

# Identificación taxonómica mediante Citocromo b. Su aplicación a un caso arqueológico patagónico

Vivian Scheinsohn, Pablo Marcelo Fernández, Florencia Garrone, Laura Catelli, Micaela Longaray, Magdalena Romero, Mercedes Salado, Mercedes Grisel Fernández, Pablo Tchilinguirián, Carlos Vullo

Recibido 14 de mayo 2015. Aceptado 14 de octubre 2015

## RESUMEN

En este trabajo presentamos los primeros resultados de la identificación taxonómica mediante el análisis del citocromo b de muestras óseas subactuales y arqueológicas (Holoceno tardío) procedentes de Patagonia. El bajo grado de determinación taxonómica de los restos óseos recuperados en el sitio Acevedo 1 (localidad de Río Pico, provincia del Chubut, Argentina), alcanzada mediante el análisis zooarqueológico tradicional, y la necesidad del Laboratorio de Genética Forense del Equipo Argentino de Antropología Forense de identificar especies animales en contextos forenses, nos llevó a aunar esfuerzos y realizar un trabajo conjunto en torno al análisis del citocromo b en restos óseos no humanos. La identificación taxonómica de muestras subactuales lograda con este análisis confirma la efectividad de los protocolos seguidos en dicho laboratorio. Su aplicación a contextos arqueológicos, como lo prueban los resultados alcanzados en este trabajo, dependerá de la degradación de los materiales analizados. En el caso del sitio Acevedo 1, este análisis además permitió aportar la primera identificación arqueológica de huemul en el Centro Oeste cordillerano del Chubut, aplicando una combinación del análisis del citocromo b con la morfología ósea comparativa. A pesar de los resultados positivos, el carácter destructivo del análisis y sus altos costos hacen que su aplicación deba ser evaluada adecuadamente en función de la problemática arqueológica bajo estudio.

**Palabras clave:** Citocromo b; ADN mitocondrial; Patagonia; Huesos; Zooarqueología.

## ABSTRACT

TAXONOMIC IDENTIFICATION WITH CYTOCHROME B APPLIED TO A PATAGONIAN ARCHAEOLOGICAL CASE. First results for taxonomic identification by cytochrome b on Patagonian subactual and archaeological (Late Holocene) bone samples are presented. The low identifiability level achieved at Acevedo 1 archaeological site (Río Pico, Chubut, Argentina), by traditional zooarchaeological analysis, and the need of the EAAF Laboratory of Forensic Genetics to identify vertebrate species in forensic contexts, took us to work jointly on the analysis

Vivian Scheinsohn. Instituto Nacional de Antropología y Pensamiento Latinoamericano (INAPL)-Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)-Universidad de Buenos Aires (UBA). 3 de Febrero 1370 (1426), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. E-mail: scheinso@retina.ar

Pablo Marcelo Fernández. INAPL/ CONICET- UBA. 3 de Febrero 1370 (1426), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. E-mail: pablomfernandez69@yahoo.com.ar

Florencia Garrone. Laboratorio de Genética Forense, Equipo Argentino de Antropología Forense (LGF-EAAF). Independencia 644-3 A (5000), Córdoba, Argentina. E-mail: florg\_20@hotmail.com

Laura Catelli. LGF-EAAF. Independencia 644-3 A (5000), Córdoba, Argentina. E-mail: malaucatelli@yahoo.com.ar

Micaela Longaray. LGF-EAAF. Independencia 644-3 A (5000), Córdoba, Argentina. E-mail: mica\_longaray@hotmail.com

Magdalena Romero. LGF-EAAF. Independencia 644-3 A (5000), Córdoba, Argentina. E-mail: beu\_romero@hotmail.com

Mercedes Salado. Equipo Argentino de Antropología Forense (EAAF). Rivadavia 2443, 2do piso (1034), Buenos Aires, Argentina. E-mail: msaladopuerto@yahoo.com

Mercedes Grisel Fernández. INAPL. 3 de Febrero 1370 (1426), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina- Consejo Interuniversitario Nacional (CIN). E-mail: mecha\_ratablanca@hotmail.com

Pablo Tchilinguirián. INAPL-CONICET. 3 de Febrero 1370 (1426), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. E-mail: pabloguirian@gmail.com

Carlos Vullo. LGF-EAAF. Independencia 644-3A (5000), Córdoba, Argentina. E-mail: cvullo@yahoo.com.ar

of cytochrome b in non-human bones. Subactual sample taxonomic identification obtained with this analysis confirms the effectiveness of the protocols followed in the laboratory. Its application to archaeological contexts, as evidenced by the results obtained in this work, will depend on the degradation of the materials. In the case of Acevedo 1, analysis provided the first archaeological identification of huemul in Central Andean Chubut, obtained by a combination of cytochrome b analysis with comparative bone morphology. Despite the positive results, the destructive nature of the analysis and high costs make their application should be adequately evaluated according to the archaeological problem under study.

**Keywords:** Cytochrome b; Mitochondrial DNA; Patagonia; Bones; Zooarchaeology.

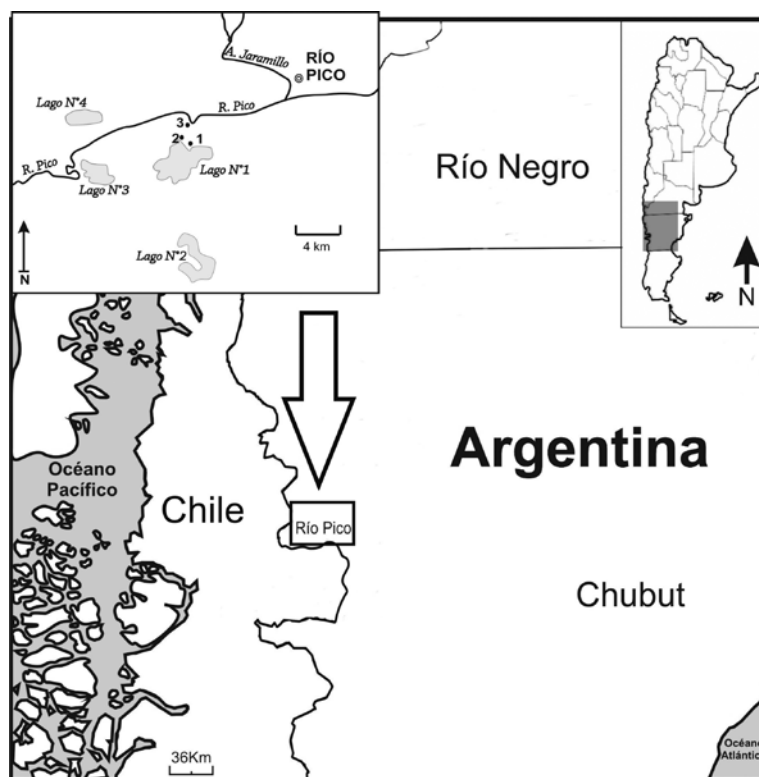
## INTRODUCCIÓN

Uno de los métodos genéticos más utilizados para la identificación taxonómica y la determinación de filogenia de especies es la técnica de secuenciación nucleotídica de segmentos del gen del citocromo b (Cytb). Esta técnica permite determinar relaciones entre familias y géneros dado que el Cytb contiene información específica de cada especie. Además, como el ADN mitocondrial (mtDNA) muestra un número elevado de copias por célula, la probabilidad de que algunas moléculas queden intactas con el paso del tiempo es mayor, lo que lo hace particularmente apto para el análisis de muestras antiguas. Los estudios comparativos que involucran al Cytb han generado nuevos esquemas de clasificación y han sido utilizados para asignar nuevas descripciones de especies a los géneros conocidos (Pereira *et al.* 2008; Linacre *et al.* 2011). En arqueología, se ha utilizado en relación con los procesos de domesticación acaecidos en diversas partes del mundo (Pedrosa *et al.* 2005; Fernández *et al.* 2006; Stock *et al.* 2009; Speller *et al.* 2010), para diferenciar entre ovejas y cabras (Loreille *et al.* 1997) y en contextos de cazadores-recolectores, para precisar qué especie de salmón fue explotada en un determinado sitio (Yang *et al.* 2004). En Patagonia, fue utilizado para revisar el estatus taxonómico de restos óseos de camélido hallados en contextos correspondientes a la transición Pleistoceno/Holoceno (Weinstock *et al.* 2009). En nuestro caso, el bajo grado de determinación taxonómica obtenido a través del estudio morfológico tradicional de los restos óseos de animales recuperados en el sitio Acevedo 1 (Río Pico, Patagonia argentina) nos llevó a implementar nuevas vías metodológicas para potenciar su capacidad informativa. Esto, sumado a la necesidad del Laboratorio de Genética Forense del Equipo Argentino de Antropología Forense (LGF-EAAF) de identificar especies animales en contextos forenses –para lo cual habían comenzado a trabajar con el análisis del Cytb– nos llevó a aunar esfuerzos y a realizar un trabajo

conjunto en torno al uso de este análisis como herramienta para la identificación taxonómica de muestras óseas subactuales y arqueológicas. Así, este artículo ofrece los primeros resultados para Patagonia respecto de la identificación de especies animales con esta técnica en muestras óseas del Holoceno tardío.

### El sitio arqueológico Acevedo 1

En el año 2009 iniciamos un proyecto de investigación arqueológica en el centro-oeste del Chubut con el propósito de evaluar un área donde hasta ese entonces no se habían realizado investigaciones arqueológicas sistemáticas (Scheinsohn *et al.* 2010). Dicho proyecto se concentró durante algunos años en la localidad de Río Pico, donde se identificaron tres sitios con arte rupestre (Acevedo 1, Solís 1 y Piedra Pintada del Jaramillo) y tres a cielo abierto (Acevedo 2, Solís 2 y Mayer 1, Figura 1). Se iniciaron excavaciones en dos



**Figura 1.** Mapa con la ubicación del área de investigación (rectángulo negro); y en el recuadro, ampliación del área de investigación con la ubicación de los sitios: 1- Acevedo 1; 2- Acevedo 2 y 3- Maier 1.

de los sitios con arte rupestre: en Solís 1, donde no se registraron materiales enterrados; y en Acevedo 1 (sobre esta área de investigación ver Scheinsohn *et al.* [2010, 2011a y b, 2013]). Este último está ubicado en un paisaje modelado por glaciares reconocidos a partir de la presencia de morenas laterales, con un relieve de erosión dado por artesas ocupadas por lagos. Se sitúa al pie de la ladera abrupta de una roca aborregada. El paredón rocoso mira hacia el norte, por lo que recibe la luz solar directa la mayor parte del día. La meteorización da lugar a descamación, desgranado y lajamiento, que es más intenso en la parte inferior de la escarpa adyacente al sitio, procesos que originan conos de deyección y taludes al este y oeste de él (Figura 2).

En el paredón se registraron 14 motivos rupestres. Se excavaron dos cuadrículas (E9 y F16) y parte de otra (microsectores de F15 y G15) hasta unos 70 cm de profundidad, donde se detectó la presencia de un paleosuelo de color gris oscuro de origen fluvio-glaciar. El material intermedio se compone de ese mismo paleosuelo mezclado con material parental de origen coluvial y volcánico procedente de la ladera adyacente al sitio. Además, presenta una capa superior amarillenta compuesta por coluvio propio de la ladera y de guano. También hay grandes bloques alineados que pudieron depositarse por rodamiento desde arriba del cono de deyección o incluso haber sido movilizados por los humanos.

La secuencia estratigráfica que se observa en el perfil de la cuadrícula F16 –ubicada en la parte más baja de la pendiente– comprende ocho niveles artificiales de 10 cm de espesor cada uno. Los niveles 8 y 7 corresponden al suelo fluvio-glacial cercano a la roca de base. El nivel 1 corresponde al guano de oveja y material coluvial reciente. Los restantes niveles corresponden a las capas intermedias. Esta misma secuencia se observa en el perfil de la cuadrícula E9, con la diferencia de que presenta una menor potencia sedimentaria debido a su ubicación pendiente arriba.

En este sitio se registraron restos óseos humanos (unos 56 especímenes) correspondientes a por lo menos dos individuos, un juvenil y un adulto, que se presentaban dispersos, sin ninguna estructura reconocible (Rizzo 2015). La datación de uno de los huesos correspondiente al adulto, ubicado en el nivel 3 de la cuadrícula F16, proporcionó una antigüedad de  $1589 \pm 38$  años AP (AA90944;

hueso,  $\delta^{13}\text{C} = -20,5$ ). Uno de los huesos del individuo juvenil, procedente del nivel 5 de E9, fue datado en  $1540 \pm 49$  años AP (AA98674; hueso,  $\delta^{13}\text{C} = -19,4$ ). Además, se recuperaron restos faunísticos muy fragmentados y un sólo instrumento lítico, junto con algunas microlascas, una cuenta y fragmentos de valvas. Las fechas obtenidas a partir de los restos óseos humanos indicarían un evento puntual de enterramiento de ambos individuos. No obstante, no podemos asegurar que los demás materiales arqueológicos presentes en el sitio correspondan al mismo evento. La situación descrita, tanto desde un punto de vista geológico como arqueológico, sugiere un complejo proceso de formación del sitio, complejidad que se ve reflejada en las propiedades del conjunto arqueofaunístico recuperado.

### Registro arqueofaunístico de Acevedo 1

El análisis zooarqueológico –que hasta el momento comprende los materiales recuperados en la cuadrícula F16, niveles 1 a 4 (excavación 2010) y parte de aquellos procedentes de las cuadrículas F15 y G15 (excavación 2012)– contabiliza 602 restos óseos y dentarios. De estos, el 30% son materiales indeterminados. Aquellos que fueron asignados a una categoría taxonómica corresponden mayoritariamente a restos de pequeños vertebrados, principalmente roedores, y unos pocos passeriformes. Entre los mamíferos de mayor porte se identificaron dos especímenes óseos de oveja (*Ovis aries*), uno de guanaco (*Lama guanicoe*), uno de zorro (*Lycalopex sp.*) y diez fragmentos de mamífero indeterminado (Tabla 1).



**Figura 2.** Sitio Acevedo 1, vista hacia el sur. A: Escarpa rocosa de brechas volcánicas. La roca se halla bajo intensa meteorización física por lajamiento y desgranación. B: Taludes de roca o escombros que provienen del till presente en la zona cumbre. Hay dos taludes, uno al N y otro al S del sitio, cuya adyacencia lateral forma una depresión donde se halla el sitio. C: Terraza glacifluvial formada por conglomerados.

Taxón	NISP	%NISP
Vertebrados pequeños	414	96,7
Mammalia	10	2,3
Oveja	2	0,5
Guanaco	1	0,25
Zorro	1	0,25
Total	428	100,0

**Tabla 1.** Taxones identificados en el sitio Acevedo 1.

predominan las de carnívoros, aunque también hay marcas de raíces y roedores, pero con menor incidencia. La actividad de carnívoros afecta principalmente a los vertebrados pequeños, producto de la acción de aves rapaces. De allí también la presencia de passeriformes en la muestra, ya que estas aves pequeñas integran la dieta de estrigiformes y falconiformes, y suelen darse junto con los roedores en las acumulaciones formadas a partir de la descomposición de bolos de regurgitación o egagrópilas (Pardiñas 1999). Aparte de las aves, entre los vertebrados pequeños se identificó la presencia de cricétidos, caviomorfos y *Ctenomys* sp. Las proporciones que exhiben estos taxones también sugiere la actividad de rapaces (Pardiñas 1999).

A partir de lo expuesto, se puede plantear que el conjunto óseo de Acevedo 1 es principalmente informativo sobre las actividades de aves rapaces, responsables de la acumulación de casi el 97% de los restos identificados. Así como ocurre con los vertebrados pequeños, las evidencias de la actividad de carnívoros –en este caso, marcas de mascado– también se observan entre los restos de oveja, mamífero y otros indeterminados, y sugieren en conjunto el carroñeo, posiblemente por zorros (especie de la que se halló un tercer molar superior). La incorporación de material óseo moderno, como otros de los procesos tafonómicos actuantes en el sitio, se infiere por la presencia de huesos de oveja en los niveles 2 y 4, que sugiere la mezcla de materiales.

Las modificaciones relacionadas con la actividad humana son escasas y se limitan a un negativo de lascado y un punto de impacto en un fragmento de fémur asignado a mamífero (ver abajo) y una huella de corte muy fina sobre un hueso indeterminado. A esta escasez se le suma el importante grado de fragmentación, atribuible al efecto combinado del predominio de bloques y gravas en la matriz sedimentaria y a la reptación por la pendiente de los materiales. Todo esto limita severamente la identificación taxonómica de los vertebrados de mayor porte. La escasa información sobre la interacción de los humanos y la fauna derivada del análisis de los materiales del Acevedo 1 –junto con la falta de otros sitios con presencia de fauna en el área– nos llevó a plantear una estrategia que permitiera alcanzar una mayor capacidad de identificación taxonómica entre los restos de mamífero en este sitio.

La muestra está muy fragmentada. La mayor parte de los restos mide menos de 3 centímetros. Entre las modificaciones óseas detectadas

El análisis de citocromo b mitocondrial se presentó como una de las opciones posibles.

El EAAF, organización científica no gubernamental que aplica la antropología y arqueología forenses a la investigación de violaciones a los derechos humanos, cuenta desde el año 2008 con un laboratorio de genética forense (LGF-EAAF). En el transcurso de sus investigaciones, el EAAF suele encontrar restos óseos cuyo nivel de fragmentación impide su clasificación taxonómica. Por ello, el LGF-EAAF incorporó en el año 2012 metodologías moleculares aplicadas a la identificación taxonómica de restos no humanos. Dentro de los marcadores genéticos útiles en la identificación de vertebrados, por ejemplo, puso en marcha la amplificación y secuenciación del Cytb mitocondrial, lo cual requería someter a prueba los protocolos seguidos.

Ante esta circunstancia, decidimos aunar esfuerzos y realizar un trabajo conjunto que permitiera evaluar las capacidades del LGF-EAAF en función de este tipo de análisis y alcanzar determinaciones taxonómicas más precisas para los materiales faunísticos del sitio Acevedo 1. Para ello, como primer paso, diseñamos un test ciego para ponderar la confiabilidad del análisis y los protocolos empleados, antes de pasar al estudio de las muestras arqueológicas.

## METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE ESPECIE A PARTIR DEL CITOCROMO B EXTRAÍDO DE MUESTRAS ÓSEAS

### Extracción y purificación de ADN

Todos los procedimientos se realizaron en un laboratorio aislado especialmente diseñado para el procesamiento de huesos, bajo campana de flujo laminar, y con equipamiento adecuado para evitar la contaminación de las piezas. Los fragmentos de hueso se limpiaron y descontaminaron mediante su tratamiento con hipoclorito de sodio y luz UV. El material resultante se pulverizó con tratamiento mecánico en frío con nitrógeno líquido en un molino criogénico (Freezer mill, Spex 6750); luego fue descalcificado, tratado con *buffer* de digestión y proteinasa K (100 mg/ml). Posteriormente, se trató el digesto con PC (fenol/cloroformo) y con cloroformo (Hagelberg y Clegg 1991; Hochmeister *et al.* 1991; Fisher *et al.* 1993). El ADN extraído se concentró por filtración con Microcon y se purificó con columnas QIAmp DNA Blood Maxi kit, QIAGEN (Davoren *et al.* 2007), y eluido en 2 ml de *buffer* TE. Este eluido fue posteriormente concentrado a aproximadamente 80  $\mu$ l mediante ultrafiltración con Vivacon 2-100MWCO (Sartorius). Sólo a los efectos de determinar la presencia de inhibidores de PCR, el ADN extraído fue cuantificado con el kit Quantifiler® Human DNA Quantification Kit (ThermoFisher).



### Amplificación y secuenciación del gen del citocromo b

Para la amplificación del gen *Cytb* se utilizaron *primers* diseñados para realizar anillamientos con regiones conservadas del genoma mitocondrial que permiten amplificar una gran cantidad de vertebrados (ver más adelante la metodología y las referencias bibliográficas utilizadas). Dependiendo de la degradación de la muestra se utilizaron dos estrategias de amplificación. Como primera estrategia, se amplificó un fragmento de 358bp (Parson *et al.* 2000); a este fragmento se lo denominó "Citb". En el caso de muestras que no amplificaron con la primera estrategia se recurrió a la amplificación de tres fragmentos más pequeños, de entre 220 y 230bp (Pereira *et al.* 2006), que fueron denominados Citb1, Citb2 y Citb3 (Tabla 2). Todas las reacciones se llevaron a cabo amplificando controles positivos y negativos para establecer la eficiencia de la reacción y la ausencia de contaminación. Se controló el producto amplificado mediante electroforesis en gel de agarosa. Las reacciones de secuenciación se realizan utilizando el kit Big Dye Terminator v1.1 (Applied Biosystems). Para la separación electroforética de los productos de secuenciación se utilizó un equipo ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Perkin-Elmer Applied Biosystems, ver Hopgood *et al.* [1992]).

### Análisis de secuencias y obtención de resultados

El análisis de los resultados se realizó mediante la comparación de las secuencias obtenidas con aquellas publicadas en distintas bases de datos de referencia utilizando el programa BLAST, que permite calcular el grado de similitud entre ambas. BLAST y las bases de datos que utiliza se encuentran administrados dentro del National Center for Biotechnology Information (Madden 2013). Para cada búsqueda, BLAST arroja parámetros que determinan la confiabilidad de un determinado *match* entre la secuencia problema y alguna secuencia en las bases de datos. Todos estos parámetros se evalúan para determinar los resultados. Los parámetros informados son los siguientes:

Porcentaje de identidad: es el porcentaje de similitud entre la secuencia problema, obtenida en el laboratorio, y la secuencia con la que hizo *match* en BLAST, publicada en las bases de datos.

*E-value* (*expect value*): el *E-value* es un parámetro estadístico que describe la probabilidad de encontrar un *match*

por azar. Mientras más pequeño sea, más confiable es el *match*. Depende del tamaño de la base de datos y del sistema de *score* utilizados, y del tamaño en pares de bases de la secuencia problema.

### TEST CIEGO

Utilizamos muestras óseas subactuales de animales con determinación taxonómica *perimortem* realizada en el lugar de recolección y confirmada por comparación osteológica en gabinete (Tabla 3). Estas muestras se seleccionaron con el objetivo de cubrir la mayor cantidad de especies presentes en los sitios arqueológicos patagónicos. Consideramos también huesos en diferente estado de conservación, derivados tanto de las condiciones de depositación (ambiente), de la antigüedad de la muestra y, en un caso, del tratamiento para el consumo (cocción, ver Tabla 3, muestra 1). Las muestras, que debían pesar más de cuatro gramos (condición establecida para el análisis), fueron preparadas por dos de los autores de este trabajo (VS y PF) con total desconocimiento de aquellos pertenecientes al LGF-EAAF. Fueron enviadas a dicho laboratorio sólo con el número de identificación que figura en la Tabla 3. Como puede observarse de la comparación de las tablas 3 y 4, la clasificación de especies realizada por el LGF-EAAF mediante la secuenciación del *Cytb* coincide con las que se habían obtenido por comparación morfológica del esqueleto y partes blandas en el campo, lo cual permite evaluar positivamente el protocolo seguido. Cabe aclarar que en la Tabla 4 sólo hacemos constar los *match* de especies disponibles localmente.

En el único caso en que por morfología sólo teníamos una determinación al nivel de orden (cetáceo), el

Fragmento amplificado	Primer F	Primer R	Tamaño del fragmento	Condiciones de PCR
Citb	14816F	15173R	358bp	1. 11 min, 95° C 2. (X36 ciclos)
Citb 1	15149F	15367R	219bp	a. 1 min, 95° C b. 1 min, 58° C c. 1 min, 72° C
Citb 2	15347F	15576R	230bp	3. 10 min, 72° C
Citb 3	15554F	15773R	220bp	4. 2 min, 15° C

Tabla 2. Amplificación de diferentes fragmentos del gen de Citocromo b.

Muestra	Taxón, elemento	Peso en gr	Procedencia y fecha de muerte
1	<i>Ovis aries</i> , radio	8,0	Adquirido en una carnicería y colectado después de ser asado (2003)
2	<i>Lama guanicoe</i> , tibia	5,6	Bahía Valentín, Tierra del Fuego (1990)
3	<i>Arctocephalus australis</i> , tibia	< 10	Cabo Polonio, Uruguay (1990)
4	<i>Bos taurus</i> , metacarpo	< 10	Desconocidas
5	<i>Lama guanicoe</i> , tibia	11,1	Ea. Rincón Grande, Parque Nacional Nahuel Huapi, Río Negro (2008)
6	<i>Hippocamelus bisulcus</i> , húmero	10,0	Lago La Plata, Chubut (1993)
7	Cetacea, indeterminado	16,0	Bahía Valentín, Tierra del Fuego (1990)
8	<i>Homo sapiens</i>	5,3	Desconocidas.
9	<i>Rhea pennata</i> , tarsometatarso	9,9	(1980)

Tabla 3. Muestras subactuales.

análisis genético del Cytb arribó a una determinación al nivel de especie, aunque no podemos evaluarla. Nótese que la metodología molecular implementada nos ha permitido incluso alcanzar la determinación de la muestra 1, recolectada después de haber sido asada, lo que es importante ya que los huesos presentes en contextos arqueológicos podrían haber sido sometidos a este tipo de cocción (Tabla 4). Sin embargo, se puede observar que fue necesario amplificar y secuenciar fragmentos pequeños del Cytb de esta muestra (Citb1 + Citb2 + Citb3). Algo similar sucedió con la de *Bos taurus*, que para el análisis de Cytb es atribuible tanto a cebú como a vaca. Más allá de eso, fue correctamente atribuida a bovino. Así, consideramos que el protocolo aplicado es confiable y permite, en el caso del sitio Acevedo 1, alcanzar un nivel de identificación taxonómica mayor que el que habíamos obtenido por medios tradicionales (morfológicos).

### ESTUDIO DEL MATERIAL ARQUEOLÓGICO

Seleccionamos cuatro fragmentos óseos del sitio Acevedo 1 asignados a la clase mamífero (Figura 3). Los huesos no fueron tratados con métodos químicos de conservación preventiva y su estado de conservación se detalla en la Tabla 5. Para poder controlar el efecto de la degradación de la muestra en función de su antigüedad, partiendo del supuesto de que a mayor profundidad tendríamos mayor antigüedad y, por ende, mayor degradación, seleccionamos muestras que corresponden a distintos niveles artificiales (Tabla 5). Si bien este no es el único factor que interviene en la preservación, ya que las condiciones del contexto de

deposición juegan un papel clave, la antigüedad relativa es el único de esos factores que podemos controlar. Además, cabe destacar que la muestra A2 presenta modificaciones de origen antrópico –negativo de impacto–, lo que nos permitiría vincularla con la ocupación humana del alero. En la Tabla 6 se presentan los resultados por Cytb.

### DISCUSIÓN

A diferencia del análisis de las subactuales, sólo se logró la identificación taxonómica de la mitad de las muestras arqueológicas. A2 y A4 no arrojaron resultados probablemente debido a la extensa

Muestra	Fragmento analizado	Resultados			
		Nombre científico	Identidad (%)	E-value	Nombre común
1	Citb1 + Citb2 + Citb3	<i>Ovis aries</i>	100	2,E-84	Oveja
2	Citb1 + Citb2 + Citb3	<i>Lama guanicoe</i>	100	9,E-88	Camélido (Guanaco)
		<i>Lama pacos</i>	98	9,E-83	Camélido (Alpaca)
		<i>Lama glama</i>	98	9,E-83	Camélido (Llama)
		<i>Vicugna vicugna</i>	92	2,E-64	Camélido (Vicuña)
3	Citb	<i>Otaria byronia / flavescens</i>	100	4,E-159	Lobo marino
		<i>Arctocephalus australis</i>	94	1e-127	Lobo marino de dos pelos
4	Citb + Citb1	<i>Bos taurus</i>	100	3,E-152	Bovino (Toro / Vaca)
		<i>Bos indicus</i>	100	3,E-152	Bovino (Cebú)
5	Citb	<i>Lama guanicoe</i>	100	4,E-159	Camélido (Guanaco)
		<i>Lama glama</i>	99	2,E-152	Camélido (Llama)
		<i>Lama pacos</i>	98	9,E-151	Camélido (Alpaca)
		<i>Vicugna vicugna</i>	96	1,E-138	Camélido (Vicuña)
6	Citb1	<i>Hippocamelus bisulcus</i>	100	2,E-84	Cérvido (Huemul)
		<i>Ozotoceros bezoarticus</i>	94	5,E-66	Cérvido (Venado de las pampas)
		<i>Pudu Puda</i>	94	5,E-66	Cérvido (Pudú)
7	Citb1 + Citb2	<i>Eubalaena australis</i>	100	1,E-84	Ballena Franca
		<i>Eubalaena glacialis</i>	100	1,E-84	
8	Citb	<i>Homo sapiens</i>	100	3,E-155	Humano
9	Citb	<i>Rhea pennata</i>	100	4,E-159	Ñandú

Tabla 4. Determinaciones alcanzadas por Cytb a partir de las muestras subactuales.

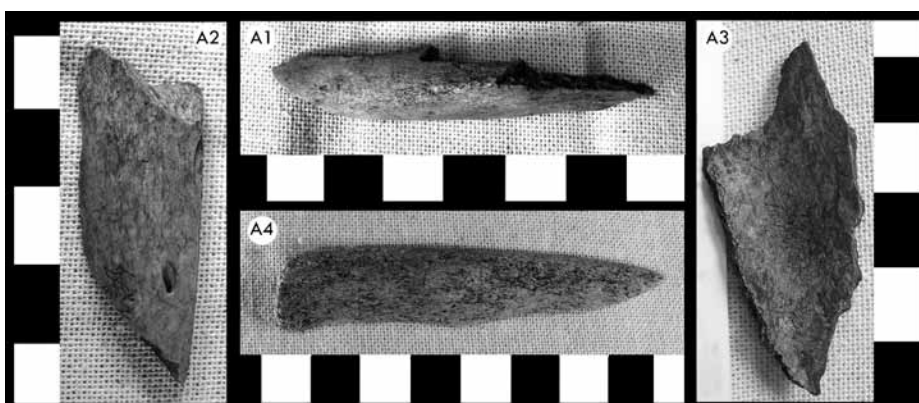


Figura 3. Muestras arqueológicas seleccionadas para realizar el análisis de Cytb.

degradación del ADN. Ambas muestras presentaron inhibidores de PCR detectados mediante Quantifiler. Por tal motivo, fueron sometidas a un tratamiento ulterior de purificación mediante columnas QIAquick (QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN), que permitieron eliminar los inhibidores. Todas las muestras arqueológicas fueron amplificadas para el fragmento de 358pb (Citb), así como para 219pb (Citb1), 230pb (Citb2) y 220pb (Citb3). Dado que las muestras A2 y A4 fallaron con todos los pares de *primers* ensayados, es improbable que se trate de una falla debida a la presencia de polimorfismo en el sitio de anillamiento del *primer*. Por este motivo, consideramos que la falla de la amplificación se debió a la extensiva degradación del ADN.

Estas muestras provienen de los niveles 4 y 5, pero de dos cuadrículas distintas. Una de ellas (A2) era la que hubiera permitido asociar la presencia de fauna a la explotación humana, ya que presentaba un negativo de lascado. De las que se logró identificar, una corresponde a *Ovis aries* y procede del nivel 1, que es el más cercano a la superficie actual del sitio. De manera coherente, esta especie también fue identificada morfológicamente en los niveles 2 y 4 de la cuadrícula vecina. La otra muestra, A3, fue identificada con mayor probabilidad como *Hippocamelus bisulcus* y procede del nivel 4. Si bien esta especie no fue reconocida morfológicamente en el sitio, se sabe de la presencia de este cérvido en la región (Vila *et al.* 2010). Por otro lado, las otras tres especies que dieron menor probabilidad (*H. antisensis*, *Pudu puda* y

*Ozotoceros bezoarticus*) no están presentes en la zona en la actualidad y no hay datos arqueológicos que sustenten su presencia en el pasado. La más cercana geográficamente es el pudú, registrada a esta latitud en Chile (Jiménez 2010). Si bien podría estar presente dada su vecindad actual, el tamaño de los huesos de este cérvido lo hacen identificable morfológicamente. El tamaño de la hoja de la escápula del pudú es más pequeño que el de A3. Por ende, estas evidencias morfológicas, sumadas al porcentaje de identidad (100%) que dio el análisis del Cytb, indican que el fragmento corresponde a huemul. Este resultado refuerza la asociación entre el ambiente de bosque y el huemul, tendencia identificada para Patagonia continental en general (Barberena *et al.* 2011; Tessone *et al.* 2014; Fernández *et al.* 2015).

Por otra parte, es interesante destacar que materiales procedentes de dos cuadrículas muy cercanas entre sí presentan situaciones disímiles en cuanto a la conservación del ADN (muestras A1 y A3 vs. muestras A2 y A4). Además, la presencia de *Ovis aries* –introducidos en tiempos históricos en la región– en distintos niveles del sitio (niveles 4 y 2, como fueron identificados morfológicamente; y nivel 1, como permitió determinar el análisis del Cytb) corrobora la interpretación de que Acevedo 1 constituye un palimpsesto.

**CONCLUSIONES**

Los resultados del test ciego muestran que el protocolo seguido por el LGF- EAAF lleva a la identificación taxonómica de restos óseos presentes en sitios subactuales, lo cual puede resolver la problemática forense relacionada con la identificación de restos óseos no humanos. Pero además, los resultados obtenidos con las muestras arqueológicas permiten su aplicación a contextos más antiguos de los esperables en el ámbito forense, tal como lo prueba el caso exitoso de las muestras A1 y A3, dependiendo de la degradación de los materiales analizados. En el caso de Acevedo 1, este análisis también permite aportar la primera identificación arqueológica de huemul en el centro-oeste del Chubut, que surge de la combinación de los resultados que se presentan más arriba y del análisis morfológico tradicional. Sin embargo, la presencia de este animal no se pudo relacionar con la ocupación humana del sitio. A pesar de los resultados positivos obtenidos en

Muestra (Número de pieza)	Cuadrícula	nivel	Características
A1 (13-2)	F15B	1	Evidencias de mascado por carnívoros
A2 (12-2)	F16D	4	Marcas de raíces y evidencias de procesamiento
A3 (18-1)	G16D	4	Fragmento de la hoja de una escápula. Teñido por sedimentos
A4 (20-1)	E9A	5	Muy deteriorado. Carece de superficie cortical. Meteorizado (química o subaérea)

Tabla 5. Muestras arqueológicas del sitio Acevedo 1.

Muestra	Fragmento analizado	Resultados			
		Nombre científico	Identidad (%)	E-value	Nombre común
A1	Citb1 + Citb2 + Citb3	<i>Ovis aries</i>	100	6,E-90	Oveja
A2	Citb1 + Citb2 + Citb3	-			
A3	Citb1	<i>Hippocamelus bisulcus</i>	100	3,E-73	Cérvido Huemul
		<i>Hippocamelus antisensis</i>	95	2,E-60	Cérvido Taruca
		<i>Pudu puda</i>	95	3,E-58	Cérvido Pudú
		<i>Ozotoceros bezoarticus</i>	93	1,E-56	Cérvido Venado de las pampas
A4	Citb1 + Citb2 + Citb3	-			

Tabla 6. Determinaciones alcanzadas por Cytb de las muestras arqueológicas.

este trabajo, el carácter destructivo del análisis y sus altos costos hacen que su aplicación deba ser evaluada adecuadamente en función de la problemática arqueológica bajo estudio.

### Agradecimientos

A la familia Acevedo y a las autoridades municipales de Río Pico. A Ana Forlano por la Figura 3, y a Ana Fondebrider y Florencia Rizzo por su colaboración en la confección de la Figura 1. El proyecto arqueológico fue financiado con un subsidio FONCYT PICT 2010 N°1810.

### REFERENCIAS CITADAS

- Barberena, R., C. Méndez, F. Mena y O. Reyes  
2011 Endangered species, archaeology and stable isotopes: huemul (*Hippocamelus bisulcus*) isotopic ecology in central-western Patagonia (South America). *Journal of Archaeological Science* 38 (9): 2313-2323.
- Davoren, J., D. Vanek, R. Konjhodzic, J. Crews, E. Huffine y T. Parsons  
2007 Highly effective DNA extraction method for nuclear short tandem repeat testing of skeletal remains from mass graves. *Croatian Medical Journal* 48 (4): 478-485.
- Fernández, H., S. Hughes, J.-D. Vigne, D. Helmer, G. Hodgins, C. Miquel, C. Hänni, G. Luikart y P. Taberlet  
2006 Divergent mtDNA lineages of goats in an Early Neolithic site, far from the initial domestication areas. *Proceedings of the National Academy of Science* 103 (42): 15.375-15.379.
- Fernández, P. M., I. Cruz, J. B. Belardi, M. De Nigris y A. S. Muñoz  
2015 Human predation and Natural history of huemul (CERVIDAE; *Hippocamelus bisulcus* Molina) in Patagonia: A Zooarchaeological Analysis. *Journal of Ethnobiology*. 35 (3): 472-498.
- Fisher, D., M. Holland, L. Mitchell, P. S. Sledzik, A. W. Wilcox, M. Wadhams y V. W. Weed  
1993 Extraction, Evaluation, and Amplification of DNA from Decalcified and Un-decalcified United States Civil War Bone. *Journal of Forensic Sciences* 38 (1): 60-68.
- Hagelberg, E. y J. Clegg  
1991 Isolation and Characterization of DNA from Archaeological Bone. *Proceedings of Royal Society of London, Series B* 244: 45-50.
- Hochmeister, M. N., B. Budowle, U. V. Borer, U. Eggmann, C. T. Comey y R. Dimhofer  
1991 Typing of Deoxyribonucleic Acid (DNA) Extracted from Compact Bone from Human Remains. *Journal of Forensic Sciences* 36 (6): 1649-1661.
- Hopgood R., K. M. Sullivan y P. Gill  
1992 Strategies for automated Sequencing of Human Mitochondrial DNA directly from PCR products. *Biotechniques* 14 (1): 82-92.
- Jiménez, J. E.  
2010 Southern Pudu *puda* (Molina 1782). En *Neotropical cervidology: biology and medicine of Latin American deer*, editado por J. M. B. Duarte y S. González, pp. 140-150. Jaboticabal, Funep y Gland y IUCN, Brasil y Suiza.
- Linacre, A., L. Gusmão, W. Hecht, A. P. Hellmann, W. R. Mayr, W. Parson, M. Prinz, P. M. Schneider y N. Morling  
2011 ISFG: Recommendations regarding the use of non-human (animal) DNA in forensic genetic investigations. *Forensic Science International: Genetics* 5 (5): 501-505.
- Loreille, O., J.-D. Vigne, C. Hardy, C. Callou, F. Treinen-Claustre y N. Dennebouy  
1997 First distinction of sheep and goat archaeological bones by the means of their fossil mtDNA. *Journal of Archaeological Science* 24: 33-37.
- Madden, T.  
2013 The BLAST Sequence Analysis Tool. *The NCBI Handbook* [Internet], 2da. ed. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK153387/> (15 marzo 2013).
- Pardiñas, U. F. J.  
1999 Tafonomía de microvertebrados en yacimientos arqueológicos de Patagonia (Argentina). *Arqueología* 9: 265-340.
- Parson, W., K. Pegoraro, H. Niederstätter, M. Föger y M. Steinlechner  
2000 Species identification by means of the cytochrome b gene. *International Journal of Legal Medicine* 114 (1-2): 23-28.
- Pedrosa, S., U. Metehan, J.-J. Arranz, B. Gutiérrez-Gil, F. San Primitivo e Y. Bayón  
2005 Evidence of three maternal lineages in near eastern sheep supporting multiple domestication events. *Proceedings of the Royal Society B* 272: 2211-2217.
- Pereira F., J. Meirinhos, A. Amorim y L. Pereira  
2006 Analysis of inter-specific mitochondrial DNA diversity for accurate species identification. *International Congress Series* 1288: 103-105.
- Pereira F., J. Carneiro y A. Amorim  
2008 Identification of Species with DNA-Based Technology: Current Progress and Challenges. *Recent Patents on DNA & Gene Sequences* 2: 187-200.
- Rizzo, F.  
2015 Sitio Acevedo 1. Registro funerario en el noroeste de Patagonia (Río Pico, Chubut). Disponible en biblioteca del INAPL.



- Scheinsohn, V., F. Rizzo y S. Leonardt  
2010 Investigaciones arqueológicas en el área centro-oeste de Chubut. En *Arqueología Argentina en el Bicentenario de la Revolución de Mayo*, editado por J. Bárcena y H. Chiavazza, pp. 1981-1985. Universidad Nacional de Cuyo y CONICET, Mendoza.
- Scheinsohn, V., S. Leonardt y F. Rizzo  
2011a Investigaciones arqueológicas en el área Centro-Oeste del Chubut: más fuentes para la historia de la ocupación humana del territorio patagónico. En *VIII Congreso de Historia Social y Política de la Patagonia argentino-chilena*, pp. 279-283. Secretaría de Cultura del Chubut, Rawson.
- Scheinsohn, V. C. Szumik, S. Leonardt y F. Rizzo  
2011b La localidad de Río Pico (Chubut) en el marco de los patrones distribucionales del arte rupestre en el Norte de Patagonia. *Libro de resúmenes. VIII Jornadas de Arqueología de la Patagonia*: 73-74. Malargüe.
- Scheinsohn, V., S. Leonardt, F. Rizzo, N. Kuperszmit y M. Carpio González  
2013 De la meseta a los Andes: investigaciones arqueológicas en los valles del Pico y Génoa (Provincia del Chubut). *Libro de Resúmenes. XVIII Congreso Nacional de Arqueología Argentina*: 308. Universidad Nacional de La Rioja, La Rioja.
- Speller, C., B. Kemp, S. Wyatt, C. Monroe, W. Lipe, U. Arndt, y D. Yang  
2010 Ancient mitochondrial DNA analysis reveals complexity of indigenous North American turkey domestication. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (7): 2807-2812.
- Stock, F., C. Edwards, R. Bollongino, E. Finlay, J. Burger y D. Bradley  
2009 Cytochrome b sequences of ancient cattle and wild ox support phylogenetic complexity in the ancient and modern bovine populations. *Animal Genetics* 40 (5): 694-700.
- Tessone, A., P. M. Fernández, C. Bellelli, y H. Panarello  
2014  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  characterization of modern Huemul (*Hippocamelus bisulcus*) from the Patagonian Andean Forest. Scope and limitations of their use as a geographical marker. *International Journal of Osteoarchaeology* 24: 219-230.
- Vila, A., C. E. Saucedo Gálvez, D. Aldridge, E. Ramilo y P. Corti González  
2010 South Andean Huemul *Hippocamelus bisulcus* (Molina 1782). *Neotropical cervidology: biology and medicine of Latin American deer*, editado por J. M. B. Duarte y S. González, pp. 89-100. Jaboticabal, Funep y Gland y IUCN. Brasil y Suiza.
- Weinstock, J., B. Shapiro, A. Prieto, J. Marín, B. A. González, M. Thomas, P. Gilberta, E. Willersleva  
2009 The Late Pleistocene distribution of vicuñas (*Vicugna vicugna*) and the "extinction" of the gracile llama ("*Lama gracilis*"): New molecular data. *Quaternary Science Reviews* 28 (15-16): 1369-1373.
- Yang, D., A. Cannon y S. Saunders  
2004 DNA species identification of archaeological salmon bone from the Pacific Northwest Coast of North America. *Journal of Archaeological Science* 31 (5): 619-631.