
TIPIFICACIÓN DE ADN MITOCONDRIAL PRECOLOMBINO A PARTIR DE RESTOS DENTALES DE UN INDIVIDUO PERTENECIENTE A LA CULTURA PARACAS (PERÚ)

PRE-COLUMBIAN MITOCHONDRIAL DNA TYPING ON DENTAL REMAINS FROM AN INDIVIDUAL BELONGING TO THE PARACAS CULTURE (PERÚ)

Marcela Díaz-Matallana^{1,2}, Ignacio Briceño Balcázar^{1,2},
Jorge Reynolds Pombo³, Alberto Gómez Gutiérrez^{1,3}

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue el de determinar *in vitro* el haplogrupo de la región hipervariable I (HVR-I) del ADN mitocondrial (ADNmt) obtenido a partir de una muestra dental perteneciente a un individuo asociado a la comunidad de los Paracas, hallada por Jorge Reynolds en los años 60 del siglo XX en Ica (Perú). Gracias a esta tipificación molecular, hemos podido contribuir a la información arqueológica y antropológica ya registrada para esta población peruana de más de 2000 años de antigüedad, determinando su linaje materno y su vínculo con otros pobladores nativos americanos en la región.

Palabras clave: Paracas, ADN mitocondrial, Haplogrupos, Pre-Colombino, Perú.

ABSTRACT

The aim of the present study was to determine *in vitro* the haplogroup of the hypervariable region I (HVR-I) of mitochondrial DNA (mtDNA) obtained from a dental sample belonging to an individual associated with the Paracas pre-Columbian community, which was found by Jorge Reynolds in the XXth century in Ica (Perú). We were able to contribute new and complementary information to archaeological and anthropological data already registered for this Peruvian population who lived more than 2000 years before the present, determining his xmaternal lineage and linking him to other contemporary Native American peoples in the region.

Key words: Paracas, mitochondrial DNA, Pre-Columbian, Haplogroups, Peru.

¹ MD, MSc, PhD. Instituto de Genética Humana, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C.

² MD, PhD. Facultad de Medicina, Universidad de La Sabana, Chía, Cundinamarca.

³ Ing. Elect., Academia Nacional de Medicina, Bogotá, D.C.

INTRODUCCIÓN

América fue el último continente en ser colonizado por los humanos, y los datos moleculares que proporcionan los distintos sistemas genéticos (Schurr & Sherry 2004) han sido ampliamente empleados para arrojar luz sobre las rutas, los horarios de llegada y la dispersión humana en el Nuevo Mundo (Achilli *et al.* 2008).

Los datos del ADN mitocondrial (ADNmt) han sido utilizados extensivamente para entender la historia de las poblaciones humanas (Fagundes *et al.* 2008, Melton *et al.* 2007, Hernstadt *et al.* 2002). La secuenciación directa de la región control del ADNmt en combinación con los RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) han permitido análisis complejos de polimorfismos del ADNmt en poblaciones humanas (Bermisheva *et al.* 2003). Incluso, el estudio de las secuencias completas del ADNmt de nativos americanos ha permitido a los investigadores examinar la variación del ADNmt en el Nuevo Mundo con un mayor poder de resolución (Tamm *et al.* 2007).

A partir de la última década del siglo XX, la totalidad de los ADNmt reportados en nativos americanos podrían remontarse a cuatro haplogrupos principales de origen asiático compartidos por las poblaciones de Norte, Centro y Sur América (Torroni *et al.* 1993). Estos haplogrupos fueron nombrados inicialmente A, B, C y D, y ahora se denominan A2, B2, C1 y D1 (Achilli *et al.* 2008, Bandelt *et al.* 2003). Posteriormente, un quinto haplogrupo ahora conocido como X2a fue descrito en los nativos americanos, pero su distribución geográfica se limita a ciertas poblaciones amerindias de Norteamérica y a poblaciones en el norte de Europa, lo cual ha sido interpretado como una eventual evidencia de un poblamiento temprano de origen europeo (Reidla *et al.* 2003).

A pesar de una larga historia de sociedades complejas y pese a una riqueza lingüística actual y

gran diversidad étnica, relativamente pocas poblaciones han sido analizadas en Perú desde el punto de vista de la genética de poblaciones (Lewis *et al.* 2007, Lewis *et al.* 2004, Fuselli *et al.* 2003). Se han reportado solamente algunos estudios sobre ADN antiguo de poblaciones peruanas, tal como un trabajo concerniente a la evidencia del ADNmt en la secuencia de rituales del sacrificio de niños incas (Wilson *et al.* 2007), o recientes análisis de ADN antiguo que involucran poblaciones de indígenas paracas (Fehren-Schmitz *et al.* 2010, Fehren-Schmitz *et al.* 2011). De acuerdo con el primer estudio de Fehren-Schmitz y colaboradores (2010), las frecuencias de los haplogrupos mitocondriales encontradas en los paracas fueron ordenadas de mayor a menor, así: **D > C > B > A**.

MATERIALES Y MÉTODOS

Prevención de contaminación

Para la tipificación mitocondrial de esta muestra se emplearon protocolos implementados en el Laboratorio de Genética Humana de la Universidad de La Sabana y el Instituto de Genética Humana de la Pontificia Universidad Javeriana. Se deben tener presentes, en este tipo de muestras, los criterios de autenticidad establecidos para ADN antiguo (Gilbert *et al.* 2005, Hummel 2003, Jara *et al.* 2010, Casas-Vargas *et al.* 2010), los cuales se deben ajustar a las siguientes recomendaciones: a) Manipular el material óseo con guantes nuevos e independientes para cada muestra, previamente lavados con hipoclorito de sodio al 5% y, así mismo, usar ropa protectora; b) Emplear material estéril para cada procedimiento (extracción, amplificación y secuenciación); c) Incluir controles negativos en las amplificaciones; d) Secuenciar el mismo fragmento del ADNmt de los investigadores que estuvieron en contacto directo con el material óseo, y e) Confirmar la reproducibilidad de la secuencia en otro laboratorio.

Pre-tratamiento de las muestras dentales

La Figura 1, ilustra los pasos del tratamiento de las muestras dentales antes de proceder a la extracción de ADN. De acuerdo con el protocolo por Kalmar *et al.* (2000), se sugiere la eliminación de la superficie externa antes de la limpieza general. Sin embargo, se ha observado que las muestras dentales antiguas que se han venido trabajando en el Laboratorio de

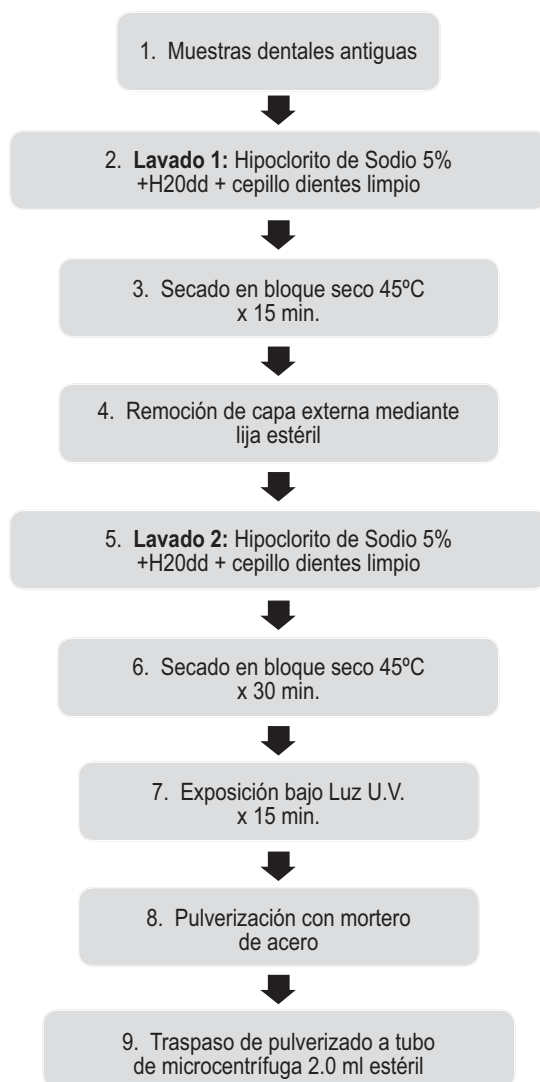


Figura 1. Diagrama de flujo que indica el pretratamiento de la muestra dental precolombina

Genética Humana de la Universidad de La Sabana, requieren de una primera limpieza externa antes de remover la capa superficial y una segunda limpieza luego de esta remoción, por la presencia de impurezas (Figura 1). Cabe aclarar que para el uso con el mortero de acero, la muestra se encuentra protegida en doble bolsa estéril (luz U.V.) resellable para evitar el contacto directo con el mortero y de esta forma contrarrestar la eventual contaminación.

EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

El protocolo consiste en una extracción salina, el método aquí empleado es adaptado de Silva *et al.* (2008) y Jara *et al.* (2010). El pulverizado a partir de diente se coloca en un tubo de micro-centrifuga estéril de 2ml y se adiciona una solución compuesta por: 650µl de buffer de lisis celular (EDTA 0,5M, pH 8,0 y SDS al 10%) y 200µl de proteinasa K (0,75 mg/ml). La reacción se incuba durante 48 horas en baño serológico a 56°C con agitación intermitente (vortex) el mayor tiempo posible. Posteriormente se hacen dos lavados sucesivos del tejido para remover el componente proteico mediante precipitación con 120µl de acetato de amonio [10M]. A continuación se precipita el ADN con 600µl isopropanol 100% frío. El ADN se resuspende en un volumen de 40-50µl de agua destilada y desionizada estéril (H₂O_{dd}) y es conservado a -20°C (Figura 2).

A continuación, se realiza una purificación del ADN con un estuche comercial compuesto de columnas de sílica (Figura 2). La ventaja de este método es que elimina posibles inhibidores de PCR y sustancias húmicas. Conforme con Lee *et al.* (2010), las columnas de sílica influyen positivamente en extracciones efectivas de ADN a partir de restos óseos antiguos.

El ADN extraído a partir de un colmillo proveniente de un cráneo precolombino trepanado que está registrado en la colección particular de Jorge

Reynolds, fue purificado y diluido en diferentes alícuotas, y éstas se utilizaron para amplificar la región HVR-I del ADNmt.

Amplificación ADN mitocondrial

Inicialmente se emplearon un par de iniciadores que amplifican una gran parte de la región hipervariable I (427pb) pero se obtenían productos inespecíficos. Por tal razón, se empleó otro par de iniciadores que amplifican un fragmento de 229pb, un tamaño de fragmento con mayores posibilidades de ser amplificado, puesto que el ADN antiguo tiende a encontrarse fragmentado. Estos últimos iniciadores (Silva *et al.* 2008, Vigilant *et al.* 1989) fueron: a) *L16209*: 5'-CCATGCTTACAAGCAAGT-3', y b) *H16401*: 5'-TGATTTCACGGAGGATGGTG-3'.

La reacción de amplificación (Buffer 1X Bioline®, 2,0mM MgCl₂ Bioline®, 0,2mM dNTPs, 0,3µM de cada iniciador y 1,0 U/µl de Taq polimerasa Biolase (Bioline®) en un volumen final de 25 µl) con 3 µl del ADN aislado es sometida a 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 (Figura 2).

Posteriormente se realizó una corrida electroforética en gel de agarosa en carriles independientes, con sus respectivos controles negativo y positivo, en el siguiente orden: **Carril 1**: ADNmt paracas purificado; **Carril 2**: ADNmt paracas purificado y diluido 1/10; **Carril 3**: ADNmt paracas purificado y diluido 1/50; **Carril 4**: ADNmt paracas purificado y diluido 1/100; **Carriles 5 y 10**: Marcador de pesos moleculares Hyperladder II (Bioline®); **Carril 6**: ADNmt paracas purificado y diluido 1/150; **Carril 7**: Control Negativo (sin ADN); **Carriles 8 y 9**: Controles positivos 1 y 2 (ADNmt contemporáneo post-extracción Chelex 10%) [Figura 3].

Los productos de PCR fueron verificados en geles de agarosa al 1.5%, teñidos con sybr safe

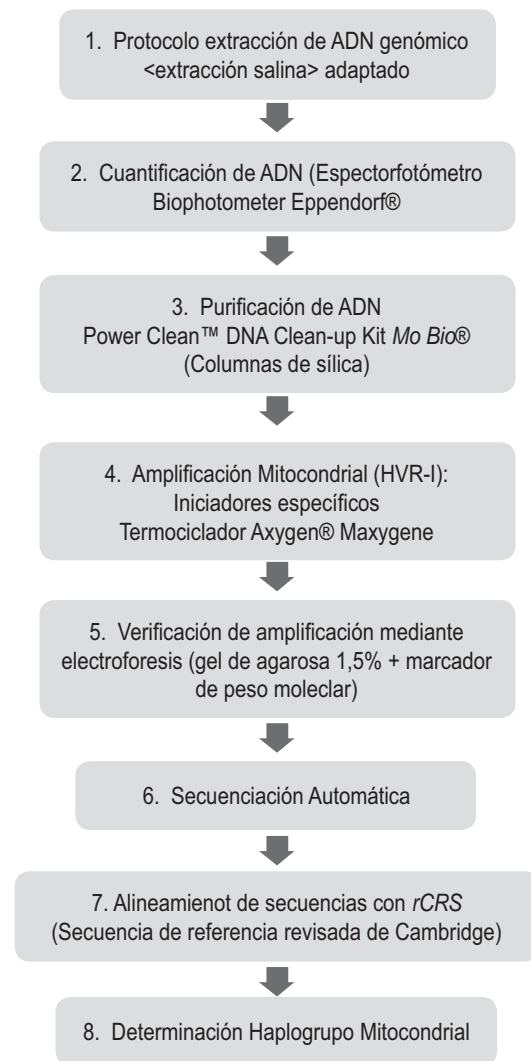


Figura 2. Diagrama de flujo que señala cada uno de los pasos necesarios para la determinación del haplogrupo mitocondrial a partir del aislamiento del ADN genómico.

(Invitrogen®), observados en un transiluminador de luz U.V., y fotografiados con cámara digital.

Determinación de las Secuencias de ADNmt

Los productos de PCR son purificados y secuenciados en un Analizador Genético ABI 3730XL (Macrogen, Korea). Para la determinación del haplogrupo mitocondrial, las secuencias fueron anali-

zadas mediante el alineamiento con la secuencia de referencia revisada de Cambridge –rCRS- [Andrews et al. 1999, Anderson et al. 1981] con el programa SeaView v.4 (Gouy et al. 2010) y revisión de los electroferogramas respectivos con el uso de Chromas v.2.33 (Copyright ©1998-2008 Technelysium Pty Ltd).

RESULTADOS

Una vez extraído y amplificado el ADN proveniente de un resto dental precolombino a través de los métodos descritos, se obtuvo una banda compatible con el tamaño esperado de 229 pares de bases (Figura 3). Este producto de amplificación molecular fue enviado a secuenciación, con el fin de determinar el haplogrupo mitocondrial correspondiente a este individuo de cerca de 2000 años de antigüedad. En la Figura 4 se puede apreciar una sección del electroferograma obtenido en el proceso de secuenciación del ADN precolombino amplificado, que incluye los nucleótidos 16191 a 16217. Una vez identificada la secuencia de este fragmento mitocondrial, se procedió a la asignación del haplogrupo mitocondrial correspondiente, teniendo en cuenta las mutaciones diagnósticas descritas en Díaz-Matallana & Martínez-Cruzado (2010) y Achilli *et al.* (2008).

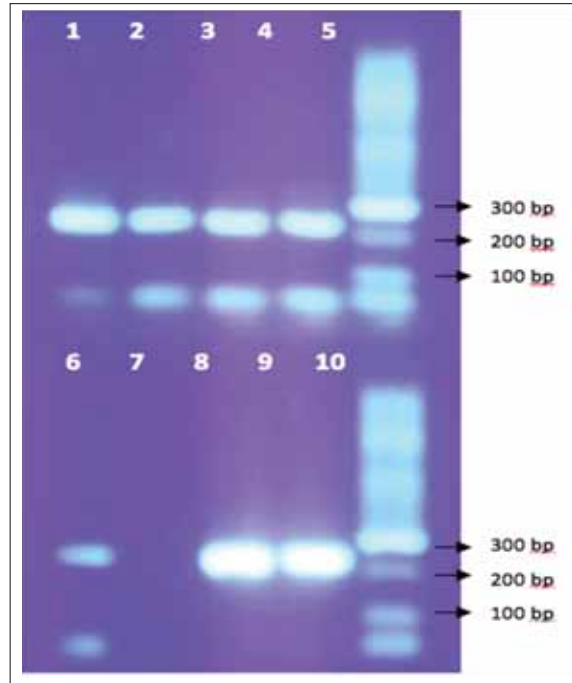


Figura 3. Visualización de ADNmt de una muestra precolombina de la cultura Paracas del Perú.

En la Tabla 1 se puede apreciar el haplogrupo obtenido a partir de la muestra procesada en el presente estudio, el cual fue comparado con otros haplogrupos reportados por Fehren-Schmitz *et al.* (2010) para individuos provenientes del mismo

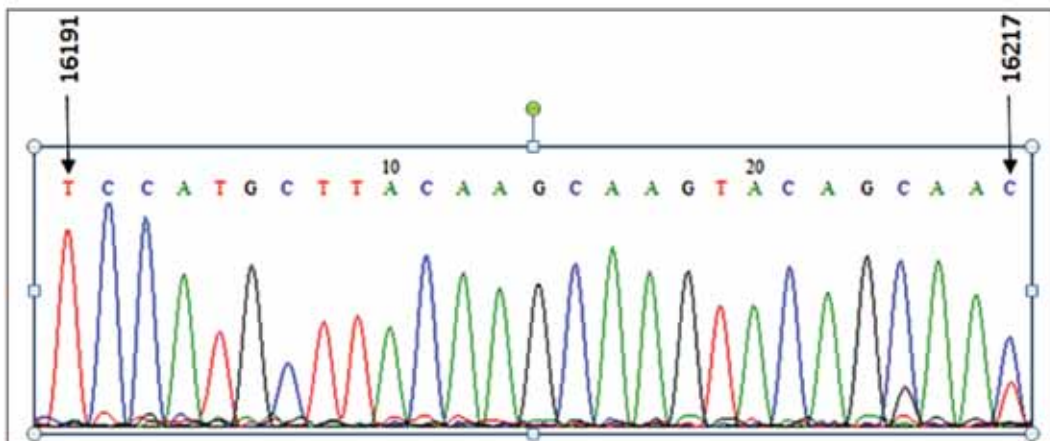


Figura 4. Electroferograma de la secuencia obtenida en el ADNmt de un individuo de la cultura Paracas.

periodo y cultura. En la Figura 5 se incluye la representación de la filiación de los individuos analizados hasta el momento de este trabajo, bajo el esquema de una red filogenética de haplotipos pertenecientes al haplogrupo B, construida con el programa *Network 4.6* (Fluxus Technology Ltd).

Se obtuvo una banda compatible con el tamaño esperado (229 pb), que fue enviada a secuenciación con el fin de determinar el haplogrupo mitocondrial correspondiente a este individuo de cerca de 4000 años de antigüedad. Para la asignación del haplogrupo mitocondrial se deben tener en cuenta mutaciones diagnósticas, descritas en Díaz-Matallana & Martínez-Cruzado (2010) y Achilli *et al.* (2008).

Tabla 1. Haplogrupos mitocondriales reportados hasta la fecha en individuos Paracas

Muestra	16191	16217	16221	16223	16245	16263	n	Referencias
rCRS	C	T	C	C	C	T		Andrews <i>et al.</i> 1999
PA-B1	.	C	1	Fehren-Schmitz <i>et al.</i> 2010
PA-B2	.	C	.	.	T	.	1	
PA-B3	.	C	5	
PA-B4	.	C	2	
PA-B5	.	C	1	
PA-B6	.	C	1	
PA-B7	.	C	4	
PA-B8	.	C	1	
PA-B9	.	C	2	
PA-ICA	T	C	1	Presente estudio
PHERRE	.	C	T	.	.	.	6	Silva <i>et al.</i> 2008

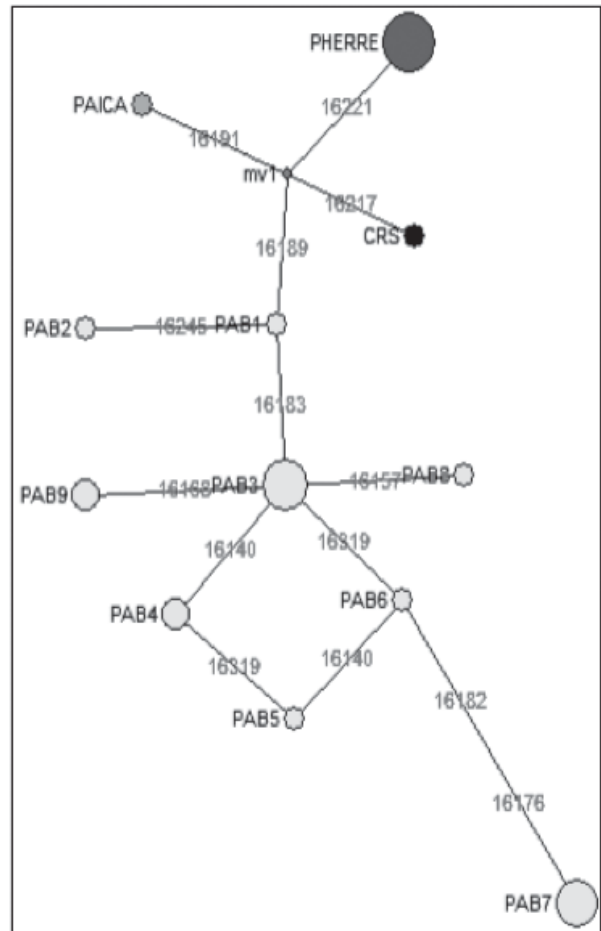


Figura 5. Red filogenética de haplotipos correspondientes al haplogrupo B.

DISCUSIÓN

El presente trabajo muestra la extracción, amplificación y secuenciación exitosas del ADN mitocondrial obtenido a partir de un diente perteneciente a un individuo de la cultura de los paracas en el Perú precolombino. El linaje materno del individuo analizado corresponde al haplogrupo B, uno de los más antiguos en América. La tipificación exitosa del ADN de cerca de 2000 años de antigüedad permite concluir que el haplotipo mitocondrial de este individuo particular no corresponde con

ninguno de los haplotipos reportados hasta el momento en esa misma cultura, convirtiéndose así en marcador privado de un linaje materno nuevo entre los paracas. La importancia de este hallazgo consiste en que, a pesar de las particularidades nucleotídicas registradas en la presente tipificación individual, se puede establecer la relación estrecha de este haplotipo privado con los demás haplotipos hallados por Fehren-Schmitz *et al.* (2010). Esta relación revela un ancestro común relativamente reciente entre los individuos pertenecientes a la cultura de los paracas que han sido reportados hasta el presente, configurando así un eventual efecto fundador en los pobladores de esta región a partir de inmigrantes muy tempranos, y muy poco diversos, en el continente americano.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al biólogo Daniel Lancheros, al personal de apoyo del Instituto de Genética Humana de la Universidad Javeriana, y a los colaboradores de la Facultad de Medicina de la Universidad de la Sabana, especialmente al Dr. Fernando Lizcano y a la Dra. Diana Vargas del Grupo CIBUS por la utilización del Espectrofotómetro Biophotometer Eppendorf® para la cuantificación del ADN, por la obtención de agua destilada y desionizada a partir de un equipo Milli-Q®, así como por el uso del autoclave. También agradecemos al Sr. Jorge Rodríguez del Laboratorio de Biología Molecular de Ingeniería de La U. de La Sabana por la esterilización de material.

REFERENCIAS

- Achilli A, Perego UA, Bravi CM, Coble MD, Kong QP, Woodward SR, Salas A, Torroni A, Bandelt HG. The phylogeny of the four Pan-American mtDNA haplogroups: implications for evolutionary and disease studies. *PLoS ONE* 2008; 3: e1764.
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, De Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981; 290: 457-65.
- Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nature Genet.* 1999; 23: 147.
- Bandelt HJ, Herrnstadt C, Yao YG, Kong Q-P, Kivisild T, Rengo C, Scozzari R, Richards M, Villems R, Macaulay V, Howell N, Torroni A, Zhang YP. Identification of Native American founder mtDNAs through the analysis of complete mtDNA sequences: some caveats. *Ann Hum Genet.* 2003; 67: 512-24.
- Bermisheva MA, Viktorova TV, Husnutdinova EK. Polymorphism of human mitochondrial DNA. *Rus J Genet.* 2003; 39 (8): 849-59.
- Casas-Vargas A, Gómez A, Briceño I, Díaz-Matallana M, Bernal JE, Rodríguez JV. High genetic diversity on a sample of pre-Columbian bone remains from Guane territories from Northwestern Colombia. *Am J Phys Anthropol.* 2011; 146:637-49.
- Díaz-Matallana M, Martínez-Cruzado JC. Estudios sobre ADN mitocondrial sugieren un linaje predominante en la Cordillera Oriental de Colombia y un vínculo suramericano para los arcaicos de Puerto Rico. *Univ Medica* 2010; 51 (3): 241-72.
- Fehren-Schmitz L, Warnberg O, Reindel M, Seidenberg V, Tomasto-Cagigao E, Isla-Cuadrado J, Hummel S, Herrmann B. Diachronic investigations of mitochondrial and Y-chromosomal genetic markers in pre-Columbian Andean highlanders from South Peru. *Ann Hum Genet.* 2011; 75 (2): 266-83.
- Fehren-Schmitz L, Reindel M, Cagigao ET, Hummel S, Herrmann B. Pre-Columbian population dynamics in coastal Southern Peru: A Diachronic Investigation of mtDNA Patterns in the Palpa Region by Ancient DNA Analysis. *Am J Phys Anthropol.* 2010; 141: 208-21.
- Fuselli S, Tarazona-Santos E, Dupanloup I, Soto A, Luiselli D, Pettener D. Mitochondrial DNA diversity in South America and the genetic history of Andean highlanders. *Mol Biol Evol.* 2003; 20: 1682-91.
- Gilbert MTP, Bandelt HG, Hofreiter M, Barnes I. Assessing ancient DNA studies. *TRENDS in Ecol Evol.* 2005; 20 (10): 541-4.
- Gouy M, Guindon S, Gascuel O. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol Biol Evol.* 2010; 27 (2): 221-4.
- Hummel S. *Ancient DNA Typing: Methods, Strategies and Applications.* Berlin-Heidelberg-New York: Springer; 2003.
- Lee HY, Park MJ, Kim NY, Sim JE, Yang WI, Shin KJ. Simple and highly effective DNA extraction methods from old skeletal remains using silica columns. *Forensic Sci Internal: Genetics* 2010; 4: 275-80.

- Jara NP, Díaz M, Villegas V, López de Mesa C, Torres D, Bernal J, Gómez A, Briceño I. Application of authenticity criteria in mitochondrial studies on archaic bone remains from a prehispanic Muisca population. *Col Médica*. 2010; 41 (4): 306-14.
- Kalmár T, Bachrati CZ, Marcsik A, Raskó I. A simple and efficient method for PCR amplifiable DNA extraction from ancient bones. *Nucleic Acids Res*. 2000; 28: e67.
- Lewis JR, Lizarraga B, Tito RY, Lopez PW, Iannacone G, Medina A, Martinez R, Polo S, De La Cruz AF, Caceres AMS, Stone AC. Mitochondrial DNA and the peopling of South America. *Hum Biol*. 2007; 79 (2): 159-78.
- Lewis CM, Tito RY, Lizarraga B, Stone AC. Land, language and loci: mtDNA in Native Americans and the genetic history of Peru. *Am J Phys Anthropol*. 2004; 127: 351-60.
- Melton PE, Briceño I, Gómez A, Devor EJ, Bernal JE, Crawford MH. Biological relationship between Central and South American Chibcha speaking populations: evidence from mtDNA. *Am J Phys Anthropol*. 2007; 133:753-70.
- Reidla M, Kivisild T, Metspalu E, Kaldma K, Tambets K, Tolk HV, Parik J, Loogväli EL, Derenko M, Malyarchuk B, Bermisheva M, Zhadanov S, Pennarun E, Gubina M, Golubenko M, Damba L, Fedorova S, Gusar V, Grechanina E, Mikerezi I, Moisan JP, Chaventré A, Khusnutdinova E, Osipova L, Stepanov V, Voevoda M, Achilli A, Rengo C, Rickards O, De Stefano GF, Papiha S, Beckman L, Janicijevic B, Rudan P, Anagnou N, Michalodimitrakis E, Kozziel S, Usanga E, Geberhiwot T, Herrnstadt C, Howell N, Torroni A, Villems R. Origin and diffusion of mtDNA Haplogroup X. *Am J Hum Genet*. 2003; 73 (5): 1178-90.
- Schurr TG, Sherry ST. Mitochondrial DNA and Y chromosome diversity and the peopling of the Americas: evolutionary and demographic evidence. *Am J Hum Biol*. 2004; 16: 420-39.
- Silva A, Briceño I, Burgos J, Torres D, Villegas V, Gómez A, Bernal JE, Rodríguez JV. Análisis de ADN mitocondrial en una muestra de restos óseos arcaicos del período Herrera de la Sabana de Bogotá. *Biomédica* 2008; 28: 569-77.
- Tamm E, Kivisild T, Reidla M, Metspalu M, Smith DG, Mulligan CJ, Bravi CM, Rickards O, Martinez-Labarga C, Khusnutdinova EK, Fedorova SA, Golubenko MV, Stepanov VA, Gubina MA, Zhanadov SL, Ossipova LP, Damba L, Voevoda MI, Dipierri JE, Villems R, Malhi RS. Beringian standstill and spread of Native American founders. *PLoS ONE* 2007; 2: e829.
- Torroni A, Schurr TG, Cabell MF, Brown MD, Neel JV, Larsen M, Smith DG, Vullo CM, Wallace DC. Asian affinities and continental radiation of the four founding Native American mtDNAs. *Am J Hum Genet*. 1993; 53: 563-90.
- Vigilant L, Pennington R, Harpending H, Kocher TD, Wilson AC. Mitochondrial DNA sequences in single hairs from a southern African population. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:9350-4.
- Wilson AS, Taylor T, Ceruti MC, Chavez JA, Reinhard J, Grimes V, Meier-Augenstein W, Cartmell L, Stern B, Richards M, Worobey M, Barnes I, Gilbert MTP. Stable isotope and DNA evidence for ritual sequences in Inca child sacrifice. *Proc Nat Acad Sci*. 2007; 104 (42): 16456-61.

Fecha de recibido: Febrero 6 de 2012
Fecha de aprobado: Febrero 16 de 2012

Dirección para correspondencia:
jebernal@javeriana.edu.co