30 minutos.

#### **4.3.2 Amplificación de ADN:**

No hubo cambios con respecto a la muestra 2

### 4.3.3 Visualización de ADN:

**Tabla 5.** Visualización productos amplificados de la muestra M2834 ind 2

CARRIL	PRODUCTO	BANDA
1	CN extracción	-
2	CN PCR 1	-
3	CN extracción re amplificación	+++
4	CN PCR re amplificación	-
5	CN re amplificación	-
6		
7	M2834 1/2	-
8	M2834 1/4	-
9	M2834 1/8	-
10	M2834 1/16	-
11	M2834 1/32	-
12	ADN Diana	+++
13	PESO MOLECULAR	+++
14		
15	M2834 1/2	-
16	M2834 1/4	-
17	M2834 1/8	-
18	M2834 1/16	-
19	M2834 1/32	-
20	ADN Diana	+++

Pozos 1-2 y 7-12: Primera PCR; Pozos 3-5 y 15-20: re amplificación. (+++) Banda nítida. (-) No hay banda. (+++) resultados anómalos



#### **4.4 MUESTRA 4: M1038 fémur: Individuo de 18 meses de edad**

Después de la estandarización con nuevos primers y nuevos reactivos, se prosiguió con la muestra 4.

Esta muestra se procesó en el Laboratorio de Identificación Humana, Instituto de Genética, Universidad Nacional de Colombia

##### **4.4.1 Extracción de ADN:**

Este procedimiento se realizó en una cabina de extracción con las siguientes condiciones previas a la extracción de ADN:

1. Se prepararon nuevos reactivos de extracción
2. Se esterilizaron puntas y tubos eppendorff
3. Se limpió la cabina con hipoclorito de Sodio al 2%
4. Se limpiaron las micropipetas con alcohol al 70%
5. Se colocaron las puntas, tubos, guantes, bata, gorro, tapabocas, reactivos y micropipetas de luz UV durante 30 minutos.

En este hubo ciertos cambios en la extracción del ADN:

- a. En la re extracción, los tubos se colocaron a temperatura ambiente por una hora.
- b. Se colocaron los tubos en SpeedVac durante 30 minutos.

##### **4.4.2 Amplificación de ADN:**

Se siguió el mismo protocolo de asepsia que la muestra 3.

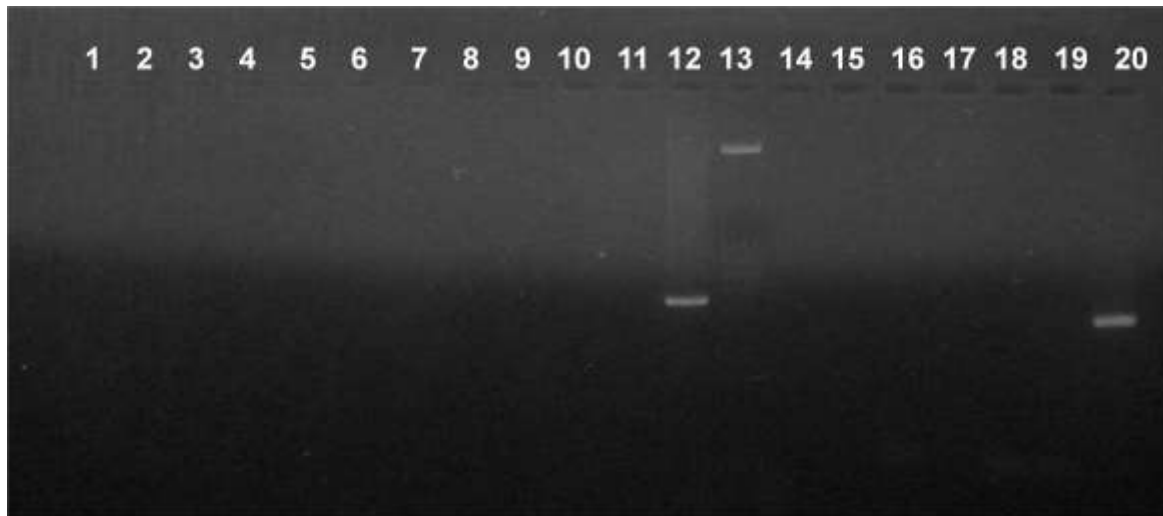
Para la primera PCR y la Re-amplificación se utilizaron nuevos primers y nuevo Master Mix.

#### 4.4.3 Visualización de ADN:

**Tabla 6.** Visualización productos amplificados de la muestra M1038

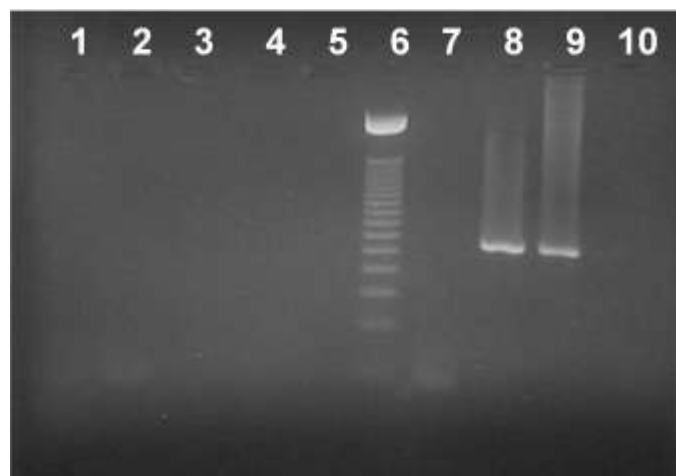
CARRIL	PRODUCTO	BANDA
1	CN extracción	-
2	CN PCR 1	-
3	CN extracción re amplificación	-
4	CN PCR re amplificación	-
5	CN re amplificación	-
6		
7	M2834 1/2	-
8	M2834 ¼	-
9	M2834 1/8	-
10	M2834 1/16	-
11	M2834 1/32	-
12	ADN Diana	+++
13	PESO MOLECULAR	+++
14		
15	M2834 1/2	-
16	M2834 1/4	-
17	M2834 1/8	-
18	M2834 1/16	-
19	M2834 1/32	-
20	ADN Diana	+++

Pozos 1-2 y 7-12: Primera PCR; Pozos 3-5 y 15-20: re amplificación. (+++) Banda nítida. (-) No hay banda.



**Figura 3a.** Gel de Agarosa de productos amplificados de la muestra M1038. 1) CN extracción; 2) CN extracción re amplificación; 3) CN PCR; 4) CN PCR re amplificación, 5) CN re amplificación; 7) M1038  $\frac{1}{2}$ ; 8) M1038  $\frac{1}{4}$ , 9) M1038  $\frac{1}{8}$ ; 10) M1038  $\frac{1}{16}$ ; 11) M1038  $\frac{1}{32}$ ; 12) ADN Diana; 13) Peso molecular; 15) M1038  $\frac{1}{2}$  re amplificación; 16) M1038  $\frac{1}{4}$  re amplificación; 17) M1038  $\frac{1}{8}$  re amplificación; 18) M1038  $\frac{1}{16}$  re amplificación; 19) M1038  $\frac{1}{32}$  re amplificación; 20) ADN Diana re amplificación.

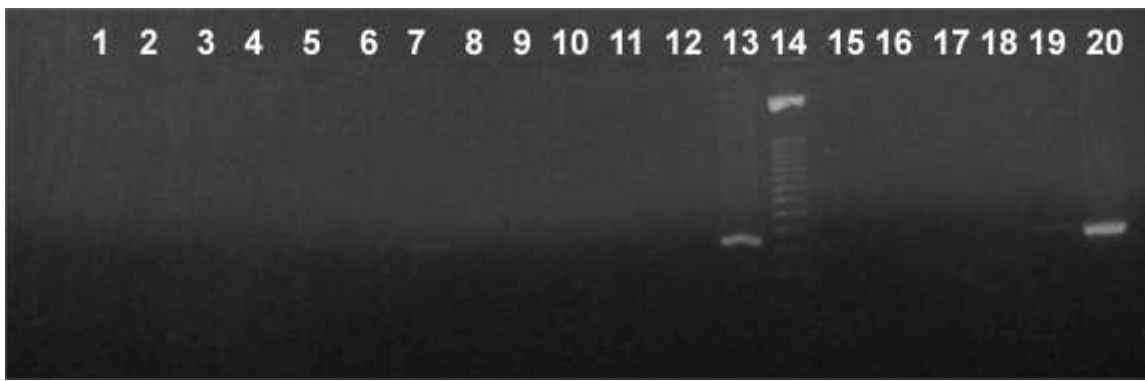
Para verificar que las muestras de ADN estuvieran amplificando bien, se cambió el peso molecular. En la figura 3b se muestra los controles negativos de la muestra 4 que en efecto salieron negativos, la muestra 4 que no amplifico y dos controles positivos.



**Figura 3b.** Gel de Agarosa de productos amplificados de la muestra M1038 con nuevo Peso Molecular. 2) CN extracción re amplificación; 3) CN PCR reamplificacion; 4) CN re amplificación; 6) Peso Molecular; 7) M1038  $\frac{1}{32}$  reamplificacion; 8) ADN Diana reamplificacion; 9) ADN Diana reamplificacion.

Luego, para comprobar si la contaminación de las muestras extraídas anteriormente eran producto de los *primers* contaminados, se hizo amplificación de las muestras 2 y 3 con el nuevo conjunto de *primers*, además como se muestra en la figura 3a, la muestra de hueso M1038 no amplificó, se utilizó albumina bovina (BSA) para eliminar cualquier inhibidor de PCR (Figura 4).

En la figura 4 se observa que la muestra de CN de M2834 ind 2 amplificó, mientras que los demás controles negativos no amplificaron, y la muestra M1038 amplificó con el BSA. Se utiliza BSA para eliminar los inhibidores de PCR de las diluciones de las muestras de hueso cuyo CN de extracción no salieron contaminados con los nuevos *primers*.



**Figura 4.** Gel de Agarosa de productos amplificados de las muestras M1038, M2834 ind1, M2834 ind2; 1) CN PCR; 2) CN M2834 ind 1; 3) CN M2834 ind 2; 4) CN PCR re amplificación, 5) CN M2834 ind 1 reamplificacion; 7) CN M2834 ind 2 reamplificacion; 9) M2834 ind 1; 10) M2834 ind 2; 11) M1038; 12) M1038 1/32; 13) ADN Diana; 14) Peso molecular; 16) M2834 ind 1 re amplificacion; 17) M2834 ind 2 re amplificacion; 18) M1038 reamplificacion; 19) M1038 1/32 reamplificacion; 20) ADN Diana reamplificacion;



**Figura 5.** Gel de Agarosa de productos amplificados de las muestras M1038 y M2834 ind1: 2) CN PCR, 3) CN PCR re amplificación; 4) CN re amplificación; 6) M2834 ind 1 1/32; 7) ADN Diana; 9) Peso Molecular; 11) M2834 ind 1 1/32 re amplificación; 12) M1038 1/32 reamplificación; 13) ADN Diana re amplificación.

En la figura 5 se muestra que la muestra M2834 ind 1 y la muestra M1038 son apropiadas para enviar a secuenciar.

## 5. DISCUSION DE RESULTADOS

El análisis de ADN antiguo de restos arqueológicos ha generado nuevas visiones en preguntas arqueológicas y antropológicas con respecto a la evolución humana, afinidades poblacionales, determinación de parentesco, domesticación de especies animales y vegetales y prácticas de subsistencia de poblaciones humanas. La aplicabilidad del ADN antiguo sin embargo, puede verse afectada por dificultades asociadas con la técnica de ADN antiguo en sí misma (Yang & Watt, 2005). Es decir, como el ADN extraído de restos antiguos tiende a estar en un bajo número de copias y está muy degradado, el análisis de ADN antiguo es altamente susceptible a contaminación originado de recursos modernos introducidos a los restos durante el curso de su excavación y su estudio. Esto, es de preocupación primordial porque puede llevar a falsos resultados fácilmente (Yang & Watt, 2005)

Por esta razón, para tratar evitar la contaminación con ADN contemporáneo, se utilizaron una variedad de métodos que son utilizados convencionalmente para remover o excluir la contaminación antes de que la extracción comience, dentro de estos métodos estuvieron: 1) lavar la superficie del hueso, 2) remoción de la superficie del hueso, 3) extracción del material solo del interior del hueso 4) irradiar el área de trabajo con luz UV, y 5) exposición del hueso a un blanqueador o (hipoclorito de sodio) (Kemp & Smith, 2005).

De hecho, antes de empezar la extracción con las muestras de hueso, se removió la superficie del hueso para tratar de eliminar el ADN contaminante que puede venir de los individuos quienes excavaron, estudiaron y manipularon los restos, también como aquellos que hicieron los recursos del laboratorio como reactivos y tubos de ensayo (Yang & Watt, 2005). Pero como tomar una muestra de ADN a todas las personas detrás del proceso de fabricación distribución de materiales, reactivos y muestreo del ADN es un proceso casi imposible, se debe hacer todo lo posible para tratar de eliminar el ADN que viene con los materiales y reactivos del laboratorio así como tratar de eliminar el ADN contaminante de la superficie del hueso (von Wurmb-Schwark *et al*, 2008).

## **5.1 MUESTRA 1: M2834 ind 1 fémur 1: Adulto de más de 35 años de edad.**

### **5.1.1 Extracción de ADN**

Para la extracción de esta muestra, se siguieron los mismos pasos descritos en materiales y métodos.

### **5.1.2 Amplificación del ADN**

Para este procedimiento, sabiendo las condiciones de contaminación que podía presentar la muestra y la cantidad de inhibidores de PCR que existen para el ADN, se realizaron varias diluciones seriales para tratar de disminuir dichos inhibidores. De hecho, se esperaba que las diluciones que amplificaran fueran las más altas, ya que entre más se diluya la muestra de ADN, así mismo disminuye la cantidad de inhibidores de PCR.

Para este proceso, se tomaron en cuenta los controles positivos, es decir, muestras de ADN de las personas que estuvieron involucradas directamente en todo el proceso de recolección y extracción de ADN de la muestra. Para este caso, se extrajo el ADN de Diana Sanchez, de la persona quien manipulo los fragmentos de hueso hasta el final. Es decir, como en algunos casos parece ser muy difícil estar seguro de que las secuencias que se obtienen al final realmente derivan de los materiales antiguos en vez de recursos modernos es necesario que desde que haya personas directamente involucradas en el tratamiento de la muestra, estas deberían ser genéticamente analizadas, ya que si han causado contaminación de DNA, es más fácil de descubrir. (von Wurmb-Schwark *et al*, 2008).

### 5.1.3 Visualización del ADN

En la tabla 3 se observaron los productos de la re-amplificación de la muestra M2834 ind 1, en un gel de agarosa al 2% para verificar si hubo contaminación de ADN y cuál de las diluciones amplificaba. Para esta muestra, se esperaba que las diluciones que amplificaran fueran las más altas, ya que de entre mas se diluya la muestra de ADN, así mismo disminuye la cantidad de inhibidores de PCR.

Como se puede observar en la tabla 3, todas las diluciones, los CN o controles negativos de extracción y de PCR amplificaron. Esto quiere decir que lo más probable es que hubo un arrastre de ADN desde el Control Positivo hacia las diluciones del DNA antiguo. Por esta razón se cambió el orden en que se servían las muestras y el Master mix en la PCR.

Por otra parte, debido a que la banda de CN de extracción salió muy nítida, sugiriendo mucha contaminación, se decidió cambiar de lugar de trabajo, uno donde hubiera cuartos separados y más condiciones de asepsia ya que como el análisis de ADN humano antiguo requiere precauciones extensivas para minimizar el riesgo de contaminación y remover un potencial ADN extraño en los especímenes a analizar (Dissing *et al*, 2008), uno de los controles más efectivos de contaminación, es un laboratorio dedicado solo a DNA antiguo (Yang & Watt, 2005) para eliminar cualquier posibilidad de que haya contaminación con muestras de ADN modernas y además, un laboratorio de cuartos separados para que no haya posibilidad de arrastre de la extracción hacia la PCR y viceversa.

## 5.2 MUESTRA 2: M2834 ind 1 fémur 2: Adulto de más de 35 años de edad.

### 5.2.1 Extracción de ADN

Para esta muestra, en la extracción de ADN se utilizaron los mismos reactivos utilizados para la **Muestra 1**. También se siguieron los mismos pasos descritos en materiales y métodos, pero en la Re-extracción se modificó un paso debido a la falta del equipo necesario para este paso, es decir, la muestra M2834 y su CN se colocaron a temperatura ambiente durante media hora, en vez de haberlos colocado en agitación a 37°C durante 1 hora.

### 5.2.2 Amplificación del ADN

Otro procedimiento que implica la contaminación, es la PCR que puede ser por la contaminación de los reactivos, que se evidencia en el CN de PCR o por la posibilidad de arrastre, es decir por la transferencia inadvertida de ADN entre tubos durante el curso del análisis (Kemp & Smith, 2005) que se observó en la primera PCR de la muestra 1. Por esto, se cambió el orden en el que se servían los reactivos en la muestra 2.

Esto se debe a que como los humanos están involucrados en todos los pasos desde la excavación de especímenes fósiles al análisis de DNA, la presencia de un pequeño número de moléculas de ADN moderno puede tener impactos severos en los intentos de amplificación de moléculas de ADN autentico por PCR (Dissing *et al*, 2008). Esto ocurre porque el ADN moderno puede competir con el ADN endógeno en la amplificación de PCR, y así, puede resultar en falsos positivos o resultados aberrantes (Kemp & Smith, 2005). De hecho, en el peor de los casos, la contaminación con ADN moderno puede enteramente superar al ADN autentico en la amplificación de PCR.

### **5.2.3 Visualización del ADN**

En la tabla 4, las diluciones de ADN antiguo que amplificaron se vieron tenues, lo que indica que no hubo mucha concentración de ADN, probablemente debido a la modificación hecha en un paso de la re-extracción de la muestra. Por otra parte, el Control negativo de extracción y de PCR estuvieron contaminados quizás porque los reactivos utilizados provenían de un lugar donde se trabaja con ADN moderno. Por esta razón se decidieron cambiar las alícuotas de los reactivos de extracción y de PCR para descartar si lo que estaba contaminado eran los stocks o las alícuotas de los reactivos.

Por otra parte, a pesar de los cuidados que se tuvieron con la limpieza de la cabina de extracción con hipoclorito de sodio que se encuentra entre las opciones químicas para descontaminación de agentes fósiles por ser una poderosa sustancia oxidativa donde la exposición de ADN a altas concentraciones de hipoclorito de sodio causa rompimiento del DNA en pequeñas piezas, y eventualmente a bases individuales. (Kemp & Smith, 2005) destruyendo el ADN en minutos (Dissing *et al*, 2008). y además, haber puesto los materiales necesarios en la extracción de ADN en luz UV que se utiliza para destruir posibles residuos de ADN en superficies materiales y equipos después de ser lavados con hipoclorito (Yang & Watt, 2005) de llevar trajes protectores, guantes y mascarar para proteger las muestras de ser contaminadas. (Yang & Watt, 2005) siempre hay una contaminación persistente. Esto puede deberse también a que los tubos y puntas utilizados para la extracción y PCR estaban contaminados antes de utilizarse, es decir, un recurso de contaminación importante son los reactivos, material de laboratorio, y artículos desechables del laboratorio contaminados durante su manejo, empaçado y distribución.

Y no solo esto puede causar contaminación, también el resultado del contacto con el material en cualquier punto entre el tiempo de la excavación en campo por arqueólogos a la extracción de DNA por el personal del laboratorio (Kemp & Smith, 2005)



### **5.3 MUESTRA 3: M2834 ind 2 fémur: Individuo de 15 – 20 años de edad**

#### **5.3.1 Extracción de ADN**

La extracción de ADN de esta muestra, se realizó con nuevas alícuotas de los reactivos que se utilizaron para la extracción y también, se tuvieron en cuenta la esterilización de puntas y tubos para la extracción y colocar en luz UV todos los elementos para eliminar lo más que se pudiera la contaminación con ADN moderno.

Por otra parte, se modificaron algunos pasos, debido principalmente a la curiosidad por saber cómo iban a salir los resultados, y por eso se simplificaron algunos pasos como:

En el último paso de la extracción, en vez de dejar los tubos secando 1 hora en un horno, se dejaron secando toda la noche dentro de la cabina de extracción. Luego, el ADN no se dejó hidratar por 24 horas, sino que el ADN se re-suspendió en 200 µl de agua y se puso en un shaker a 56°C para que el ADN se hidratara.

En la re-extracción, no se dejaron los tubos eppendorff en un shaker a 37°C por una hora, sino que se dejaron a temperatura ambiente durante una hora. Además, en vez de colocar los tubos en horno hasta que se secan, se colocaron en SpeedVac durante 30 minutos.

#### **5.3.2 Amplificación del ADN**

Para la primera PCR y la re-extracción, se cambiaron las alícuotas de los reactivos ya que en la muestra 2, se observó contaminación de la primera PCR.

También, se realizó el mismo procedimiento que se siguió en la muestra 2, para evitar el arrastre de ADN desde el Control Positivo hacia las muestras de ADN antiguo.

#### **5.3.3 Visualización del ADN**

En este paso se evidenció que solo el Control Negativo de extracción amplificó, mostrando que a pesar de todas las precauciones que se tuvieron para evitar la contaminación no dieron resultado.

Esto quiere decir que todavía hay cosas que se pasaron por alto para realizar una extracción con la mayor asepsia posible. Dentro de estos elementos que se pasaron por alto estuvieron: esterilización previa de tubos Falcon® y haber utilizado reactivos nuevos de extracción y de PCR.

Otra cosa que se observó en la electroforesis en gel de agarosa al 2%, fue que ninguna de las diluciones de ADN antiguo amplificó, quizás debido a las modificaciones hechas durante el proceso de extracción.

#### **5.4 ESTANDARIZACIÓN DE PRIMERS**

Debido a la contaminación persistente de los controles negativos de las muestras anteriores, se decidió, preparar nuevos reactivos de extracción que fueron esterilizados y puestos en luz UV antes de ser utilizados.

Además, después de haber tratado ya muchas posibilidades de controlar la contaminación en la fase de extracción y viendo que dicha contaminación persistía, se decidió confirmar por el lado de la amplificación y verificar si alguno de los reactivos estaba contaminado. Para esto se utilizó un Mix de PCR donde lo único que se tenía que agregar eran los *primers*, y luego, se descubrió que efectivamente estos eran los que estaban contaminados, por lo que se cambiaron por otros primers que amplifican la otra mitad de la región hipervariable I.

Luego, se hicieron nuevas estandarizaciones con dichos primers y se modificó los ciclos de PCR. Entonces para verificar que no hubiera contaminación se realizó una amplificación con el CN de la amplificación de la curva de  $MgCl_2$  y un control positivo que fue el ADN de Diana Sánchez, y en efecto, como no hubo contaminación con los nuevos primers, entonces definitivamente lo que causaba la contaminación eran los primers antiguos.

#### **5.5 MUESTRA 4: M1038 fémur: Individuo de 18 meses de edad**

##### **5.5.1 Extracción de ADN**

La extracción de ADN de esta muestra, se realizó con reactivos nuevos y esterilizados antes de ser utilizados en la extracción. Además, se tuvieron en cuenta la esterilización de puntas y tubos para la extracción y colocar en luz UV todos los elementos para eliminar lo más que se pudiera la contaminación con ADN moderno.

Esto se realizó porque el ADN contaminante, que puede venir de los individuos quienes excavaron, estudiaron y manipularon los restos también puede venir de aquellos que hicieron los recursos del laboratorio como reactivos y tubos de ensayo. (Yang & Watt, 2005).

Por otra parte, se modificaron algunos pasos, debido principalmente a la falta de algunos equipos se simplificaron algunos pasos como:

En la re-extracción, no se dejaron los tubos eppendorff en un shaker a 37°C por una hora, sino que se dejaron a temperatura ambiente durante una hora. Además, en vez de colocar los tubos en horno hasta que secaran, se colocaron en SpeedVac durante 30 minutos.

### **5.5.2 Amplificación del ADN**

Para la primera PCR y la re-extracción, se utilizaron los mismos reactivos de PCR y los nuevos primers utilizados en la estandarización, donde el CN no amplifico demostrando que ya no había contaminación con ADN moderno. Además se utilizo BSA ya que se ha sugerido que la adición de sustancias inertes como suero de albumina bovina (BSA) a la PCR puede reducir la inhibición uniéndose a componentes inhibidores (Rohland & Hofreiter, 2007).

### **5.5.3 Visualización del ADN**

En este paso se evidenció que el Control positivo y la dilución 1/32 de la muestra M1038 amplificaron, mientras que los CN de extracción ni de PCR amplificaron, mostrando que en efecto los primers eran los que causaban la contaminación de los Controles negativos de extracciones anteriores.

## 6. CONCLUSIONES

- Es claro que el riesgo de contaminación con ADN humano moderno es el problema más serio asociado con el análisis de ADN humano antiguo, y por lo tanto, todos los posibles controles y criterios de autenticidad son imprescindibles cuando se estudian muestras de humanos antiguas.
- El trabajo con ADN antiguo es más exigente que el trabajo con ADN moderno, ya que la sensibilidad de los métodos utilizados para extraer ADN antiguo libre de contaminación requiere un protocolo y un cuidado riguroso por parte del investigador quien manipula la muestra.
- La estandarización de la extracción y amplificación de ADN a partir de restos óseos de más de 500 años de antigüedad, constituye una prueba de que la recuperación de ADN antiguo es posible si se toman las precauciones adecuadas.
- El tiempo de experimentación necesario requiere ampliarse para lograr disponer de las secuencias a analizar para así poder tener una recuperación fiable de ADN antiguo que permita dilucidar aspectos genéticos de la población muestreada.
- Proporcionar pruebas convincentes para la recuperación exitosa de ADN antiguo es una tarea difícil, ya que incluso teniendo resultados negativos para contaminación, no es prueba definitiva de que las muestras de restos óseos antiguos no fueron contaminados con ADN moderno antes de ser analizadas en un laboratorio.
- Por esto es importante tener en cuenta todos los pasos y personas por los que ha pasado la muestra ósea desde el momento de la excavación (teniendo en cuenta todos los criterios de autenticidad), y de este modo, recuperar evidencia concluyente a partir de las secuencias obtenidas.

## 7. RECOMENDACIONES

- Evaluar otro tipo de Huesos diferentes al fémur para evaluar la eficiencia en la extracción de ADN y sobretodo en la amplificación de la muestra.
- Realizar cada una de las fases experimentales del trabajo con todas las condiciones de asepsia necesarias desde el principio del proyecto para evitar problemas de contaminación.
- Realizar pruebas con los reactivos de extracción y de PCR con controles negativos para ver si hay contaminación antes de empezar con las muestras de hueso antiguo.
- Reproducir la extracción y amplificación de ADN antiguo en un laboratorio independiente, que preferiblemente sea especializado en ADN arcaico, así, la validez del estudio aumentaría considerablemente.
- Asegurarse de tener todos los equipos y materiales necesarios en cada uno de los laboratorios para la extracción de ADN, para no introducir variables que puedan afectar la amplificación de la muestra.

## 8. REFERENCIAS:

- BAUBLIENE, J., L. DAUGNORA & I. MICELKIENE. 2003. Evaluation of the DNA extraction method from ancient animal bones. *Ekologija* 1: 8 – 11.
- BRANDON, M., M. LOTT., K. NGUYEN., S. SPOLIM., S. NAVATHE., P. BALDI & D. WALLACE. 2005. MITOMAP: a human mitochondrial genome database—2004 update. *Nucleic Acids Research*, Vol. 33, Database issue D611–D613
- COOPER, A. & H. POINAR. 2000. Ancient DNA: Do it right or not at all. *Science* 289: 1139
- DILLEHAY, T.D. 2003. Las culturas del Pleistoceno tardío de Suramérica. *Maguaré* 17: 15 – 45
- DISSING, J., M. KRISTINSDOTTIR. & C. FRIIS. 2008. On the elimination of extraneous DNA in fossil human teeth with hypochlorite. *Journal of Archaeological Science* 35: 1445 - 1452
- FUSSELLI, S., E. TARAZONA-SANTOS., I. DUPANLOUP., A. SOTO., D. LUISELLI & D. PETTENER. 2003. Mitochondrial DNA diversity in South America and the genetic history of Andean highlanders. *Molecular Biology and Evolution* 20(10): 1682 – 1691
- GILBERT, M., H. BANDELT., M. HOFREITER & I. BARNES. 2005. Assessing ancient DNA studies. *Trends in Ecology and Evolution* Vol.20 No.10
- GREENBERG, J.H., C. TURNER & S.L. ZEGURA. 1986. The settlement of the Americas: a comparison of the linguistic, dental, and genetic evidence. *Current Anthropology* 27: 477–497
- HÖSS, M., P. JARUGA., T. ZASTAWNY., M. DIZDAROGLU & S. PÄÄBO. 1996. DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. *Nucleic Acids Research*, Vol. 24, No. 7
- KALMÁR, T., C.Z. BACHRATI., A. MARCSIK & I. RASKÓ. 2000. A simple and efficient method for PCR amplifiable DNA extraction from ancient bones. *Nucleic Acids Research* 28(12): 67
- KEMP, B.M & D.G. SMITH. 2005. Use of bleach to eliminate contaminating DNA from the surface of bones and teeth. *Forensic Science International* 154: 53–61
- KEYEUX, G.; C. RODAS., N. GELVEZ & D. CARTER. 2002. Possible migration routes into South America deduced from mitochondrial DNA studies in Colombian Amerindian populations. *Human Biology* 74(2): 211-233
- MELTON, P., I. BRICEÑO., A. GOMEZ. E. DEVOR., J. BERNAL & M. CRAWFORD. 2007. Biological Relationship Between Central and South American Chibchan Speaking Populations: Evidence From mtDNA. *American Journal of Physical Anthropology* 133:753–770

MONSALVE, M., F. CÁRDENAS., F. GHUL., A. DELANEY & D. DEVINE. 1996. Phylogenetic analysis of mtDNA lineages in South American mummies. *Annals of Human Genetics* 60: 293-303

MOODER, K.P., A.W. WEBER., F.J. BAMFORTH., A.R. LIEVERSE., T.G. SCHURR., V.I. BAZALIISKI & N.A. SVEL'EV. 2005. Matrilineal affinities and prehistoric Siberian mortuary practices: a case study from Neolithic Lake Baikal. *Journal of Archaeological Science* 32: 619-634.

MORAGA, M., E. ASPILLAGA., C. SANTORO., V. STANDEN., P. CARVALLO & F. ROTHHAMMER. 2001. Análisis de ADN mitocondrial en momias del norte de Chile avala hipótesis de origen amazónico de poblaciones andinas. *Revista Chilena de Historia Natural* 74: 719-726

PAABO. S., RG. HIGUCHII & AC. WILSON. 2004. Ancient DNA and the Polymerase Chain Reaction

POINAR, G & H. POINAR. 1995. En busca de la vida en el ámbar. Adison-Wesley Iberoamericana.

PUCCIARELLI, H.M. 2004. Migraciones y variación craneofacial humana en América. *Complutum* 15: 225-247

RODRÍGUEZ, J.V. 1999. Los Chibchas: pobladores antiguos de los Andes Orientales. *Adaptaciones Bioculturales*. Fundación de Investigaciones Arqueológicas Nacionales, Banco de la República. Bogotá. 217 p.

ROHLAND, N & M. HOFREITER. 2007. Ancient DNA extraction from bones and teeth. *Nature protocols* vol.2 no.7

ROHLAND, N & M. HOFREITER. 2007. Comparison and optimization of ancient DNA extraction. *BioTechniques* 42:343-352

SCHURR, T.; S. BALLINGER., Y. GAN., J. HODGE., A. MERRIWETHER., D. LAWRENCE., W. KNOWLER., K. WEISS & D. WALLACE. 1990. Amerindian Mitochondrial DNAs Have Rare Asian Mutations at High Frequencies, Suggesting They Derived from Four Primary Maternal Lineages. *Am. J. Hum. Genet.* 46:613-623

SILVA, S., I. BRICEÑO., J. BURGOS., D. TORRES., V. VILLEGAS., A. GÓMEZ., J. BERNAL & J. RODRÍGUEZ. 2008. Análisis de ADN mitocondrial en una muestra de restos óseos arcaicos del periodo Herrera en la sabana de Bogotá. *Biomédica* 28:569-77

STONE, A & M. STONEKING. 1998. mtDNA analysis of a prehistoric Oneota population: implications for the peopling of the New World. *American Journal of Human Genetics* 62: 1153–1170

TORRONI, A., T. SCHURR., M. CABELL., M. BROWN., J. NEEL., M. LARSEN., D. SMITH., C. VULLO & D.C. WALLACE. 1993. Asian Affinities and Continental Radiation of the Four Founding Native American mtDNAs. *American Journal of Human Genetics* 53: 563-590

TORRONI, A., T. SCHURR., C. YANG., R. WILLIAMS., M. SCHANFIELD., G. TROUP., W. KNOWLER., D. LAWRENCE., K. WEISS & D. WALLACE. 1992. Native American Mitochondrial DNA Analysis Indicates That the Amerind and the Nadene Populations Were Founded by Two Independent Migrations. *Genetics* 130: 153-162

VIGILANT, L., R. PENNINGTON., H. HARPENDING., T.D.KOCHER & A.C. WILSON. 1989. Mitochondrial DNA sequences in single hairs from a southern African population. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86: 9350–9354

VON WURMB-SCHWARK, N., A. HEINRICH., M. FREUDENBERG., M. GEBUHR & T. SCHWARK. 2008. The impact of DNA contamination of bone samples in forensic case analysis and anthropological research. *Legal Medicine* 10: 125–130

WALLACE, D.C. 1995. Mitochondrial DNA variation in human evolution, degenerative disease and aging. *American Journal of Human Genetics* 57: 201–223

WALLACE, D.C & M. BROWN. 1999. Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. *Gene* 238: 211–230

YANG, D & K. WATT. 2005. Contamination controls when preparing archaeological remains for ancient DNA analysis. *Journal of Archaeological Science* 32: 331–336



## ANEXOS

### ESTANDARIZACIÓN NUEVOS PRIMERS

Después de los resultados que se obtuvieron en la muestra 3, debido a la contaminación persistente, se prepararon nuevos reactivos para la extracción de ADN en el laboratorio de identificación humana de la universidad Nacional.

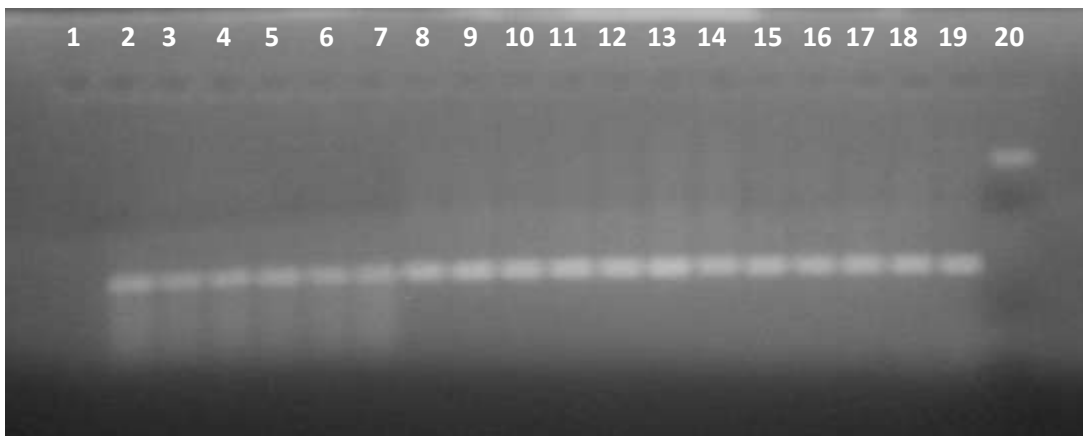
Posteriormente, se realizaron amplificaciones de muestras anteriormente extraídas, con un Master Mix de PCR, y después de varios ensayos se confirmó que los primers estaban **contaminados**.

Debido a esto, se hizo una estandarización con nuevos primers que abarcan la otra mitad de la región hipervariable HVR I.

**H16235:** 5' - CTT TGG AGT TGC AGT TGA TG - 3'

**L15997:** 5' - CAC CAT TAG CAC CCA AAG CT -3'

Para esto, se hizo una curva de MgCl<sub>2</sub> y de temperatura de anillamiento (Figura 6).



**Figura 6.** Curva de MgCl<sub>2</sub> y temperatura de anillamiento de los primers H16235 y L15997

De acuerdo a la figura 6, se escogió la concentración de MgCl<sub>2</sub> de 2,0 mM y una temperatura de anillamiento de 54°C. Por otra parte, se evidencio que el CN no amplificó.

Con esa nueva temperatura de anillamiento y nueva concentración de MgCl<sub>2</sub> se modificó el protocolo de PCR (Tabla 7)

**Tabla 7.** Pasos del ciclo de PCR para el par de primers H16235 y L15997

<b>Paso</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Duración</b>	<b>Repeticiones</b>
1	95	7 min	1
2	95	1 min	28
	54	30 seg	
	72	1 min	
3	72	5 min	1

Después de la estandarización con nuevos primers y nuevos reactivos, se prosiguió con la muestra 4.