

**ESTANDARIZACIÓN DE UNA METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN DE ADN
ARQUEOLÓGICO DE UNA POBLACIÓN PREHISPÁNICA DEL
SUROCCIDENTE COLOMBIANO**

MELISSA QUINTERO ESCOBAR



**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
PROGRAMA ACADÉMICO DE BIOLOGÍA
SANTIAGO DE CALI
2009**

**ESTANDARIZACIÓN DE UNA METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN DE ADN
ARQUEOLÓGICO DE UNA POBLACIÓN PREHISPÁNICA DEL
SUROCCIDENTE COLOMBIANO**

MELISSA QUINTERO ESCOBAR

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
PROGRAMA ACADÉMICO DE BIOLOGÍA
SANTIAGO DE CALI
2009**

**ESTANDARIZACIÓN DE UNA METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN DE ADN
ARQUEOLÓGICO DE UNA POBLACIÓN PREHISPÁNICA DEL
SUROCCIDENTE COLOMBIANO**

MELISSA QUINTERO ESCOBAR

Trabajo De Grado Presentado Como Requisito Parcial Para Optar Al Título De
Bióloga Con Mención En Genética.

Director:

GUILLERMO BARRETO RODRÍGUEZ, Ph.D.

Codirector:

YAMID ANDRÉS BRAGA GÓMEZ, M.Sc.

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
PROGRAMA ACADÉMICO DE BIOLOGÍA
SANTIAGO DE CALI
2009**

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
PROGRAMA ACADÉMICO DE BIOLOGÍA**

MELISSA QUINTERO ESCOBAR, 1986

**“ESTANDARIZACIÓN DE UNA METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN DE ADN
ARQUEOLÓGICO DE UNA POBLACIÓN PREHISPÁNICA DEL
SUROCCIDENTE COLOMBIANO”**

**MATERIAS O TEMAS: ADN Arqueológico, Genética Humana, Genética de
Poblaciones, ADN Mitocondrial, Población Prehispánica del Valle del Cauca.**

2009

NOTA DE APROBACIÓN

El trabajo de grado titulado “Estandarización De Una Metodología De Extracción De ADN Arqueológico De Una Población prehispanica Del Suroccidente Colombiano” presentado por la estudiante MELISSA QUINTERO ESCOBAR, para optar al título de Bióloga Con Mención En Genética, fue revisado por el jurado y calificado como:

**Guillermo Barreto Rodríguez Ph. D.
Director**

**Yamid Andrés Braga Gómez Ms. C.
Codirector**

**Heiber Cárdenas
Jurado**

*A mis padres, mis hermanos,
mis sobrinos y mí cuñada gracias por el
apoyo incondicional que siempre me han brindado.*

AGRADECIMIENTOS

Al profesor Guillermo Barreto por haber permitido mi vinculación al Laboratorio de Genética Molecular Humana, por la dirección y acompañamiento durante todo el desarrollo de mi investigación.

Al estudiante de Doctorado Yamid Andrés Braga por la codirección de mi investigación y por toda la ayuda brindada, quedo corta en palabras al expresar mi gratitud por todo el apoyo recibido.

Al Museo Arqueológico Julio César Cubillos, en especial al Profesor Carlos Armando Rodríguez, por haber permitido utilizar los restos óseos para el desarrollo de este proyecto.

Al estudiante de Maestría Ernesto León Rodríguez por todas las asesorías recibidas sobre arqueología y antropología de las sociedades prehispánicas.

A Leonardo Arias y Laura Jurado, por la ayuda y colaboración durante la presente investigación.

A Marina Villacís y a Liliana Rojas, por todos los momentos compartidos durante toda la carrera, por haber estado siempre conmigo cuando más las he necesitado.

A Augusto Ordoñez, por el apoyo durante muchos años en todos los momentos de dificultad.

A mis compañeros de semestre Sandra, Yherson, Luz Adriana, William y Mauricio quienes colaboraron de alguna forma en la realización del proyecto.

A los profesores del departamento de Biología en especial a los de la sección de genética, al Doctor Esteban Osorio por permitir utilizar los recursos del Laboratorio de Biología Molecular en Microorganismos, al Doctor Nelsón Toro por permitir utilizar los recursos del Laboratorio de Biología Molecular, al Doctor Heiber Cárdenas por permitir utilizar los recursos del salón de docencia de la sección.

A todos los integrantes del Laboratorio de Genética Molecular Humana por toda la colaboración brindada durante todo el tiempo de esta investigación: Leslie, Fanny, Brigitte, Gloria, Laura, Zuray, Andrea y Ronny.

A Andrés Felipe quien apareció en mi vida cuando menos lo esperaba y ha sido un apoyo incondicional.

Y a todas las personas que contribuyeron de una manera u otra a la realización de este proyecto.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
3. MARCO TEÓRICO.....	4
3.1 Las Poblaciones prehispánicas en Colombia.....	4
3.1.1 Sociedades cacicales precedentes a la conquista española.....	4
3.1.2 Población prehispánica portadora de la cultura Quimbaya Tardío.....	4
3.2 Estudios moleculares con restos arqueológicos.....	5
3.3 Herramientas para el análisis molecular en restos óseos.....	7
3.3.1 ADN mitocondrial (ADNmt).....	8
4. OBJETIVOS.....	10
4.1 Objetivo general.....	10
4.2 Objetivos específicos.....	10
5. HIPÓTESIS.....	10
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
6.1 Preparación de la muestra.....	11
6.2 Extracción de ADN.....	14
6.3 Cuantificación de ADN y diluciones de trabajo.....	17
6.4 Amplificación por PCR.....	17
6.5 Análisis de resultados.....	20
7. RESULTADOS.....	22
7.1 Cuantificación de ADN presente en las muestras.....	22
7.2 Amplificación de ADN.....	23
7.2.1 Eficiencia total de amplificación por PCR.....	23

7.2.2	Eficiencia de las ampliaciones por haplogrupos mitocondriales.....	24
7.2.3	Eficiencia de las ampliaciones por individuo.....	25
7.3	Frecuencias de los haplogrupos mitocondriales.....	26
8.	DISCUSIÓN.....	28
9.	CONCLUSIONES.....	35
10.	LITERATURA CITADA.....	36
ANEXO A.	41
ANEXO B.	52

LISTA DE TABLAS

		Página.
TABLA 1:	Tipos de hueso y edad Radiocarbónica de las muestras arqueológicas de Obando Pertenecientes a la cultura Quimbaya Tardío.....	12
TABLA 2:	Marcadores Moleculares con su respectivo iniciador usados para amplificar los haplogrupos mitocondriales en muestras de ADN y ADN reciente.....	18
TABLA 3:	Valores de tiempo y temperatura para la PCR de los sistemas RFLP que caracterizan haplogrupos mitocondriales de ADN Arqueológico...	19
TABLA 4:	Valores de tiempo y temperatura para la PCR de los sistemas RFLP que caracterizan haplogrupos mitocondriales de ADN reciente.....	19
TABLA 5:	Valores de cuantificación de ADN extraído de muestras arqueológicas.....	22
TABLA 6:	Eficiencia de amplificaciones por individuo.....	25
TABLA 7:	Asignación de haplogrupos de ADNmt definidos por la presencia o ausencia de sitios de restricción y por el número de repeticiones del segmento en la región V, en muestras de restos óseos arqueológico.....	27
TABLA 8:	Caracterización de haplogrupos de ADNmt de los integrantes del laboratorio que participaron en la recolección de la muestra o en el proceso de extracción y amplificación del ADN. La asignación a cada haplogrupo se hizo con base en la presencia o ausencia de sitios de restricción y por el número de repeticiones del segmento en la región V.....	27
TABLA 9:	Frecuencias de haplogrupos mitocondriales en estudios de ADN arqueológico.....	32
TABLA 10	Frecuencias de haplogrupos mitocondriales en Amerindios Colombianos.....	33

LISTA DE FIGURAS

	Página.
FIGURA 1: Mapa de la Ubicación Geográfica del Municipio de Obando del Departamento del Valle del Cauca de donde provienen las muestras de estudio.....	12
FIGURA 2: Registro Fotográfico de los diferentes restos óseos utilizados en el presente proyecto.....	14
FIGURA 3: Gel de poliacrilamida con los fragmentos generados por la presencia/ausencia del sitio de restricción en la digestión enzimática con <i>HincII</i> en el nucleótido 13262 del ADN mitocondrial.....	21
FIGURA 4: Relación entre la edad de los huesos y la concentración de ADN.....	23
FIGURA 5: Frecuencias relativas del número total de amplificaciones.....	24
FIGURA 6: Porcentaje de éxito en la amplificación de la pareja de iniciadores de cada haplogrupo.....	25
FIGURA 7: Frecuencias relativas del número total de amplificaciones por individuo.....	26
FIGURA 8: Árbol NJ construido a partir de las frecuencias haplotípicas de las muestras del proyecto comparado con muestras de otras poblaciones arqueológicas.....	33
FIGURA 9: Árbol NJ construido a partir de las frecuencias haplotípicas de las muestras del proyecto comparado con muestras de poblaciones recientes.....	34

1. RESUMEN

En América Latina la obtención de ADN arqueológico correspondiente a poblaciones prehispánicas, ha venido creciendo en importancia debido a los datos aportados para resolver preguntas sobre el origen de las poblaciones ancestrales, su relación biológica con las poblaciones actuales, la presencia de enfermedades y los patrones de migración. Con el fin de obtener ADN útil para estudios de antropología molecular, se estandarizó una metodología de extracción de ADN arqueológico a partir de restos óseos de 11 individuos excavados en tumbas prehispánicas contextualizadas biológica y culturalmente con filiación cultural Quimbaya Tardío (460 -1510 años antes del presente) del Cauca Medio. Se evaluó su eficiencia en la amplificación por PCR de las regiones del ADN mitocondrial que caracterizan los cuatro principales haplogrupos amerindios (A, B, C, D). Se extrajo ADN amplificable de 10 individuos con valores de concentración entre 1,135 y 1340 pg/ μ L y se tipificaron exitosamente 8 de los 11 individuos de la muestra, con frecuencias de 0,75 para el haplogrupo B y 0,25 para el haplogrupo A. La comparación de los datos obtenidos en el presente trabajo con los de otras poblaciones antiguas y recientes mediante árboles de distancia genética NJ mostró una mayor cercanía con poblaciones andinas que con poblaciones amazónicas. Este proyecto pionero en el Suroccidente colombiano, constituye en consecuencia, un primer esfuerzo interdisciplinario para la realización de estudios de arqueología molecular en el Norte de Suramérica.

2. INTRODUCCIÓN

A comienzos del siglo VI en el suroccidente colombiano se empiezan a diferenciar poblaciones portadoras de nuevas expresiones culturales, distintas de las comunidades que había antes en estos territorios. Dándose inicio a un nuevo período histórico, conocido con el nombre de Período Tardío ubicado entre 460 -1510 años antes del presente (ap.), los últimos mil años antes de la llegada de los españoles. Esta época se caracterizó por diferentes procesos demográficos como migraciones, reducción de los tamaños poblacionales, entre otros, los cuales tuvieron influencia en los patrones de vivienda, en la agricultura y demás manifestaciones culturales (Rodríguez 2002). En el Valle del Cauca, las expresiones materiales de estas poblaciones prehispánicas están relacionadas con las culturas Quimbaya III (o Quimbaya “Tardío”), Sonso y Bolo-Quebrada seca, las cuales prácticamente coexistieron en algunos territorios durante varios milenios siendo los Quimbaya el grupo más grande y más extenso de la región. Los estudios arqueológicos y antropológicos de estas poblaciones se han visto limitados por el saqueo de tumbas, la edificación de nuevas ciudades sobre las ruinas, el mal estado de conservación de las osamentas debido a la cremación de cadáveres, la observación solo de los restos óseos humanos conservados y que permiten un análisis cultural, ambiental y bioantropológico (sexo, edad, fisonomía, estatura) y la carencia de información de los procesos de manejo de los restos durante el transporte y limpieza en el laboratorio (Rodríguez 2005). No obstante, se espera que los estudios moleculares ayuden a mejorar estas limitaciones y brinden un avance en la comprensión del pasado prehispánico y un manejo más consistente del entorno socio-cultural de dichas poblaciones (Rodríguez et al. 2008). A nivel molecular las investigaciones realizadas con ADN arqueológico (ADNa) en Colombia han sido a partir de

muestras del centro de Colombia como en el caso de Monsalve et al. (1996) y Jara et al. (2007) quienes analizaron muestras pertenecientes a grupos precolombinos muiscas procedentes de los andes orientales y del sector de la candelaria (Bogotá, Colombia) respectivamente, y a Silva et al. (2008) quienes estudiaron muestras referentes al periodo Herrera de la Sabana de Bogotá. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos de estos estudios, hay carencia de información de las poblaciones prehispánicas debido a diversos factores (además de los ya mencionados) que limitan el establecimiento de metodologías de extracción de ADN confiables y de uso generalizado. Entre ellos, se pueden citar, los altos niveles de degradación del ADN, la presencia de inhibidores, la alta susceptibilidad a la contaminación y el diseño de la mayoría de métodos de extracción de ADN (Rohland & Hofreiter 2007a).

Por lo anterior y dada la escasez de información a nivel molecular sobre las poblaciones prehispánicas del Valle del Cauca, el presente proyecto de investigación propone, a partir del protocolo descrito por Rohland & Hofreiter (2007a), la estandarización de un protocolo de extracción de ADN de restos humanos de una población prehispánica adecuándolo a las condiciones de trabajo del laboratorio de Genética Molecular Humana de la Universidad del Valle. Esto con el objetivo de obtener ADN para amplificar regiones que brinden información en estudios de diversidad y estructura genética como los haplogrupos mitocondriales (agrupación de haplotipos que comparten ciertas sustituciones diagnósticas definidas por enzimas de restricción o por secuenciación directa, que presentan un origen común) (Fernández 2000). Este proyecto constituye, en consecuencia, un primer esfuerzo para la realización de estudios de arqueología molecular en el suroccidente Colombiano, siendo un proyecto pionero para la región.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Las Poblaciones Prehispánicas en Colombia

Según Rodríguez et al. (2008) existieron tres grandes períodos durante los cuales se estructuraron diversas formas de organización sociocultural, desde las sociedades de cazadores-recolectores de finales del Pleistoceno (9000-3500 a.C.) pasando por los recolectores-horticultores del Holoceno inicial y Medio (8000-3500 a.C.) y terminando con las sociedades cacicales encontradas por los conquistadores españoles en la primera mitad del siglo XV (460-1510 ap.)

3.1.1 Sociedades cacicales precedentes a la conquista española (460 – 1510 ap.):

Iniciando el siglo VI d.C. en el suroccidente de Colombia se empiezan a diferenciar poblaciones portadoras de nuevas expresiones culturales, distintas de las comunidades que había antes en estos territorios. Dándose inicio a un nuevo período histórico, conocido con el nombre de Período Tardío ubicado entre 460 y 1.510 ap., los últimos mil años antes de la llegada de los españoles (Rodríguez 2002). En Antioquia, el Viejo Caldas y el valle del Cauca, las expresiones materiales de estas poblaciones están relacionadas con las culturas Quimbaya III (o Quimbaya “Tardío”), Sonso y Bolo-Quebrada Seca, las cuales prácticamente coexistieron en algunos territorios durante varios milenios. Este es el último período caracterizado por una mayor diversidad cultural y durante el cual existió el tipo de organización social conocido como sociedad jerárquico-cacical (Rodríguez et al. 2008).

3.1.2 Población Prehispánica portadora de la cultura Quimbaya III o Quimbaya

Tardío: Era la más grande y poblada de todas las sociedades, se extendía por toda la subregión del Cauca Medio y regiones aledañas (departamentos de Antioquia, Risaralda, Caldas, Quindío y Valle del Cauca (Rodríguez et al. 2008). Su asentamiento estuvo en la región que ocupa el Municipio de Obando donde existía una interacción con comunidades indígenas de diversas procedencias las cuales se desplazaban a otros lugares del territorio en busca de tierras nuevas y fértiles (PÁGINA PRINCIPAL DEL MUNICIPIO DE OBANDO, □ <http://www.obando-valle.gov.co> □ consulta: 01 julio 2009).

3.2 Estudios Moleculares Con Restos Arqueológicos

Los estudios moleculares con restos arqueológicos han sido relativamente pocos en el mundo. Algunos de los primeros se realizaron con restos de animales extintos como abejas, mamuts, aves, osos entre otros (Cano, Poinar & Poinar Jr. 1992, Höss, Pääbo & Vereshchagin 1994, Haddrath & Baker 2001, Hofreither et al. 2002).

El primer reporte para restos humanos de contexto arqueológico fue realizado en momias egipcias y dió como resultado la obtención de un ADN degradado y químicamente modificado. Sin embargo, sentó las bases para futuras investigaciones de ADN humano aplicando técnicas de ADN recombinante (Pääbo 1985, 1988). El desarrollo y la aplicación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y la presencia de múltiples copias de ADN mitocondrial (ADNmt) por célula convirtieron a esta molécula en una herramienta importante para el estudio de muestras con poco ADN o degradadas por acción del medio ambiente (Pääbo 1988, Hagelberg & Clegg 1991). En los últimos años, las técnicas de

extracción y amplificación de ADNmt han permitido realizar estudios para revelar el potencial del ADNmt arqueológico en el entendimiento de los procesos evolutivos, aportando formas de probar modelos y siendo comúnmente usado para reconstruir patrones de evolución genética de poblaciones.

En Sur América, los estudios de ADN usando materiales de contexto arqueológico han sido pocos y dispersos, siendo básicamente reportes aislados de posibles rutas migratorias a nivel sub_ continental (Lalueza & Fox 1996). En la actualidad, en Colombia, se conocen pocos estudios, entre ellos el de Rodríguez & Florez (2001) el cual aborda de manera experimental los procesos de salud, enfermedad y polimorfismos en poblaciones prehispánicas usando los estudios moleculares como fuentes de información. El de Jara et al. (2007) donde se realiza un análisis de polimorfismos del ADN mitocondrial en un grupo precolombino muisca, encontrando el haplogrupo A predominante en estas muestras. El de Arango (2007), en el cual de una manera descriptiva compara los métodos moleculares y antropométricos para determinar el sexo en restos ancestrales de individuos infantiles y por último, el de Silva et al. (2008) en el cual se analiza el ADN mitocondrial de restos óseos del periodo Herrera en la sabana de Bogotá, donde clasifica a los individuos como haplogrupo B.

Los escasos estudios con ADN se atribuyen a las dificultades técnicas como: la cantidad de ADN, la degradación y el alto riesgo de contaminación presentes en la recolección y procesamiento de las muestras como en el proceso de extracción de ADN. Para ello, existen algunos criterios que ayudarían a minimizar los riesgos (Cooper & Poinar 2000). Entre las recomendaciones se encuentran un área de trabajo aislada físicamente (entre la extracción y

la amplificación), el uso de controles negativos para la amplificación, replicación de las muestras, cuantificación de ADN extraído, entre otros. A pesar de las dificultades mencionadas, hay diferentes métodos de extracción de ADN (extracción mediante sílice (Hoss & Pääbo 1993), fenol cloroformo (Capelli & Tschentscher 2005), kits de extracción comerciales (Barbaro et al. 2008), precipitación con alcohol (Cattaneo et al. 1995)), que incluyen los principios básicos de extracción como preparación de la muestra, liberación del ADN, purificación, ultrafiltración y unión con sílice, que permiten obtener buena cantidad de ADN para su posterior análisis genético. Por último, Rohland & Hofreiter (2007b) realizaron una comparación de diversos protocolos de extracción encontrando que el método con sílice tenía ciertas ventajas como rapidez, escalabilidad (fácil adaptación a diferentes cantidades de hueso y volúmenes de extracción), ejecución simple, eficiencia en la eliminación de inhibidores de la PCR y efectividad en el proceso de amplificación.

3.3 Herramientas para el análisis molecular en restos óseos

Los marcadores moleculares dada su variabilidad permiten realizar estudios de origen de las poblaciones, diversidad, entre otros. Entre ellos, se encuentran los marcadores moleculares uniparentales como el ADN mitocondrial, utilizado para trazar los orígenes y los patrones de migración de los humanos modernos (Bailliet et al. 1994).

3.3.1. ADN mitocondrial (ADNmt): es un material genético circular cerrado de doble cadena localizado en el interior de las mitocondrias celulares. Este genoma, de aproximadamente 16500 pares de bases (pb), codifica una pequeña fracción de las proteínas mitocondriales. Las proteínas restantes del ADNmt son codificadas por el ADN nuclear, ADNn (Fernández 2000). Posee tres características que lo convierten en una herramienta especialmente útil en la reconstrucción del pasado de las poblaciones humanas. La poliplasmia se designa así al elevado número de copias de ADNmt existentes en cada mitocondria y, por extensión, en la célula, la herencia matrilineal, la elevada tasa de cambio molecular (Jürgen et al. 2006) y la ausencia de recombinación. Estas características permiten la determinación filogenética entre linajes, sin ambigüedades causadas por el proceso meiótico o por genes nucleares (Bailliet et al. 1994).

En el ADN mitocondrial existen haplogrupos o “*clusters*” mitocondriales, agrupación de haplotipos que comparten ciertas sustituciones diagnósticas, definidos por enzimas de restricción o por secuenciación directa y que presentan un origen común. Esto implica que los polimorfismos que definen cada haplogrupo se produjeron exclusivamente en las líneas antecesoras de todos los haplotipos que lo integran. Estos polimorfismos son utilizados usualmente para el estudio de la diversidad del genoma humano y permiten la comparación entre individuos de diferentes poblaciones e incluso entre individuos de distintas épocas (Fernández 2000). En la tabla 2 se presenta un resumen de los marcadores, iniciadores y referencia utilizados en el presente proyecto.

Los Polimorfismos del ADN mitocondrial pueden ser detectados mediante PCR-RFLP e identificar cuatro regiones que definen los haplogrupos amerindios A, B, C, D. El haplogrupo A se caracteriza por la ganancia del sitio de restricción para la enzima *HaeIII*

en el nucleótido 663. El haplogrupo B, por la pérdida de un segmento de 9 pb que hace parte de la repetición (CCCCCTCTA)₂, ubicada entre los genes que codifican para COII-tRNA^{Lys}. También se encuentra asociado a dicho haplogrupo la ganancia del sitio de restricción 16517 para *Hae*III. El haplogrupo C, por la pérdida de un sitio de restricción *Hinc*II en el nucleótido 13259. El haplogrupo D, por la pérdida del sitio de restricción para *Alu*I en el nucleótido 5176 (Torrioni et al 1993).

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Validar una metodología de extracción de ADN arqueológico, en términos de su calidad, mediante la amplificación por PCR de las regiones correspondientes a los haplogrupos A, B, C, D del ADN mitocondrial de muestras de ADN arqueológico de una población prehispánica.

4.2 Objetivos específicos

- Estandarizar una metodología para extraer ADN de restos óseos prehispánicos.
- Evaluar la eficiencia de los procesos de extracción y amplificación de ADN de restos óseos prehispánicos.
- Estimar las frecuencias de los diferentes haplogrupos mitocondriales encontrados en la población prehispánica portadora de la cultura Quimbaya Tardío.

5. HIPÓTESIS

H1: La cantidad y la calidad de ADN encontrado en restos arqueológicos disminuyen con el paso del tiempo.

H2: No existen diferencias significativas entre la cantidad de ADN arqueológico aislado de diferentes restos óseos.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Preparación de la Muestra

Tipo y tamaño de la muestra: La muestra estuvo compuesta de fragmentos de restos óseos de 11 individuos de una población prehispánica del municipio de Obando - Departamento del Valle del Cauca (Figura 1) pertenecientes a la cultura Quimbaya Tardío (500-1550d.C.), provenientes de excavaciones realizadas por personal del Museo Arqueológico Julio César Cubillos de la Universidad Del Valle, el cual tiene a su cargo la preservación de este material (PÁGINA PRINCIPAL MUSEO [□ https://museoarqueologico.univalle.edu.co □](https://museoarqueologico.univalle.edu.co) consulta: 30 julio 2008).

Criterios de selección de la muestra: Todo el material óseo utilizado fue seleccionado de acuerdo con la contextualización arqueológica (clasificados por individuo según los restos óseos), cultural (conocimiento del comportamiento socio-cultural de dicha población a partir de los utensilios encontrados en las tumbas) y cronológica (datación por radiocarbono). Además de la ausencia de evidencias macroscópicas de paleopatologías y de la presencia de la cuarteta básica de identificación (edad, patrón ancestral, sexo, estatura), se escogieron muestras encontradas en diferentes tumbas y distintos tipos de hueso para ver la relación con la cantidad de ADN obtenido. Todos estos datos son útiles para la identificación y comparación en estudios moleculares de diversidad de poblaciones. En la tabla 1 se detallan las firmas y descripciones de cada una de las muestras utilizadas en el presente proyecto.



Figura 1. Mapa de la Ubicación Geográfica del Municipio de Obando del Departamento del Valle del Cauca de donde provienen las muestras de estudio (PÁGINA DEL MUNICIPIO □ <http://www.obando-valle.gov.co> □ consulta: 5 enero 2009)

Tabla 1. Tipo de hueso y edad radiocarbónica de las muestras arqueológicas de Obando pertenecientes a la cultura Quimbaya Tardío utilizados en el presente estudio.

Muestra	Tipo de hueso	Edad radiocarbónica ap. (años)
OB 002	NR	NR
OB 003	NR	NR
OB 004	NR	NR
OB 005	Coxal	789
OB 006	Radio	789
OB 007	Fémur	1229
OB 008	Fémur	939
OB 009	Húmero	1229
OB 010	Tibia	1229
OB 011	Calcáneo	939
OB 012	Coxal	939

NR = no registrado
ap.= antes del presente

Procedimiento: En el museo arqueológico Julio César Cubillos de la Universidad del Valle, se destinó un espacio para separar cada una de las muestras. Estas se clasificaron, se almacenaron en bolsas transparentes selladas y se separaron aquellas muestras que cumplieron con los criterios anteriormente mencionados. Se procedió de la siguiente manera: en una mesa de trabajo, previamente esterilizada con hipoclorito al 0.5% y etanol al 70%, y sobre una toalla de papel desechable se colocaron los restos óseos seleccionados, se realizó un corte con una cuchilla estéril de un fragmento de aproximadamente 500 mg, (teniendo en cuenta no cortar las partes del hueso informativas en identificación antropológica). Esta muestra se almacenó en una bolsa plástica hermética, rotulada y previamente esterilizada con UV. Este procedimiento se realizó para cada una de las muestras, las cuales fueron manipuladas por separado y bajo estrictas normas de seguridad para evitar contaminación (Yang & Watt 2004). Durante la preparación de cada una de las muestras, se usó bata de laboratorio, gorro, tapabocas, guantes y cuchillas estériles (Figura 2).

Las muestras se llevaron al espacio destinado para su procesamiento de ADN antiguo en el Laboratorio de Genética Molecular Humana de la Universidad del Valle. A cada una de las muestras por separado y nuevamente con guantes estériles, con un bisturí estéril se le retiró la capa externa de la superficie del hueso y se lavó con agua ultra pura. Se dejó secar bajo luz UV durante 5 minutos. Una vez secos los huesos, se les cortó un fragmento de la parte interna de aproximadamente 500 mg, éste se maceró en un mortero, procurando no



Figura 2. Registro Fotográfico de los diferentes restos óseos utilizados en el presente proyecto.

calentar las pieza, hasta obtener un polvo de grano fino el cual se almacenó en tubos cónicos de 50mL debidamente rotulados. Se pesaron 500 mg de cada muestra en una balanza electrónica sobre papel aluminio, irradiado previamente en luz UV y se transfirieron a tubos de centrífuga de 15mL. El protocolo completo para la preparación de las muestras, la extracción de ADN y la amplificación por PCR de ADN antiguo, se encuentra en el anexo A.

6.2 Extracción del ADN

Después de separadas las muestras y con base en el protocolo descrito por Rohland & Hofreiter (2007a) se realizó el proceso de extracción con 500 mg de hueso arqueológico y

bajo las condiciones de trabajo del laboratorio de Genética Molecular Humana. Este método de extracción ha sido ampliamente utilizado en ADN dado que rinde cantidades de ADN que permiten realizar más de treinta reacciones de PCR. Además, tiene la ventaja de ser rápido, eficaz y de no utilizar reactivos tóxicos como el fenol.

Con el fin de evitar la contaminación durante este proceso con ADN actual, todos los procedimientos se realizaron bajo las siguientes recomendaciones: uso exclusivo de reactivos, un espacio en donde nunca antes se haya trabajado con ADN, tapabocas y gorros desechables, material estéril para cada procedimiento, puntas con filtro, batas propias para los procesos de extracción y amplificación por PCR, guantes para cada una de las muestras, separación temporal para cada uno de los procesos anteriormente mencionados. Las condiciones de manejo se describen en el anexo A y el proceso de extracción se detalla a continuación:

Liberación del ADN de la matriz ósea: Para obtener la liberación del ADN de los restos óseos se adicionó a las diferentes muestras 10mL de solución de extracción (0.45 M de EDTA, 0.25 mg/ml de proteínasa K (Bioline) pH 8 para un volumen final de 10mL). Se sellaron los tubos con papel envolvente y se incubaron con agitación suave (rotación lenta) 24 horas en la oscuridad. Durante este procedimiento se incluyó un blanco de extracción de 10mL de solución de extracción sin hueso molido por cada 5 muestras problema el cual recibió el mismo tratamiento que las demás muestras.

Purificación del ADN mediante unión a la sílice: Se centrifugaron las muestras que estaban en el tampón de extracción con agitación continua por 2 minutos a 6000 rpm. Se

transfirió el sobrenadante a un tubo cónico de 50mL y se adicionó 40mL de tampón de unión a la sílice o tampón ligando (5M de GuSCN, 25 mM NaCl, 50 mM de Tris) y 100 μ L de suspensión de sílice (4.8g de dióxido de sílice en agua ultra pura para un volumen final de 40 mL, se dejó reposar durante 1 hora, luego se retiró 39 mL del sobrenadante a un tubo nuevo de 50 mL y se dejó reposar 4 horas, después del tiempo se descartó 35 mL de sobrenadante y se adicionó 48 μ L de HCL al 30% w/v) ajustando el pH a 4.0. Se cerraron y se sellaron los tubos con papel envolvente. Se incubaron con agitación por 3 horas en la oscuridad. Nuevamente se centrifugaron las muestras por 2 minutos a 6000 rpm. Se separó el sobrenadante y se colocó en un tubo nuevo de 15 mL. Se adicionó 1 mL del tampón ligando al botón de sílice y mediante pipeteo se mezcló la sílice.

Para hacer más manejables las muestras, la suspensión de tampón-sílice se transfirió a 2 tubos nuevos de 2 ml y se centrifugaron por 15 segundos a 16000 g. Se descartó el sobrenadante y se removió el botón restante con una pipeta. A este botón de sílice se le adicionó 1mL de tampón de lavado (50% v/v etanol; 125 mM NaCl, 10 mM de TRIS, 1 mM de EDTA pH 8.0) y se re-suspende mediante pipeteo. De nuevo se centrifugó por 15s a 16000 g, se descartó el sobrenadante y se removió el botón remanente con una pipeta. Se Repitió el lavado una vez más.

Se dejó secar la sílice a una temperatura de 23°C por 15 minutos con los tubos abiertos luego se adicionó 50 μ L de tampón TE (10 mM de TRIS, 1 mM de EDTA pH8.0) y se mezcló mediante agitación y pipeteo. Se cerraron los tubos y se incubaron por 10 minutos; agitando suavemente. Se centrifugó por 2 minutos a 16000 g y se transfirió el sobrenadante

a un tubo nuevo de 2 mL. Este sobrenadante (extracto) se usó para determinar la concentración del ADN y proceder a la obtención de los marcadores.

6.3 Cuantificación del ADN y diluciones de trabajo.

El ADN total extraído se cuantificó mediante fluorescencia con el sistema Quant-iT™ dS DNA HS Assay Kit 0.2-100ng para ADN de doble cadena (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA). Ver anexo A.

A partir de los ADN extraídos y con los valores de cuantificación mencionados previamente, se realizaron diferentes diluciones de trabajo (1:10, 1:20, 1:100, 1:200) para evitar contaminación de las muestras e inhibidores durante la PCR y obtener la mejor dilución de trabajo.

6.4. Amplificación por la PCR

Luego de obtener el ADN de cada individuo y de hacer las diluciones, se procedió a caracterizar los cuatro haplogrupos amerindios (A, B, C y D) mediante PCR-RFLP. Las parejas de iniciadores, el tamaño del producto de amplificación y la temperatura de hibridización de cada pareja y la enzima, se muestran en la Tabla 2.

La preparación de la reacción de PCR siempre se realizó en cámara de flujo laminar esterilizada previamente con DNAzap (Ambion®), agua destilada (Gibvo-BRL®) y etanol para evitar cualquier tipo de contaminación con ADN moderno. Se utilizaron guantes desechables nuevos, tapabocas, gorro, puntas nuevas con filtro y estériles además de los

controles de PCR. Cuando se presentó contaminación, fue necesario el uso de dos controles negativos, uno de ellos expuesto al ambiente (tubos con el coctel de PCR y la tapa abierta) con el fin de determinar si la contaminación era debida a los aerosoles presentes en el ambiente o si se presentaba en los reactivos (tubos con el coctel de PCR y la tapa cerrada).

Tabla 2. Marcadores moleculares con su respectivo iniciador usados para amplificar los haplogrupos mitocondriales A, B, C, D, en muestras de ADN_a y de ADN reciente.

Haplogrupo (Enzima, Posición nucleotídica)	Iniciadores 5'-3'	T _m	Tamaño	Referencia
A (<i>Hae</i> III, + Np 663)	L 635 GAAAATGTTTAGACGGCCTCACATC	66,3 –	121pb	Handt et al (1996) Stone & Stoneking, (1998)
	H708 TAGAGGGTGAACACTCACTGGAAC	58,3		
B (9pb-)	L8209 CATCGTCCTAGAATTAATTCC	53,2 –	95pb	Bailliet et al. (1994)
	H8304 CTTACAGTGGGCTCTAGAGG	55,9	86pb	
C (<i>Hinc</i> II-, Np 13259)	L13527 AATCGTAGCCTTCTCCACTTCA	60.3	180pb	Handt et al. (1996)
	H13393 TCCTATTTTTTCGAATATCTTGTTTC	55.9		
D (<i>Alu</i> I, Np 5176)	TAGGATGAATAATAGCAGCTCTACCG	61.2	181pb	Stone & Stoneking (1998)
	GGGTGGATGGAATTAAGGGTGT	63.2		

Concentración de reactivos en la amplificación por PCR de ADN mitocondrial y

digestión de fragmentos amplificados: Cada muestra se amplificó con cada sistema de iniciadores en un volumen final de reacción de 20 µL, con 2 µL de ADN molde (1:10) en tampón 1X de PCR (Applied Biosystem), 1 µg de BSA (Fermentas), 2.5 mM MgCl₂ (Applied Biosystems), 140 µM de cada dNTP's (Applied Biosystems), 0.5 pmol de cada iniciador (Invitrogen) y 1U de *Taq* GOLD LD (AmpliTaq Gold, Applied Biosystems). Las digestiones se realizaron en un volumen final de 20 µL con 10 µL de ADN amplificado, 1X de tampón de la enzima, 5 U de la enzima (Invitrogen) y 7.5 µL de agua ultra pura. Se incubaron por 16 horas a 37 °C. Todas las reacciones se llevaron a cabo en un

termociclador TC-9600-G (Labnet internacional). Las condiciones de temperatura de la PCR están consignadas en la Tabla 3.

Tabla 3. Valores de tiempo y temperatura para la PCR de los sistemas RFLP que caracterizan haplogrupos mitocondriales A, B, C y D de ADN.

ciclos	Haplogrupos A y B		Haplogrupo C		Haplogrupo D	
	Temp. (°C)	Tiempo	Temp. (°C)	Tiempo	Temp. (°C)	Tiempo
1	94	5 min	94	5 min	94	5 min
40	94	1 min	94	1 min	94	30 seg
	54	1 min	59	1 min	48	30 seg
	72	1 min	72	1 min	72	30 seg
1	72	10 min	72	10 min	72	10 min

Cada individuo fue tipificado dos veces y a dos de ellos se les repitió la extracción y la tipificación mediante RFLP para verificar la consistencia de los resultados.

Adicionalmente, se caracterizaron los haplogrupos de cada uno de las personas que han manipulado los restos óseos y de las personas que trabajaron en el laboratorio durante el presente proyecto (Anexo B). Para la amplificación se utilizaron los mismos iniciadores pero cambian los valores de tiempo y la temperatura de hibridización (Tabla 4).

Tabla 4. Valores de tiempo y temperatura para la PCR de los sistemas RFLP que caracterizan haplogrupos mitocondriales A y B de ADN reciente.

ciclos	Haplogrupos A y B		Haplogrupo C		Haplogrupo D	
	Temp. (°C)	Tiempo	Temp. (°C)	Tiempo	Temp. (°C)	Tiempo
1	94	5 min	94	5 min	94	5 min
30	94	1 min	94	1 min	94	1 min
	62	1 min	59	1 min	53	1 min
	72	1 min	72	1 min	72	1 min
1	72	5 min	72	5 min	72	5 min

La detección de los productos amplificados se realizó mediante separación electroforética en geles de poliacrilamida al 8% y teñidos con nitrato de plata. Las asignaciones haplotípicas se hicieron utilizando un marcador de peso molecular de 50 pares de bases (50 bp ladder invitrogen®). Con el sistema de documentación de geles UVI Star se tomó una fotografía de cada uno de ellos se analizaron en el programa UVI Save Uvitec© versión 12.4. Éste detectó las bandas y con base en el marcador de peso hace una regresión logarítmica y calcula el peso o tamaño (en pb) del ADN que se halla en cada banda. Para los haplogrupos mitocondriales se verificó que amplificara la región de interés y que el producto estuviera en el rango normal, luego se digirió enzimáticamente y nuevamente se realizó otra electroforesis en la cual se verificaba la presencia del sitio de restricción por la aparición de dos fragmentos cuyos tamaños sumados correspondían al tamaño del fragmento previo a la digestión. En cada electroforesis (gel) se incluía una muestra sin digerir que sirviera como control negativo (sin corte) y una muestra digerida como control positivo con corte (Figura 3).

6.5 Análisis de los resultados

Para la cuantificación, los datos se obtuvieron y se analizaron de acuerdo a la cantidad de ADN presente en cada una de las muestras, se estableció la relación entre la edad de los huesos y la cantidad de ADN total mediante un ajuste polinomial de segundo grado (Statistics versión 8.0). Para la amplificación, se midió: 1. La eficiencia en términos de reacciones de PCR, donde se consideraron exitosas aquellas en las que amplificaba al menos un individuo. 2. La eficiencia de amplificación por haplogrupo mitocondrial, donde se consideraron exitosas en las que amplificaba al menos un individuo dentro de cada

haplogrupo. 3. La eficiencia de amplificaciones por individuo, donde se consideraron exitosas aquellas reacciones en las cuales se verificó la presencia de amplificado.

Con las frecuencias haplotípicas obtenidas en el presente estudio y otras reportadas en la literatura para poblaciones prehispánicas del continente y poblaciones actuales colombianas, se construyeron árboles Neighbor Joining (NJ) utilizando la distancia genética de Nei et al. (1983).

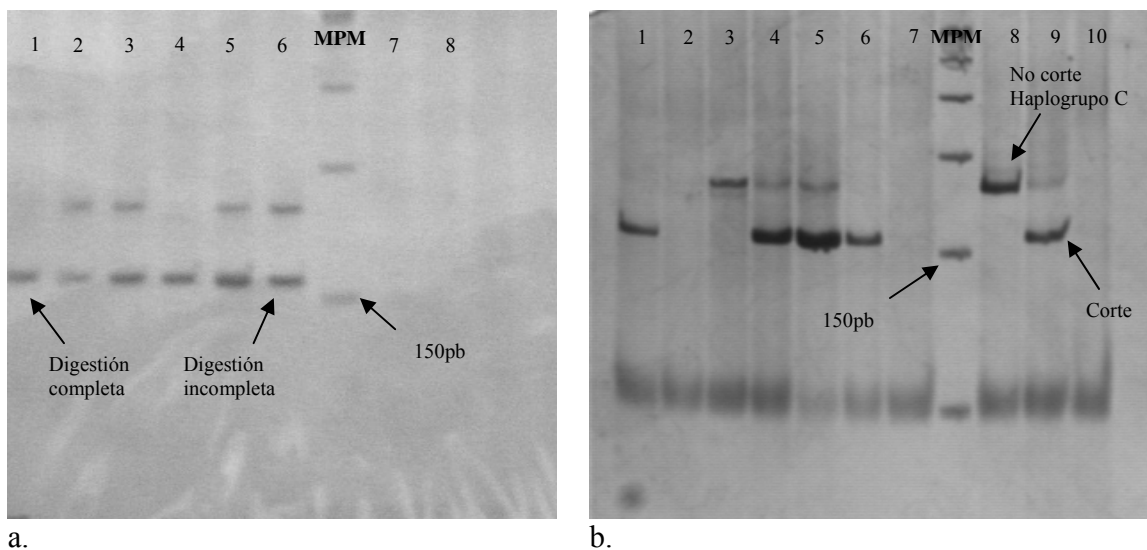


Figura 3. Gel de poliacrilamida al 8%, 19:1 (acrilamida:bisacrilamida) teñido con nitrato de plata (AgNO_3) mostrando los fragmentos generados por la presencia /ausencia del sitio de restricción en la digestión enzimática con *HincII* en el nucleótido 13262 del ADN mitocondrial. La ausencia del sitio de restricción genera un fragmento de 181pb, es decir, la enzima no corta el amplicón, esta es una característica que define el haplogrupo C. La presencia del sitio de restricción genera un fragmento de 155pb y otro de 26pb (se pierde debido a la corrida) lo que caracteriza el que no sean haplogrupo C. **a.** Muestras de ADN antiguo, en donde se evidencia que todas las muestras presentan el sitio de restricción lo que indica que cortaron con la enzima y no son haplogrupo C. **b.** Muestras de ADN reciente, en los carriles 1, 4, 5, 9 se evidencia muestras con presencia sitio de restricción (no Haplogrupo C) y en los carriles 3 y 8 muestras con ausencia del sitio de restricción (Haplogrupo C). MPM corresponde al Marcador de Peso Molecular de 25pares de bases.

7. RESULTADOS

7.1 Cuantificación del ADN presente en las muestras

En la Tabla 5 se indica la cantidad de ADN extraído de cada muestra, las mayores concentraciones se obtuvieron con Radio y Coxa con 1340 y 1170 pg/ μ L respectivamente y las menores concentraciones con húmero y tibia con 1.325 y 1.135 pg/ μ L.

Tabla 5. Valores de cuantificación del ADN extraído a partir de muestras arqueológicas.

Muestra	Tipo de hueso	Edad radiocarbónica ap. (años)	[ADN total] pg/ μ L
OB002	NR	NR	10
OB003	NR	NR	14,3
OB004	NR	NR	32,9
OB005	Coxa	789	1170
OB006	Radio	789	1340
OB007	Fémur	1229	74
OB008	Fémur	939	50
OB009	Húmero	1229	1,325
OB010	Tibia	1229	1,135
OB011	Calcáneo	939	11,25
OB012	Coxa	939	11,45

NR = no registrado.

ap. = antes del presente.

Se encontró un coeficiente de relación (R) entre la edad radiocarbónica de las muestras y la concentración de ADN total de -0.7095 con un valor de probabilidad de $p = 0.0487$ (Figura 4). Los datos indican que a medida que incrementa la edad de los huesos reduce la cantidad de ADN presente en ellos, existiendo una relación entre la dos variables pero con un valor de probabilidad marginalmente significativo.

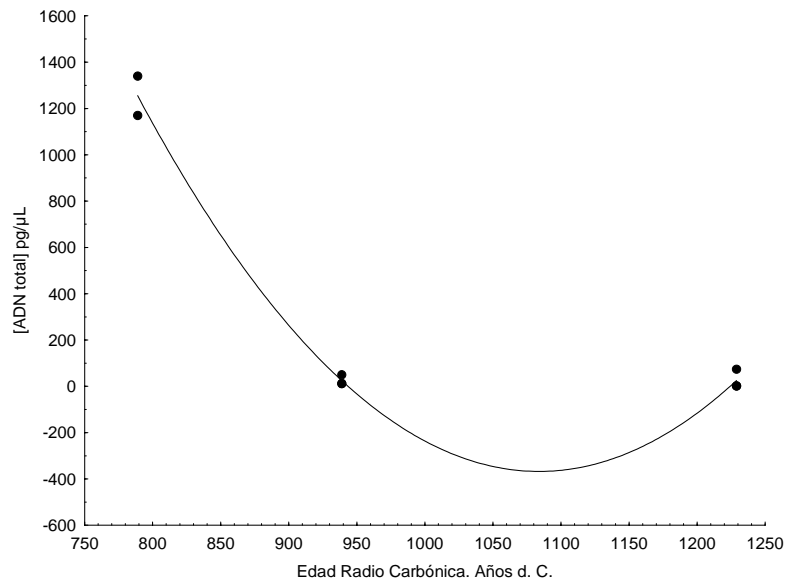


Figura 4. Relación entre la edad de los huesos y la concentración de ADN total en pg/μL, con un ajuste polinomial de segundo grado y un nivel de significancia de 0.05.

7.2 Amplificación del ADN

7.2.1 Eficiencia total de amplificación por PCR: 11 de 19 reacciones de PCR realizadas fueron exitosas para una eficiencia del 57.89%, de las 8 restantes presentaron contaminación (Figura 5), es decir, bandas diferentes a las esperadas, (21.05%).

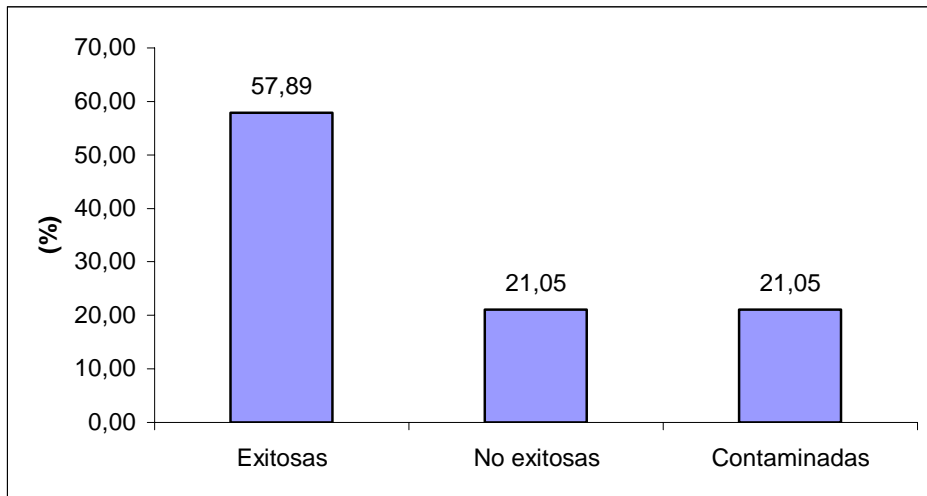


Figura 5. Frecuencias relativas del total de amplificaciones.

7.2.2 Eficiencia de amplificaciones por haplogrupos mitocondriales: de las 10

amplificaciones realizadas para el haplogrupo B, el 40% estuvieron contaminadas, el 20% no amplificaron y el 40% restante fueron exitosas. Para los demás haplogrupos A, C y D se obtuvo una eficiencia de 75%, 100% y 67%, respectivamente.

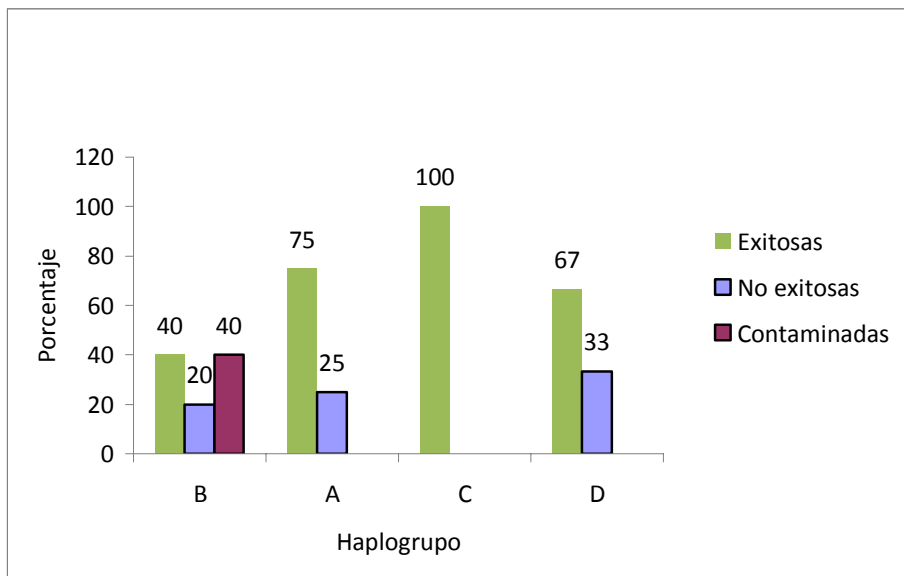


Figura 6. Porcentaje de éxito en la amplificación de la pareja de iniciadores de cada haplogrupo.

7.2.3 Eficiencia de amplificaciones por individuo: En la tabla 6 se muestra la eficiencia de amplificaciones que tuvo cada individuo en términos de porcentaje. Se obtuvo que los huesos radio y coxa fueron los que mejor se comportaron en términos de amplificación a diferencia de un fémur y una tibia (Figura 7).

Tabla 6. Eficiencia de amplificaciones por individuo.

Muestra	Tipo de hueso	%
OB002	NR	55,56
OB003	NR	83,33
OB004	NR	100,00
OB005	Coxal	53,85
OB006	Radio	62,50
OB007	Fémur	0,00
OB008	Fémur	55,56
OB009	Húmero	42,86
OB010	Tibia	28,57
OB011	Calcáneo	57,14
OB012	Coxal	71,43

NR= No registrado

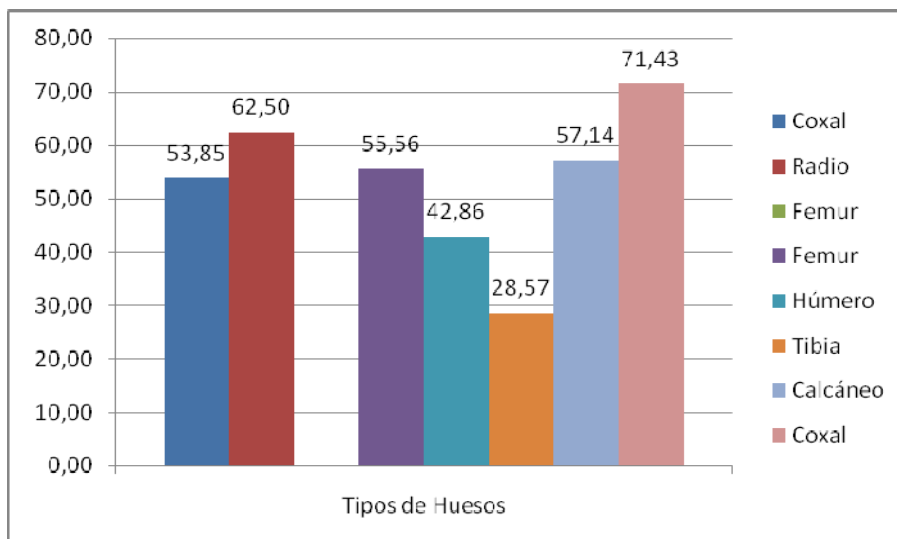


Figura 7. Frecuencias relativas del total de amplificaciones por individuo,

7.3 Frecuencias de los haplogrupos mitocondriales

De los 11 individuos analizados, 8 fueron caracterizados por PCR-RFLP para los cuatro haplogrupos amerindios suramericanos (A, B, C, D), (Tabla 7). Sólo se encontraron individuos pertenecientes a los haplogrupos A y B, con una frecuencia relativa de 0.25 y 0.75, respectivamente. Dos individuos no amplificaron para la mutación 5176, por lo cual no fue posible determinar su haplogrupo y un individuo no amplificó para ningún sistema de iniciadores. Como control negativo se caracterizaron los haplogrupos de ADNmt de los integrantes del laboratorio participantes, en la recolección de la muestra o en el proceso de extracción y amplificación del ADN (Tabla 8).

Tabla 7. Asignación de haplogrupos de ADNmt definidos por la presencia o ausencia de sitios de restricción y por el número de copias del segmento de 9 pb en la región V, en muestras arqueológicas de restos óseos.

Muestras	Sitios de restricción para cada haplogrupos mitocondrial				Haplogrupo
	<i>HaeIII</i> , 663	Repetición en la región V	<i>HincII</i> , 13262	<i>AluI</i> , 5176	
OB002	-	1	+	+	B
OB003	+	2	+	+	A
OB004	+	2	+	+	A
OB005	-	1	+	+	B
OB006	-	1	+	+	B
OB007	NA	NA	NA	NA	NA
OB008	-	1	+	+	B
OB009	-	1	+	+	B
OB010	-	2	+	NA	Otro
OB011	-	1	+	+	B
OB012	-	2	+	NA	Otro

NA= No Amplificó.

+ = Presencia sitio de restricción.

- = Ausencia sitio de restricción.

Otro = Se refiere a que fue descartado como haplogrupo A, B y C.

1 = Una copia del segmento de 9 pb en la región V.

2 = Dos copias del segmento de 9 pb en la región V.

Tabla 8. Caracterización de haplogrupos de ADNmt de los integrantes del laboratorio participantes en la recolección de la muestra o en el proceso de extracción y amplificación del ADN. La asignación a cada haplogrupo se hizo con base en la presencia o ausencia de sitios de restricción y por el número de copias del segmento de 9 pb en la región V.

Muestras	Sitios de restricción para cada haplogrupos mitocondrial				Haplogrupo
	<i>HaeIII</i> , 663	Copias en la región V	<i>HincII</i> , 13262	<i>AluI</i> , 5176	
CAR	+	2	+	+	Otro
ER	+	2	-	+	C
DR	+	2	-	+	C
LA	+	2	+	+	A
LJM	-	1	+	+	B
YB	-	1	+	+	B
MQ	+	2	+	+	Otro

+ = Presencia sitio de restricción.

- = Ausencia sitio de restricción.

Otro = Se refiere a que fue descartado como haplogrupo A, B y C.

1 = Una copia del segmento de 9 pb en la región V.

2 = Dos copias del segmento de 9 pb en la región V.

8. DISCUSION

La posibilidad de utilizar restos óseos humanos como fuente de ADN arqueológico ha venido creciendo en importancia debido que estos datos que pueden aportar información para resolver preguntas sobre el origen de las poblaciones ancestrales, su relación biológica con las poblaciones actuales, presencia de enfermedades, patrones de migración y en algunos casos, identificación de genes importantes implicados en la diferenciación entre humanos y otros homínidos (Pääbo 1985, Stone & Stoneking 1993, Handt et al. 1996, Ribeiro-Dos-Santos et al. 1996, Stone & Stoneking 1998, Moraga et al. 2001, Shinoda et al. 2006, Jara et al. 2007, Silva et al. 2008, Krausse et al. 2007).

En Colombia, los estudios reportados con restos arqueológicos datan de los últimos tres años involucrando poblaciones andinas del altiplano cundiboyacense (Fernández 1999, Arango 2007, Jara et al. 2007, Silva et al. 2008). Para el Valle del Cauca no se tienen registros a pesar de ser una zona culturalmente importante para el país debido a que fue un área de asentamiento de poblaciones (Quimbaya Tardío, Sonso y Bolo-Quebrada seca), las cuales comerciaban y servían de puente entre las poblaciones del altiplano y las poblaciones del sur de Colombia.

En la mayoría de los casos, la falta de estudios sobre ADN_a se debe a la carencia de una infraestructura adecuada, los altos costos en materiales y reactivos necesarios para realizar este tipo de investigaciones y el bajo rendimiento en la calidad y cantidad del ADN que se obtiene.

Los datos del presente proyecto muestran que es posible obtener ADN suficiente para amplificar regiones del ADNmt, siguiendo un protocolo de extracción de ADN y manejo adecuados (Anexo A) que minimice los eventos de contaminación desde el momento de la toma de la muestra en campo hasta el estudio molecular en el laboratorio, generando así, un mejor aprovechamiento de los recursos.

Cuantificación: Cuando se agruparon las muestras del grupo con menor edad (789 años) rindieron las mejores cantidades de ADN (1340 y 1170 pg/ μ L), mientras que las de mayor edad presentaron los menores valores con excepción del fémur que en ambos casos (939 años y 1229 años) presentó valores superiores (74 y 50 pg/ μ L) en relación a los demás huesos del grupo entre ellos la coxa, el calcáneo, el húmero y la tibia (1.135 – 11.45 pg/ μ L). Estos resultados nos muestran de forma cualitativa que probablemente la edad de los restos óseos si está influenciando la cantidad de ADN que se obtiene existiendo una relación entre las dos variables, sin embargo, el valor de probabilidad está muy cercano a la región de rechazo siendo marginalmente significativo probablemente debido al número de datos. Hay evidencias de diferencias entre muestras de la misma edad y aun del mismo sitio de excavación (Hagelberg 1994), que demuestran que factores ambientales como la humedad, el pH y la salinidad, son aún más decisivos que la edad en la supervivencia del ADN.

No se encontraron diferencias significativas entre el tipo de hueso y la cantidad de ADN, ya que por ejemplo en el caso de las dos coxas, se hallaron valores de concentración muy diferentes entre ellas, los cuales dependieron para este caso más de la edad que del tipo de

hueso, lo que lleva a pensar que el estado de conservación de la muestra, es la que marca la diferencia a la hora de obtener ADN de restos arqueológicos.

Amplificación del ADN: Al inicio de los experimentos, se presentaron problemas de contaminación a pesar de todas las medidas de limpieza y esterilización que se tomaron, debido probablemente a la potencia de la PCR, el tipo de reactivos, la ubicuidad del ADN reciente y a lo novedoso de la técnica. Uno de los puntos críticos fue la contaminación cruzada entre muestras durante su manipulación al momento de preparar la PCR., lo cual se controló, mediante la limpieza constante de los guantes con etanol de muestra a muestra.

Además, se realizaron los controles para el proceso de extracción y amplificación los cuales presentaron resultados negativos en la amplificación, esto se debe a que se siguieron de manera decidida todas las precauciones mencionadas en el Anexo A. Además, durante el proceso de extracción y amplificación participaron únicamente dos investigadores, uno con haplogrupo B y el otro sin haplogrupo definido (A, B, C, D). Esto hace improbable la contaminación por haplogrupo A durante el proceso de extracción y amplificación. Sin embargo, con relación a la posibilidad de contaminación de las muestras por parte de los investigadores en el proceso de recolección, es imposible eliminar o descartar que ello suceda por lo que se recomienda secuenciar y así descartar cualquier posibilidad de contaminación.

Luego de ajustar el protocolo general en los puntos críticos de contaminación, se logró una eficiencia de amplificación (reacciones sin contaminación) del 57,89% dejando así un 42.1% de reacciones que no amplificaron y que tuvieron contaminación. Lo que indicó que

a pesar de todos los ensayos las muestras son muy susceptibles a la contaminación. Sin embargo, este alto porcentaje se presentó con el sistema de iniciadores del haplogrupo B, ya que este fue el primer sistema con el que se ajustaron todos los procedimientos para el control de contaminación. Estos iniciadores se escogieron por tener el amplicón más corto (89-95 pb) y porque no utilizaba enzima de restricción, lo que hizo que fuera rápido su amplificación y así la verificación de los resultados.

Todos los individuos fueron exitosos por lo menos en una amplificación, con excepción del individuo OB007, el cual a pesar de haber rendido una cantidad suficiente de ADN (50 pg/ μ l) no se pudo tipificar para ningún sistema. La causa probable es una resina que presentaba el hueso producto de una restauración por parte de los arqueólogos, la cual tendría efectos inhibitorios sobre la PCR.

El porcentaje de éxito de individuos tipificados obtenidos en el presente proyecto, 72.7% estuvo cercano al 78.1% reportado por Rohland & Hofreiter (2007b). Lo cual indica que el proceso de extracción y la optimización de PCR tuvieron un manejo adecuado y que al compararse con otros protocolos reportados podría decirse que existen diferencias puesto que éste procedimiento se hace en poco tiempo, rinde buenas cantidades de ADN y permite la amplificación de marcadores moleculares.

La presencia de los haplogrupos A y B y la ausencia de C y D probablemente se debe a la alta representatividad que han tenido A y B en muestras antiguas y recientes en la población amerindia (Tabla 9) y posiblemente al pequeño tamaño de la muestra que no permitió detectar C y D.

Al comparar las frecuencias de los haplogrupos obtenidos en el presente proyecto con las frecuencias de otras poblaciones arqueológicas (Tabla 9) se evidenció una cercanía del 100% con poblaciones andinas antiguas de Chile y Perú, y una lejanía de la población amazónica de Brasil (Figura 8), lo cual se ajusta al modelo actualmente aceptado (Schurr & Sherry 2004, Keyeux et al 2002, Tarazona-Santos et al 2001, desde el cromosoma Y) de poblamiento de Suramérica en el cual plantea que existen dos grupos de poblaciones diferenciados entre sí, las poblaciones Amazónicas y las poblaciones Andinas. Las primeras con baja diversidad y alta estructura genética y las segundas en sentido inverso, ubicando así, la muestra de Obando dentro del grupo de las poblaciones Andinas.

El árbol de distancia genética con poblaciones amerindias actuales mostró tres grandes agrupamientos (Figura 9). Obando se ubicó cerca de las poblaciones Awa de Nariño y Emberá del Cauca, las cuales son poblaciones Andinas que geográficamente se encuentran cerca del Valle del Río Cauca, de modo que están en la zona de influencia de la cultura Quimbaya. Este resultado podría estar indicando cierta continuidad en la composición genética de las poblaciones antiguas y las actuales.

Tabla 9. Frecuencias de los haplogrupos mitocondriales amerindios en estudios de ADN arqueológico en varios países de América.

País	Frecuencias de haplogrupos mitocondriales					Referencia
	A	B	C	D	Otros	
Obando	0.250	0.750	-	-	-	Presente estudio
Brasil	0.167	-	-	0.722	-	Santos et al. (1996)
Chile	0.313	0.219	0.313	0.031	0.125	Moraga et al. (2001)
Perú	0.086	0.657	0.229	0.029	-	Shinoda et al. (2006)
Colombia	0.181	0.545	-	-	-	Presente estudio
Estados Unidos	0.315	0.12	0.426	0.083	0.056	Stone & Stoneking (1998)

Tabla 10. Frecuencias de Haplogrupos mitocondriales en Amerindios Colombianos

Población	Haplogrupos mitocondriales					Referencia
	A	B	C	D	Otros	
Coyaima	0.26	0.24	-	0.44	0.06	Rondón et al. (2006)
Awa-kuaikier	0.09	0.69	-	0.14	0.08	Rondón et al. (2006)
PK	0.34	0.27	0.13	0.02	0.24	Rondón et al. (2006)
PN	0.06	0.06	0.03	-	0.85	Rondón et al. (2006)
Emberá-Duma	0.11	0.45	0.11	-	0.33	Rondón et al. (2006)
Emberá	0.73	0.23	-	-	0.05	Mesa et al. (2000)
Ingano	0.15	0.44	0.37	-	0.04	Mesa et al. (2000)
Ticuna	0.13	0.15	0.39	0.33	-	Mesa et al. (2000)
Wayuu	0.25	0.35	0.38	0	0.03	Mesa et al. (2000)
sinú	0.19	0.41	0.30	0.05	0.05	Mesa et al. (2000)
PA	0.50	0.41	0.08	0	-	Mesa et al. (2000)
Tucano	-	0.18	0.47	0.35	-	Rodas et al. (2003)
Coreguaje	0.05	0.21	0.64	0.03	0.07	Rodas et al. (2003)
Curripaco	0.58	0.47	-	-	-	Rodas et al. (2003)
Guayabero-cunimia	0.50	0.17	0.13	-	0.20	Rodas et al. (2003)
Guahibo-sikuani	0.61	0.03	0.10	-	0.26	Rodas et al. (2003)
Kogui	0.367	-	0.633	-	-	Keyeux et al. (2002)
Pasto	0.667	0.333	-	-	-	Keyeux et al. (2002)
Emberá cauca	0.334	0.478	0.047	0.094	-	Keyeux et al. (2002)
paez	0.58	0.065	0.355	-	-	Keyeux et al. (2002)
Tule-cuna	0.5	0.267	0.2	-	0.033	Keyeux et al. (2002)

PK= Población mezclada del Valle del Cauca.

PN= población negra.

PA= Población mezclada de Antioquia.

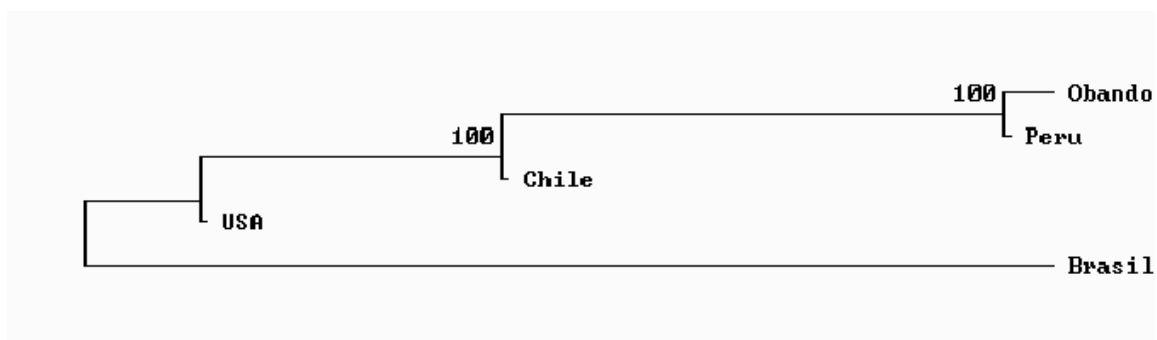


Figura 8. Árbol NJ construido a partir de las frecuencias haplotípicas de las muestras del presente proyecto comparado con muestras de otras poblaciones arqueológicas. El número 100 hace referencia al porcentaje que se obtuvo de los remuestreos realizados, es decir, que el 100% de los muestreos efectuados esas poblaciones aparecieron agrupados.

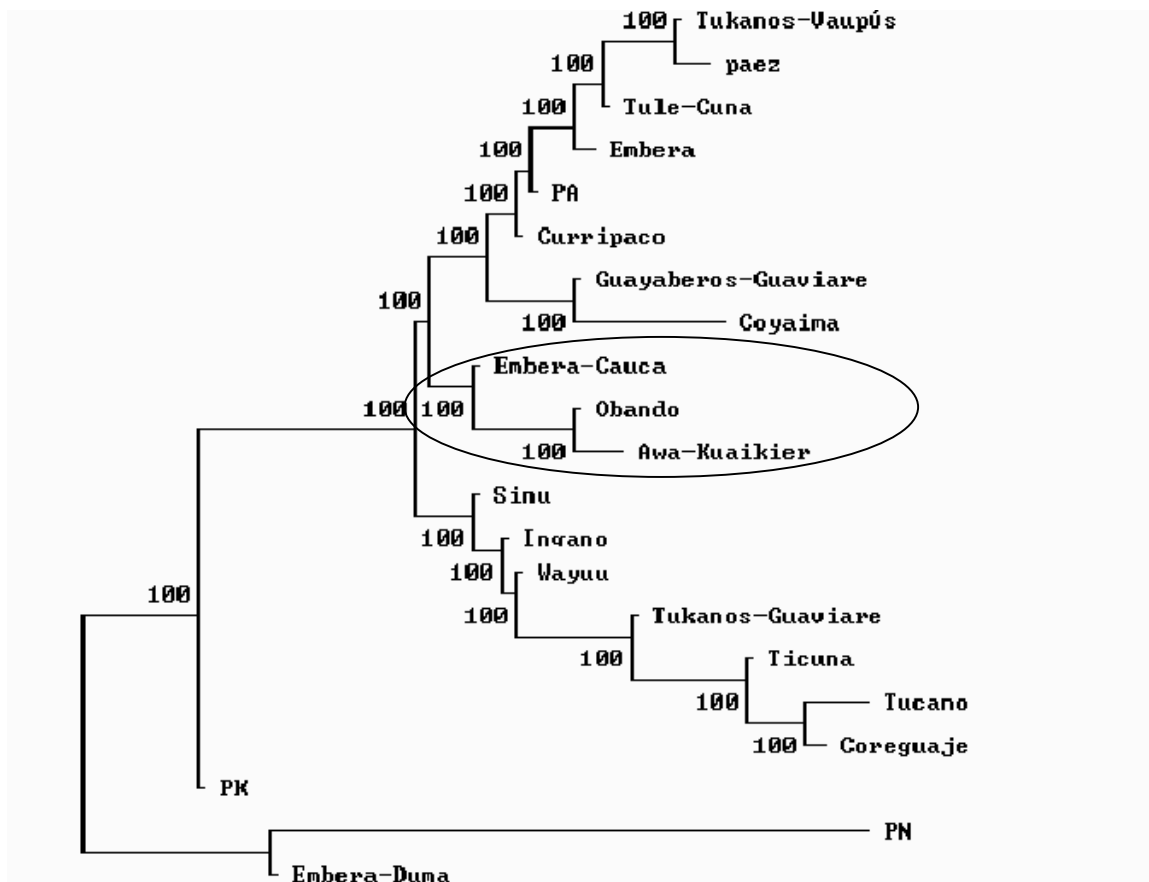


Figura 9. Árbol NJ construido a partir de las frecuencias haplotípicas de las muestras del presente proyecto comparado con muestras de otras poblaciones recientes. El número 100 hace referencia al porcentaje que se obtuvo de los remuestros realizados, es decir, que el 100% de los muestreos efectuados esas poblaciones aparecieron agrupados.

9. CONCLUSIONES

- Se implementó una metodología para la extracción de ADN la cual funcionó bajo las condiciones existentes en el laboratorio de Genética Molecular Humana de la Universidad del Valle.
- La metodología de extracción de ADN fue reproducible en las muestras estudiadas.
- Con base en la cantidad de ADN obtenido, el fémur y el radio son restos óptimos para la obtención de ADN a partir de muestras arqueológicas.
- La calidad y cantidad del ADN extraído depende en gran medida del estado de conservación de las muestras.
- Uno de los puntos críticos en la implementación de una metodología para extraer ADN fue la contaminación cruzada entre muestras durante su manipulación al momento de la extracción y la preparación de la PCR., por lo cual se recomienda la limpieza constante y el uso de controles adecuados.

10. LITERATURA CITADA

ARANGO, A. 2007. Determinación Del Sexo En Restos Ancestrales De Individuos Infantiles: Comparación Entre Métodos Moleculares y Antropométricos. *Exhumar Revista Universidad Nacional de Colombia* 3: 9-23.

BAILLIET, G., ROTHHAMMER, F., CARNESE, F.R., BRAVI, C.M & N.O. BIANCHI. 1994. Founder Mitochondrial Haplotypes in Amerindian Populations. *American Journal of Human Genetics* 54:27-33.

BARBARO, A., CORMACI, P. & A. BARBARO. 2008. Validation of DNA Typing From Skeletal Remains Using the Invitrogen Charge Switch Forensic DNA Purification Kit. *Forensic Science International: Genetic Supplement Series 1*: 398-400.

BOOM, R., SOL, C.A., SALIMANS, M.M., LANSEN, C.L., WERTHEIM-Van DILEN, P.M. & J. NOORDA. 1990. Rapid and Simple Methods for Purification of Nucleic Acids. *American Society for Microbiology* 28 (3): 495-503.

CANO, R. J., POINAR, H. N & G. O. POINAR. 1992. Isolation and Partial Characterization of DNA from the Bee *Proplebeia dominicana* (Apidae: Hymenoptera) in 25-40 Million Year Old Amber. *Journal of Medical Science Research*. 20: 249-251.

CATTANEO, C., SMILLIE, D., GELSTHORPE, K., PICCININI, A., GELSTHORPE, A.R & R. J. SOKOL. 1995. A Simple Method for Extracting DNA From Old Skeletal Material. *Forensic Science International* 74: 167-174.

CAPELLI, C. & F. TSCHENTSCHER. 2005. Protocols for Ancient DNA Typing. Págs. 265-278 en: A. Carracedo (ed.). *Methods in Molecular Biology: Forensic Protocols*. Humana Press, New Jersey.

COOPER, A. & H. N. POINAR. 2000. Ancient DNA: Do It Right Or Not At All. *Science* 289 (5482): 1139p.

DEGUSTA, D, & T.D. WHITE. 1996. On The Use Of Skeletal Collections For DNA Analysis. *Ancient Biomolecules* 1 (1):

DEL VALLE, C., RODRIGUEZ, A. & M. ESPINOZA. 2004. Comparación de tres métodos de extracción de ADN a partir de restos óseos. Tesis de pregrado. Costa Rica, Instituto Tecnológico de Costa Rica.

- FERNANDEZ, C. 1999. La Arqueología Molecular Aplicada a la Solución de Problemas Prehistóricos: análisis de ADNmt en Momias y restos óseos prehispánicos. Tesis de postgrado. Bogotá-Colombia, Universidad Nacional.
- FERNÁNDEZ, E. M. 2000. Polimorfismos de DNA Mitocondrial En Poblaciones Antiguas De La Cuenca mediterránea. Tesis de postgrado. Barcelona-España, Universidad de Barcelona, Departamento de Biología Animal. 674p.
- GILBERT, M.T., BANDELT, H.J., HOFREITER, M. & I. BARNES. 2005. Assessing ancient DNA studies. *Science* 20 (10): 541-544.
- HADDRATH, O & A. J. BAKER. 2001. Complete Mitochondrial DNA Genome Sequences of Extinct Birds: Ratite Phylogenetics and The Vicariance Biogeography Hypothesis. *International Scientific Journal of Royal Society B* 268: 939-945.6
- HAGELBERG, E. 1994. Dried samples: hard tissues. Mitochondrial DNA from ancient bones. Págs. 195 - 204. en: B. Herrmann & S. Hummel (ed.) *Ancient DNA: recovery and analysis of genetic material from paleontological, archaeological, museum, medical, and forensic specimens*. Springer, New York.
- HAGELBERG, E. & J.B. CLEGG. 1991. Isolation And Characterization of DNA From Archaeological Bone. *International Scientific Journal of Royal Society B*. 244:45-50.
- HANDT, O., KRINGS, M., WARD, R.H. & S. PAABO. 1996. The Retrieval of Ancient DNA Human DNA sequences. *American Journal of Human Genetics* 59: 368-376.
- HOFREITER, M., CAPELLI, C., KRINGS, M., WAITS, L., CONARD, N., MÜNDEL, S., RABEDER, G., NAGEL, D., PAUNOVIC, M., JAMBRŠIĆ, G., MEYER, S., WEISS, G. & S. PÄÄBO. 2002. Ancient DNA Analyses Reveal High Mitochondrial DNA Sequence Diversity And Parallel Morphological Evolution of Late Pleistocene Cave Bears. *Molecular Biology and Evolution*, 19 (8): 1244-1250.
- HÖSS, M. & S. PÄÄBO. 1993. DNA Extraction from Pleistocene Bones by a Silica-Based Purification Method. *Nucleic Acids Research* 21 (16): 3913 -3914.
- HÖSS, M., PÄÄBO, S. & N. K., VERESHCHAGIN. 1994. Mammoth DNA sequences. *Nature* 370: 333.
- IWAMURA, E.S.M., SOARES, J.A. & D.A. MUÑOZ. 2004. Human identification and analysis of DNA in bones. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo* 59 (6): 383-388.

JARA, P., VILLEGAS, V., LOPEZ DE MESA, C., TORRES, D., BAUTISTA, E., BERNAL, J., GOMEZ, A. & I. BRICEÑO. 2007. Análisis de polimorfismos del ADN mitocondrial (ADNmt) en un grupo precolombino Muisca. Cuadernos de medicina en investigación y salud 1 (2): 103-111.

JÜRGEN, H., MACAULAY, V. & M. RICHARDS. 2006. Human Mitochondrial DNA and the Evolution of *Homo Sapiens*. Nucleic Acids and Molecular Biology 18: 9-17.

KEYEUX, G., RODAS, C., GELVEZ, N & D. CARTER. 2002. Possible Migration Routes into South America Deduced from Mitochondrial DNA Studies in Columbian Amerindian Populations. Human Biology 74: 211-233.

KRAUSE, J., LALUEZA-FOX, C., ORLANDO, L., ENARD, W., GREEN, R.E., BURBANO, H.A., HUBLIN J.-J., BERTRANPETIT, J., HANNI, C., FORTEA, J., DE LA RASILLA, M., ROSAS, A. & S. PÄÄBO. 2007. The derived FOXP2 variant of modern humans was shared with Neanderthals. Current Biology 17: 49-53.

LALUEZA-FOX, C. 1996. Mitochondrial DNA haplogroups in four tribes from Tierra del Fuego-Patagonia: inferences about the peopling of the Americas. American Journal of Human Biology, 68: 855-871.

MESA, N.R., MONDRAGÓN, M.C., SOTO, I.D., PARRA, M.V., DUQUE, C., ORTIZ-BARRIENTOS, D., GARCÍA, L.F., VÉLEZ, I.D., BRAVO, M.L., MUNERA, J.G. BEDOYA, G., BORTOLINI, M.C & A. RUIZ- LINARES. 2000. Autosomal, mtDNA and Y Chromosome Diversity in Amerinds: Pre and Post-Columbian Patterns of Gene Flow in South America. American Journal of Human Genetics 67:1277-1286.

MONSALVE, M.V., CARDENAS, F., GUHL, F., DELANEY, A.D. & D.V. DEVINE. 1996. Phylogenetic Analysis of mtDNA Lineages in South American Mummies. Ann Hum Genet. 60: 293-303.

MORAGA, M., ASPILLAGA, E., CALOGERO, S., STANDEN, V., CARVALLO, P & 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: 219-726.

NEI, M., TAJIMA, F. & Y. TATENO. 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. J. Mol. Evol. 19:153-170.

PÄÄBO, S. 1985. Molecular cloning of ancient Egyptian mummy DNA. Nature 314: 644-645.

- PÄÄBO, S. 1988. Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning and the enzymatic amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86: 1939-1943.
- RIBEIRO-DOS-SANTOS, A.K. SANTOS, S.E., MACHADO, A.L., GUAPINDALA, V & M. ZAGO. 1996. Heterogeneity of Mitochondrial DNA haplotypes in Pre-Columbian natives of the Amazon Region. *American Journal of Physical Anthropology* 101: 29-37.
- RODAS, C., GELVEZ, N & G. KEYEUX. 2003. Mitochondrial DNA Studies Show Asymmetrical Amerindian Admixture in Afro-Colombian and Mestizo Populations. *Human Biology* 75: 13-30.
- RODRÍGUEZ, C. A. 2002. *El Valle del Cauca Prehispánico*. 1ª ed. Cali. Universidad del Valle. 171p.
- RODRÍGUEZ, C. A., FORERO, E & J. V. Rodríguez. 2008. El Estudio de los procesos Socioculturales Prehispánicos del Centro-Suroccidente de Colombia y Norte del Ecuador, utilizando Metodologías Transdisciplinarias. *International journal of south American Archaeology* 2: 34-45.
- RODRÍGUEZ, FLÓREZ, C.D. 2001. Odontoglfía de la población prehispánica de La Escopeta, Cali, Departamento del Valle del Cauca, Colombia. *Revista Argentina de Antropología Biológica*. 3(2):78.
- RODRÍGUEZ, J.V. 2005. *Pueblos, rituales y condiciones de vida prehispánica en el Valle del Cauca*. 1ª ed. Bogotá. Universidad Nacional de Colombia. 212p.
- ROHLAND, N., SIEDEL, H & M. HOFREITER. 2004. Nondestructive DNA extraction method for mitochondrial DNA analyses of museum specimens. *BioTechniques* 36 (5): 814-821.
- ROHLAND, N. & M. HOFREITER. 2007a. Ancient DNA extraction from bones and teeth. *Nature Protocols* 2 (7): 1756-1762
- ROHLAND, N. & M. HOFREITER. 2007b. Comparison and Optimization of Ancient DNA Extraction. *BioTechniques* 42:343-352
- RONDON, F., OROBIO, R.F., BRAGA, Y.A., CARDENAS, H & G. BARRETO. 2006. Estudio de la Diversidad Genética de cuatro Poblaciones aisladas del Centro y Suroccidente Colombiano. *Revista salud UIS* 38: 9-15.
- SCHURR, T.G & S.T. SHERRY. 2004. Mitochondrial DNA and Y Chromosome Diversity and the Peopling of the Americas: Evolutionary and Demographic Evidence. *American Journal of Human Biology* 16:420-439.

SHINODA, K., ADACHI, N., GUILLEN, S. & I. SHIMADA. 2006. Mitochondrial DNA analysis of ancient Peruvian highlanders. *American Journal of Physical Anthropology* 131: 98-107.

SILVA, A., BRICENO, I., BURGOS, J., TORRES, D., VILLEGAS, V., GOMEZ, A., BERNAL, J.E. & J.V. RODRÍGUEZ. 2008. Análisis de ADN mitocondrial en una muestra de restos óseos arcaicos del periodo Herrera en la sabana de Bogotá. *Biomédica* 28: 569-577.

STONE, A. & M. STONEKING. 1993. Ancient DNA from a Pre-Columbian Amerindian Population. *American Journal of Physical Anthropology* 92: 463-471.

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.

TARAZONA-SANTOS, E., CARVALHO-SILVA, D.R., PETTENER, D., DE-STEFANO, G., LUISELLI, D., DE-STEFANO, G.F., MARTINEZ, C., RICKARDS, O., TYLER-SMITH, C., PENA, S.D.J. & F.R. SANTOS. 2001. Genetic Differentiation in South Amerindians Is Related to Environmental and Cultural Diversity: Evidence from the Y chromosome. *American Journal of Human Genetics*. 68:1485-1496.

TORRONI, A., SCHURR, T.G., SUKERNIK, R.I., STARIKOVSKAYA, Y., CABELL, M., CRAWFORD, M., COMUZZIE, A. & A. WALLACE. 1993. mtDNA Variation of Aboriginal Siberians Reveals Distinct Genetic Affinities with Native Americans. *American Journal of Human Genetics* 53: 591-608.

YANG, Y & K, WATT. 2004. Contamination controls when preparing archaeological remains for ancient DNA analysis. *Journal of Archaeological Science* 32 (2005) 331–336

ANEXO A: PROTOCOLO PARA PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS, EXTRACCIÓN DE ADN Y AMPLIFICACIÓN POR PCR DE ADN ARQUEOLÓGICO.

LABORATORIO DE GENÉTICA MOLECULAR HUMANA

Sección de Genética, Departamento de Biología
Facultad de Ciencias, Universidad del Valle

NOMBRE DEL AUTOR: MELISSA QUINTERO ESCOBAR

Introducción

El uso de restos óseos como fuente para la obtención de ADN ha tenido importancia en la aplicación de las técnicas de biología molecular para múltiples fines forenses debido a su capacidad de conservación del ADN y en casos donde el tejido blando está severamente descompuesto o dañado debido al rápido crecimiento bacteriano en la descomposición cadavérica, especialmente en países tropicales donde están expuestos a altas temperaturas. Las diferencias entre cantidad y calidad de los resultados son atribuidos respectivamente a los factores ambientales existente (Baja humedad, baja temperatura y la ausencia de microorganismos favorecen la preservación del ADN) o a las condiciones de almacenamiento de los restos. No obstante se deben tener ciertas precauciones en el momento de la recolección y preparación de los huesos para evitar la pérdida de material valioso e irremplazable y evitar obtener en el proceso de extracción resultados falsos positivos (Iwamura et al. 2004).

Objetivo

Obtener ADN a partir de muestras óseas de amerindios prehispánicos con bajos niveles de contaminación con ADN reciente, que puedan ser utilizadas en estudios de biología molecular mediante amplificación por PCR.

Ventajas

- Minimiza riesgo de contaminación.
- Se puede conservar por largos períodos de tiempo.

Desventajas

- El material óseo que se utilice no se podrá recuperar, por lo tanto se perderá la evidencia física.

Usos

- Extracción de ADN y su posterior amplificación para marcadores microsatélites (STR), ADN mitocondrial (regiones hipervariables, haplotipos), amelogenina, útiles en estudios filogenéticos y evolutivos.

Condiciones de Manejo Generales

Nota: Se debe tener un cuidado especial cuando se colectan muestras humanas para el análisis de ADN. Todo el personal de investigación debe tomar medidas preventivas para entrar a la excavación, si no se puede tener las precauciones necesarias debe ser razonable que se escoja un par de excavadores para que colecten las muestras en un tiempo corto. Estos investigadores deben proveer una muestra de sangre o saliva para el posterior análisis genético que sirva de control de contaminación. Tener en cuenta que no todos los restos se llevaran para análisis moleculares, por lo que solo un pequeño número de muestras deben ser colectadas bajo estrictos controles de contaminación Degusta & White (1996), Yang & Watt (2004), Iwamura et al. (2004).

- Es conveniente que las muestras tengan los datos antropológicos básicos: edad del hueso con radiocarbono, sexo, patrón ancestral y estatura. Estos datos son útiles para la identificación y posterior comparación con los datos moleculares.
- Durante la manipulación de los especímenes (por separado), se debe utilizar guantes, tapabocas, gorro, bata de laboratorio.
- No intente limpiar el espécimen designado para análisis de ADN antiguo. La suciedad en los especímenes puede servir como protección contra los contaminantes que quieran ingresar a los tejidos de los huesos, haciendo la descontaminación más fácil en el laboratorio.
- No lave los especímenes con agua ya que puede causar que ADN diferente al de la muestra penetre profundamente en los tejidos del hueso y dañe el ADN de la muestra.
- Si es posible, evite adicionar cualquier preservativo a los especímenes, ya que estos químicos pueden inhibir la amplificación por PCR y puede causar una posible contaminación.
- Almacene los especímenes en frío y bajo condiciones secas para evitar una futura degradación del ADN arqueológico.
- Almacenar especímenes antiguos separadamente de los especímenes modernos para prevenir la contaminación entre muestras.

- Usar siempre utensilios estériles para cada una de las muestras, las cuales deben ser puestas en tubos plásticos estériles que pueden ser usados para la subsiguiente extracción de ADN.
- Se deben minimizar la manipulación de las muestras. En caso de restos arqueológicos que hayan sido extensivamente manipulados antes de ingresar al laboratorio se recomienda, en la medida que sea posible, no utilizar las partes superficiales de la muestra para el análisis de ADN, ya que pueden estar contaminadas con restos recientes de células de los investigadores.
- Si la muestra está muy sucia retirar con la cuchilla lo que más se pueda, lavar con agua ultra pura y colocar a la luz ultravioleta por 5 minutos de modo que todo el hueso haya sido expuesto y macerar la parte interna del hueso.

Condiciones de manejo de las muestras durante la excavación, pre-laboratorio

Nota: Los controles de contaminación pre-laboratorio más efectivos son en el momento de la excavación por parte de los arqueólogos y sus colaboradores. Para ello es necesario tomar precauciones que minimicen el riesgo de contaminación durante el proceso de excavación y almacenaje de las muestras Yang & Watt (2004):

- En cada excavación se sugiere se debe portar un kit de recolección, en él se debe incluir guantes, bolsas de papel limpias, papel aluminio, tapabocas o mascarar, gorros, bolsas plásticas, hipoclorito de sodio (10%), etanol (70%), bitácora y herramientas de excavación para limpieza tales como paletas y picos dentales.
- Seleccionar los investigadores que van a realizar la exhumación de los huesos.
- Utilizar bata de laboratorio, gorro, tapabocas y guantes.
- Seleccionar el material óseo que se va a utilizar. Tener en cuenta que cuando se seleccionan especímenes para análisis moleculares se deben escoger los que se encuentran en mejor estado de preservación dado el siguiente orden: dientes, huesos corticales y finalmente hueso esponjoso.
- Realizar registros fotográficos en el lugar de excavación y apuntar todos los datos antropológicos en la bitácora.
- Los especímenes deben ser almacenados individualmente en bolsas plásticas o tubos pero solo si se encuentran completamente secos (**Recuerde Evite lavarlos**). Si se encuentran en condiciones húmedas dejar secar a temperatura ambiente y luego almacenar en las bolsas plásticas herméticas seguido de bolsas de papel. Todas previamente marcadas.

- Una pequeña cantidad de hueso (1-2g) o un diente es usualmente adecuado para una extracción de ADN antiguo en ambientes secos. Para pruebas de reproductividad, un segundo juego de muestras (hueso o diente) deben ser colectadas para repetir extracción y un tercer juego para pruebas en otro laboratorio.

Condiciones de manejo de las muestras en el laboratorio, post-excavación

Nota: Previamente a la preparación de la muestra se debe esterilizar en autoclave todo aquel material que lo permita, como tubos, cuchillas, puntas, pipetas, frascos de vidrio, etc. El material restante se debe exponer a luz UV, mínimo media hora antes del proceso y si es posible, durante toda la noche anterior Rohland & Hofreiter 2007. Recuerde durante todos los procesos utilizar bata de laboratorio, guantes, gorro y tapabocas.

1. Preparación del hueso

- Se debe limpiar el área de trabajo con hipoclorito (0.5%), seguido de otra limpieza con etanol al 70%, DNAzap y agua destilada. Limpiar e irradiar con UV las superficies de trabajo, antes y después de cada experimento.
- Se colocan dentro de la cámara de extracción todos los materiales que se utilizarán (morteros, mazos, tubos, bolsas plásticas, guantes, papel aluminio en trozos, cuchillas estériles) y se irradiarán toda la noche con luz UV (254nm).
- Seleccionar el material óseo que se va a utilizar, evitando el contacto directo.
- Anotar en la bitácora los datos antropológicos de las muestras que se van a utilizar. Cuarteta básica de identificación (sexo, edad, patrón ancestral y estatura) y datos específicos (sitio de excavación, fecha, tipo de hueso)
- Marcar los tubos, bolsas plásticas herméticas y demás elementos con el nombre de cada muestra.
- Registro fotográfico de cada hueso.
- Cada muestra debe estar separada en una bolsa plástica hermética.
- Si es necesario, lavar impurezas con agua ultra pura estéril si es necesario. Dejar secar a temperatura ambiente.
- Retirar parte externa con una cuchilla estéril, cerca de 1 mm si es posible.
- Exponer el material a luz UV por 5 minutos.
- Macerar la muestra hasta que quede un polvillo fino. (se utiliza un mortero y un mazo por cada muestra).

- Pesar la muestra sobre papel aluminio previamente irradiado en UV y transférela a un tubo estéril de 15-50ml.

2. Preparación de reactivos

Día 1 Preparación (un día antes de la extracción)

- Se debe limpiar el sitio con hipoclorito (0.5%), seguido de otra limpieza con agua o etanol, DNAzap.
- Se colocan dentro de la cámara de extracción (con excepción de los reactivos), todos los materiales que se utilizarán (puntas, tubos, vidriería, pipetas, frascos, papel aluminio en trozos) y se irradiarán toda la noche con luz UV (254nm).

Día 2 Preparación de los reactivos antes de la extracción

Solución	Preparación y almacenamiento
2.1 Solución de Extracción	<i>Nuevo</i> para cada extracción
2.2 Tampón de Unión	<i>Nuevo</i> para cada extracción. Puede prepararse y almacenarse durante 3 semanas en la oscuridad y a T Ambiente (20-23 °C)
2.3 Tampón de Lavado	No establecido
2.4 Suspensión de Sílice	Máximo <i>un mes</i> en la oscuridad
2.5 Tampón TE	No establecido

Solución	Concentración
Solución de Extracción	0,45M EDTA , 0,25 mg*mL ⁻¹ proteínasa K
Tampón de Unión	5M GuSCN , 25 mM NaCl , 50 mM Tris
Tampón de Lavado	50% v/v etanol , 125 mM NaCl , 10 mM Tris , 1mM EDTA , pH 8,0
Suspensión de Sílice	4,8 g SiO₂ , 40 ml Agua ultra pura
Tampón TE	10 mM Tris , 1 mM EDTA , pH 8,0

2.1. Solución de extracción: los valores son dados para una muestra de 500 mg de hueso.

- Tome un frasco tapa azul de 100 mL (opcional dependiendo del volumen a preparar). Pese en papel aluminio 1.68 g de EDTA y deposítelos en el frasco.
- Con una micropipeta Gilson de 100-1000 μL y con una punta nueva, adicione 125 μL de proteínasa K (el stock debe estar a 20mg/mL). Descarte la punta.
- Calibre el pH, adicionando gota por gota de HCL midiendo con papel de pH, hasta obtener un valor cercano a 8. Evite pasarse de 8.
- Se mezclan en agua ultra pura en un volumen final de 10mL.
- Agite la solución hasta que el EDTA se disuelva completamente.

2.2. Tampón de unión:

Nota: al contacto con ácido, la GuSCN puede producir un gas toxico (HCN). Como una precaución, todos los buffer que contengan GuSCN fueron preparados en campana de extracción.

- Tome un frasco tapa azul de 500 mL (opcional dependiendo del volumen a preparar). Envuélvalo en papel aluminio para que la solución este en la oscuridad.
- Pese en papel aluminio 24.22g de GuSCN y deposítelos en el frasco.
- Pese en papel aluminio 0.059g de NaCL y deposítelos en el frasco.
- Pese en papel aluminio 0.248g de Tris y deposítelos en el frasco
- Aforar para un volumen final de 40 mL.
- Agite la solución hasta que se mezclen completamente las sales.

2.3. Tampón de lavado: para una muestra se necesitan 4mL de tampón de lavado.

- Tome un frasco tapa azul de 50 mL. (opcional dependiendo del volumen a preparar).

- Pese en papel aluminio 0.014g de NaCl y deposítelos en el frasco.
- Pese en papel aluminio 0.002g de Tris y deposítelos en el frasco.
- Pese en papel aluminio 0.00074g de EDTA y deposítelos en el frasco.
- Mida en una probeta 1mL de Etanol absoluto, y deposítelo en el frasco. Recuerde que la solución de lavado es 50% v/v.
- Calibre el pH, adicionando gota por gota de HCL midiendo con papel de pH, hasta obtener un valor cercano a 8. Evite pasarse de 8.
- Agite la solución hasta que el EDTA se disuelva completamente.

2.4. Preparación de la suspensión de sílice:

- Tome un tubo con tapa de 50 mL (opcional dependiendo del volumen a preparar).
- Pese en papel aluminio 4.8 g de sílice viértalos en el tubo con agua ultra pura para un volumen de 40mL, agite brevemente por inversión y deje reposar en una gradilla por 1 h.
- Transfiera 39 mL del sobrenadante a un tubo nuevo de 50 mL y deje sedimentar en una gradilla por 4 h.
- Descarte con una pipeta de vidrio 35 mL del sobrenadante y adicione 48 μ L de HCL (30% W/V) al botón. (Precaución, realizar en campana de extracción)
- Haga alícuotas de 850 μ L en tubos de 1,5 mL y guárdelas en oscuridad a temperatura ambiente.

2.5. Preparación Tampón TE:

- Tome un frasco tapa azul de 25 mL (opcional dependiendo del volumen a preparar)
- Pese en papel aluminio 0.01g de Tris y deposítelos en el frasco.
- Pese en papel aluminio 0.03 g de EDTA y deposítelos en el frasco.
- Se mezcla en agua ultra pura para un volumen final de 10mL
- Agite la solución hasta que el EDTA se disuelva completamente.

3. Extracción de ADN a partir de restos óseos mediante unión a la sílice.

- Limpiar el sitio de trabajo (hipoclorito 10%, etanol 70%, DNA zap, Agua destilada).
- Marcar las pipetas Pasteur y los tubos que se van a usar.

3.1 Liberación de ADN

- Adicione a la muestra de hueso 10ml de la solución de extracción.
- Sellar los tubos con papel envolvente. Mezcle suavemente por inversión.
- Incubar la muestra 24 horas en la oscuridad. Mezclando constantemente.

3.2 Purificación ADN

- Centrifugar las muestras por 2min a 6000g en la centrífuga clínica. Revise que NO se haya filtrado material.
- En un tubo cónico de 50ml adicionar 40 ml de la solución de tampón de unión y transferir el sobrenadante.
- Adicionar a la muestra 100µl de suspensión de sílice con una micropipeta Gilson de 100 - 1000 µl.
- Ajustar el pH 4.0 con HCL. adicionando 200 µl de HCL (30% W/V) y midiendo. Adiciona 25 µl de HCL (30% W/V) y mida el pH. Repita este paso hasta completar un total de 300 µl de HCL. Precaución el pH no debe ser más bajo de 4, es preferible un pH de 4.5 que uno de 3.5.
- Nota. Realice este paso en campana de extracción.
- Mezcle suavemente, selle los tubos con papel envolvente e incube con agitación 3h en la oscuridad.

3.3 Elución de ADN

- Centrifugar las muestras por 2min a 6000g en la centrífuga para tubos de 50ml.
- Transferir el sobrenadante con una pipeta Pasteur a un tubo nuevo de 2 mL y refrigerar.
- Al precipitado adicionar con una pipeta Gilson 100-1000 µl y una punta con filtro 1ml de tampón de unión y re suspender el botón pipeteando.
- Transferir con la misma punta con filtro la suspensión a un tubo nuevo de 2ml.

- Centrifugar por 15seg a 16000g en la microcentrífuga.
- Descartar con una pipeta Pasteur el sobrenadante en un vaso precipitado.
- Adicionar con una micropipeta Gilson de 100 – 1000 μ l y con puntas con filtro 1ml de tampón de lavado al botón de sílice (precipitado) y re suspender pipeteando.
- Centrifugar por 15seg a 16000g
- Repetir el paso anterior (tampón de lavado).
- Centrifugar nuevamente por 15seg a 16000g
- Descartar el sobrenadante con una pipeta Pasteur en un vaso precipitado.
- Dejar secar la sílice a T° del laboratorio por 15min. (tubos abiertos)
- Con una micropipeta Gilson de 100 – 1000 μ l Adicionar 50 μ de tampón TE a la sílice ya seca, re suspender agitando.
- Incubar con tapa cerrada 10min, agitar ocasionalmente.
- Centrifugar por 2min a 16000g en la microcentrífuga.
- Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo de 1.5mL.
- Nota: Evite transferir grandes cantidades de sílice, ésta puede inhibir o interferir en reacciones posteriores.

4. Cuantificación mediante el Qubit:

Nota: Asegurarse que los reactivos se encuentren a temperatura ambiente antes de comenzar la cuantificación.

- Marcar los tubos; se necesitan un tubo de 1.5mL para la solución de trabajo, dos tubos de 0.2mL para los estándar y un tubo de 0.2mL por cada muestra.
- Para preparar 100 μ L de la solución de trabajo se toman 99.5 μ L del tampón y 0.5 μ L del reagent.

- Para preparar 100 μL de estándar se toman 95 μL de la solución de trabajo y 5 μL del estándar. (para cada uno).
- Para preparar 100 μL de las muestras se toman 98 μL de la solución de trabajo y 2 μL del ADN muestra.
- Se mezclan cada una de las muestras y cada estándar durante 2-3 segundos.
- Incubar los tubos a temperatura ambiente por dos minutos.
- Proceder a leer las cuantificaciones en el fluorómetro.

5. Amplificación de ADN

Recomendaciones generales de condiciones de esterilidad:

- Uso exclusivo de reactivos para PCR.
- Un espacio en donde nunca antes se haya trabajado con ADN
- Ropa adecuada de laboratorio bata, gorro, guantes y tapabocas.
- Material estéril como puntas y tubos para PCR.
- La preparación de la reacción de PCR siempre debe realizarse en cámara de flujo laminar previamente esterilizada con DNAzap® invitrogen, con agua destilada y con etanol para evitar cualquier tipo de contaminación con ADN moderno. El orden de adición de los reactivos fue: agua ultra pura, tampón o buffer de PCR, BSA, MgCl_2 , iniciadores o “primers”, Taq polimerasa de ADN, ADN molde.
- Cada muestra se amplificó con cada sistema de iniciadores en un volumen final de reacción de 20 μL , con 2 μL de ADN molde en tampón 1X de PCR (Applied Biosystem), 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de BSA (Fermentas), 2.5mM MgCl_2 (Applied Biosystems), 140 μM de cada desoxinucleótido trifosfato (dNTP's), 0.5pmol de cada cebador y 1U/ μL de Taq GOLD (AmpliTaq Gold, Applied Biosystems). Para las digestiones se utilizaron las enzimas de restricción de invitrogen (10U/ μL), se realizó un volumen final de 20 μL con 10 μL de ADN molde, 7.5 μL de agua, 2 μL de tampón de la enzima y 0.5 μL de la enzima. Se incubó 16 horas overnight. Todos los iniciadores utilizados se encuentran en la Tabla 2.
- Todas las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador TC-9600-G marca Labnet international. Ver condiciones en la tabla 3.

- La detección de los productos amplificados se realizó mediante separación electroforética en geles de poliacrilamida al 8% (acrilamida: bisacrilamida, 19:1). Los geles se tiñeron con nitrato de plata y las asignaciones haplotípicas se hicieron utilizando un marcador de peso molecular de 50 pares de bases de invitrogen.

ANEXO B: PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN RECIENTE MEDIANTE LA TECNICA DE DESALAMIENTO O SALTING OUT PARA LA EXTRACCION DE ADN A PARTIR DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA

LABORATORIO DE GENÉTICA MOLECULAR HUMANA

Sección de Genética, Departamento de Biología
Facultad de Ciencias, Universidad del Valle

NOMBRE DEL AUTOR: MELISSA QUINTERO ESCOBAR

Introducción

La técnica está basada en la lisis de las membranas celulares y la separación posterior de las proteínas asociadas al ADN para facilitar su extracción mediante una precipitación con cloruro de sodio saturado y etanol. Una vez completado el procedimiento, se comprueba la presencia de ADN genómico mediante una electroforesis en gel de agarosa para su posterior cuantificación, que se basa en la separación de moléculas de diferente peso molecular en una matriz sometida a un campo eléctrico.

Objetivo

Obtener ADN reciente a partir de leucocitos de sangre periférica que puedan ser utilizados en estudios de biología molecular.

Ventajas

- Optimización en la cantidad de muestra a utilizar.
- Método eficaz.

Desventajas

- Proceso más laborioso.

Usos

- Extracción de ADN y su posterior amplificación para marcadores microsatélites (STR), ADN mitocondrial (regiones hipervariables, haplotipos), RFLPS, entre otros.

Procedimiento

- Tome una muestra de 2.5 ml de sangre total, anticoagulada con EDTA. Se recomienda dejarla dos días en el refrigerador antes de la extracción.

- Coloque los 2.5 ml de sangre total en un tubo de 15 ml con tapa y adicione 4.5 ml de solución de lisis para eritrocitos (NH_4Cl 155 mM, NaHCO_3 10 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.4)
- Incube la muestra en hielo por 20 min, mezclando inicialmente de manera suave, y a los 10 min para mejorar la lisis. Centrifugue durante 10 min. a 7000 rpm.
- Descarte el sobrenadante y resuspenda la pastilla de leucocitos (mediante golpes suaves en la base del tubo) en 3.5 ml de solución de lisis para eritrocitos. Incube nuevamente en hielo por 15 min. (En el congelador) y luego centrifugue como en el paso anterior.
- Elimine el sobrenadante y añada 1 ml de solución de lisis para eritrocitos, resuspenda el botón, centrifugue de 3 a 4 min. A 7000 rpm y elimine el sobrenadante.
- Resuspenda el botón en 750 μL de buffer de lisis para leucocitos (Tris-HCl 10 mM, NaCl 400 mM, EDTA 2 mM pH 8.2)
- Adicione 50 μL de SDS al 10% y 25 μL de proteinasa K (20 mg/ml). Resuspenda e incube a 37°C durante 20 hrs.
- Agregue 500 μL de NaCl saturado (6M). Agite VIGOROSAMENTE por 15 segundos.
- Centrifugue por 20 min a 7000 rpm y transfiera el sobrenadante a otro tubo y centrifugue por 7 minutos a 5000 rpm.
- Transfiera el sobrenadante a otro tubo de 15 ml y precipite el ADN con dos volúmenes de etanol al 100% (1 a 1.5 ml aprox.), Haga movimientos suaves de balanceo (por inversión del tubo) hasta formar un grumo homogéneo del material blanquecino.
- Pesque el grumo formado con una punta de 10 a 100 μL nueva, estéril
- En un tubo Eppendorff coloque 200 μL de Low TE 1X estéril y resuspenda el ADN extraído. Guarde en la nevera durante el tiempo necesario (refrigerada)

Nota: usar siempre bata de laboratorio, guantes y tapabocas.