

## AUSENCIA DE LA DELECCION DE 9 bp COII/tRNA<sup>Lys</sup> EN ABORIGENES DE FUEGO-PATAGONIA MEDIANTE ANALISIS DE DNA ANTIGUO

C. LALUEZA \* - A. PÉREZ-PÉREZ \* - E. PRATS \*\*  
P. MORENO \* - J. PONS \* - D. TURBÓN \*

### RESUMEN

Se ha estudiado la delección de 9 bp COII/tRNA<sup>Lys</sup> de la región V del DNA mitocondrial de 30 muestras antiguas de aborígenes de la región magallánica (kawéskar, yámana, sélknam y aónikenk) por medio de la técnica de la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Los restos analizados son mayoritariamente dientes, con una antigüedad que abarca del siglo XIX hasta hace unos 4000 años en el caso de Cueva Lago Sofía. Se han obtenido amplificaciones positivas en 24 casos, que muestran la ausencia de la delección de 9 bp en los cuatro grupos estudiados. La delección es de origen asiático y ha sido detectada en diversos grupos de aborígenes americanos, en frecuencias que van del 0% al 71%. Su ausencia en los fueguinos podría indicar que el grupo migratorio correspondiente a los paleoindios no la poseía y que migraciones posteriores la habrían introducido en América. Una hipótesis alternativa es que la delección estuviera presente originariamente y se hubiera perdido por efecto de la deriva genética a lo largo de la colonización de Sudamérica. Debe tenerse en cuenta que se trata de un marcador genético sencillo y, por lo tanto, de valor limitado en la interpretación filogenética. Hay actualmente en estudio otros marcadores mitocondriales que ayudarán a clarificar la posición de estas interesantes poblaciones en el contexto genético evolutivo de los primeros pobladores americanos.

### SUMMARY

We have studied the 9 bp COII/tRNA<sup>Lys</sup> mt-DNA Región V deletion in a sample of 30 ancient samples of aborigines from the Magellan region (kawéskar, yámana, selknam, and aónikenk) by PCR (Polymerase Chain Reaction). The remains analyzed mainly consist of teeth dating from 4,000 BP (Cueva Lago Sofia) till the XIXth Century. We have obtained positive amplifications in 24 of the samples, belonging to the four analyzed groups, which do not show the 9 bp deletion. The 9 bp genetic marker has an asiatic origin and has been detected in several amerindian groups, with varying frequencies ranging from 0% to 71%. Its absence in the Fuegian groups

\* Sección de Antropología. Dept. de Biología Animal. Facultad de Biología. Universidad de Barcelona.

\*\* Centro de Investigación y Desarrollo. Consejo Superior de Investigaciones Científicas de Barcelona

suggests that the paleoindian migration might have lacked it; later migratory movements might have introduced it in the American continent. An alternative hypothesis might be the deletion would have been present in the first settlers, and it would have been lost, along the colonization of South America, by genetic drift. It must be taken into account that the 9 bp deletion is a simple genetic marker and, thus, it has a limited value for making a filogenetic interpretation. Presently we are analyzing other mitochondrial DNA markers that might help to clarify the genetic affinities of the first settlers in Fuego-Patagonia from an evolutionary perspective.

## INTRODUCCION

Hasta hace poco, la biología molecular sólo ha tenido acceso al estudio de poblaciones humanas actuales a partir de las que se ha intentado reconstruir su historia evolutiva mediante el análisis de la variabilidad de marcadores considerados neutros desde un punto de vista adaptativo. Entre las dificultades iniciales de estas tentativas figuran la de la representatividad de los marcadores utilizados así como las derivadas de su extrapolación e interpretación de la historia evolutiva. Otro tipo de dificultad es el cálculo de las fluctuaciones del tamaño poblacional en el tiempo, necesario para evaluar la potencial pérdida de variabilidad por efecto de la deriva genética. Por otra parte, algunas zonas geográficas presentan hoy día un patrón de ocupación y de movimientos migratorios tan complejo que el panorama resulta inevitablemente confuso. Otra limitación aparece en el caso de grupos hoy extinguidos o diluidos por mestizaje que, en consecuencia, no son susceptibles de un estudio genético tradicional.

El descubrimiento de que el DNA puede conservarse durante miles de años, e incluso millones de años en casos excepcionales, en tejidos de restos arqueológicos y paleontológicos, ha propiciado el surgimiento de una nueva disciplina científica y ha permitido superar algunas de las limitaciones de la biología molecular anteriormente reseñadas. Paleogenética, arqueología molecular o palentología molecular son algunos de los términos que determinan los nuevos campos de estudio, basados en la recuperación y análisis de DNA antiguo.

Hasta la actualidad se ha recuperado DNA de tejidos momificados de animales y vegetales ya extintos, como el quagga (HIGUCHI *et al.* 1984), el mamut (JOHNSON *et al.* 1985), el lobo marsupial (THOMAS *et al.* 1989), una hoja de magnolia fósil (GOLENBERG 1991, GOLENBERG *et al.* 1990) o insectos conservados en ámbar (DeSALLE *et al.* 1992; CANO

*et al.* 1992; CANO *et al.* 1993). En estudios sobre humanos, se ha recuperado a partir de restos momificados egipcios y americanos (PÄÄBO 1985a, 1985b, PÄÄBO *et al.* 1988, LAWLOR *et al.* 1991, SALVO *et al.* 1992, ROGAN y SALVO 1990), y desde 1989 también a partir de restos óseos, que son mucho más abundantes en el registro arqueológico (HAGELBERG *et al.* 1989, HORAI *et al.* 1989, HAGELBERG *et al.* 1991).

Desde entonces, el número de trabajos y de equipos investigadores sobre DNA antiguo se ha incrementado enormemente gracias en buena medida al desarrollo de la técnica de la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), ideada por K. Mullis en 1985. Salvando la problemática metodológica inherente a la conservación del DNA en restos antiguos, la caracterización genética directa de los restos antiguos es viable desde el punto de vista poblacional, aumentando notablemente su significado biológico.

### *Justificación del estudio de DNA antiguo en fueguinos*

El estudio del DNA mitocondrial antiguo en un grupo humano se justifica especialmente en aquellos casos en que, como en los aborígenes de Tierra del Fuego, el grupo ya ha desaparecido, total o prácticamente, tanto por extinción como por mestizaje, y se dispone de restos esqueléticos distinguibles morfológicamente de otros restos aborígenes actuales y pasados.

Los aborígenes de Tierra del Fuego desaparecieron completamente, como grupos que practicaban una estrategia de cazadores-recolectores, ya en las primeras décadas del siglo XX. El estudio de indígenas actuales, descendientes más o menos directos de los antiguos aborígenes, es útil para documentar genéticamente estos grupos con independencia de su grado de aculturación. El hecho de que el DNA mitocondrial se transmita por línea materna y que el mestizaje de muchos grupos aborígenes se produce por

cruzamientos de hembras aborígenes con varones de otro grupo, permite obtener información válida a partir del DNA mitocondrial de estos individuos, aunque tengan un sólo antepasado aborigen si éste es por línea materna. En este caso, sin embargo, hay que confiar en que la atribución de la ascendencia por parte de un determinado individuo sea la correcta. Respecto a los grupos canoeros, quedan algunos yámana y kawéskar vivos en distintos puntos de Tierra del Fuego en los que no puede excluirse un cierto grado de mestizaje con otros grupos de aborígenes de Tierra del Fuego, ya que durante las misiones se aculturaron y mezclaron rápidamente, e incluso con otros grupos nativos sudamericanos. Los datos del DNA mitocondrial de los individuos yámana y kawéskar actuales podrían servir, en cualquier caso, como marco de referencia para comparar los datos obtenidos por medio del DNA antiguo, pero no serían totalmente fiables por sí solos para caracterizar genéticamente estos grupos.

## MATERIAL Y METODOS

Se ha extraído DNA de dientes de 26 aborígenes de Patagonia y de Tierra del Fuego pertenecientes a la colección del Instituto de la Patagonia de la Universidad de Magallanes, facilitadas por el Prof. Mateo Martinic. A este conjunto se incorporaron otras cuatro muestras, fragmentos de costilla, procedentes del canal Beagle y remitidas por E. Piana, del CADIC de Ushuaia (Argentina). La mayoría son de cronología reciente, probablemente de uno o dos siglos de antigüedad, si bien hay algunos restos más antiguos, como el caso de Cueva Lago Sofia (4.030 años AP) (Tabla 1).

Las muestras de dientes fueron sometidas inicialmente a un baño de ácido acético al 20% (15 min.), etanol (15 min.), para eliminar cualquier tipo de posible contaminación por contacto. Este protocolo de limpieza es similar al seguido por GINTHER et al. (1992). Posteriormente, los dientes fueron irradiados con UV (224 nm) durante 15 minutos. En las muestras de costilla se siguió un protocolo diferente, eliminando la capa superficial del hueso mediante una broca de dentista previamente esterilizada.

Una vez preparadas, cada muestra se pulverizó con un impactador electromagnético refrigerado por nitrógeno líquido (Freezer Mill Spex 6700), hasta obtener un polvo muy fino, cuyo volumen puede

oscilar entre uno y tres gramos de peso, que posteriormente se lavó con EDTA (0.5 M, pH 8.0) a fin de eliminar parte de los iones metálicos y sales. De cada muestra, se dejó un gramo en agitación a 37°C durante 12 horas en 10 ml de una solución de lisis (EDTA 0.5 M pH 8.0-8.5, Tris 50 mM, SDS 0.5% y Proteinasa K 2.5 µg/ml), y se centrifugaron, conservando finalmente el sobrenadante. La extracción del DNA se realizó mediante fenol cloroformo (SAMBROOK *et al.* 1989), que comprende tres extracciones sucesivas: fenol, fenol/cloroformo (1:1) y cloroformo. Mediante este procedimiento los ácidos nucleicos quedan en solución en la fase acuosa y se separan de los componentes proteicos. Finalmente, las muestras obtenidas se concentraron y desalinizaron mediante diálisis por centrifugación con Centricon-30 (Amicon), diluyéndolas en agua estéril hasta unos 300 µl y conservándolas congelada a -20°C.

La amplificación se llevó a cabo en un DNA Thermal Cycler Perkin-Elmer Cetus. Se realizaron 35 ciclos de PCR con desnaturalización durante 1 min. a 94°C, reasociación durante 1 min. a 55°C y extensión durante 1 min. a 72°C. El protocolo de amplificación utilizado es similar al utilizado por HAGELBERG *et al.* (1991). Se realizaron reacciones de 25 µl por muestra con las siguientes concentraciones finales de los componentes: Tampón 1x (Cetus), dNTP's 200 µM, MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, BSA 2-20 µg/ml, cebadores 2 pmoles/300 µl, Taq DNA Polimerasa (Cetus) 8-10 u/300 µl de reacción y 1 ul de muestra. Se incluyeron en cada amplificación dos blancos como controles, uno obtenido durante la lisis y extracción, llevando a cabo este proceso sólo con agua (blanco de extracción), y otro utilizando los reactivos del PCR con agua estéril (blanco de PCR). Estos blancos se utilizan como indicadores de la presencia de contaminación por DNA exógeno, y fueron negativos en todas las amplificaciones. Los cebadores utilizados fueron los mismos que los citados por WRISCHNIK et al. (1987). La longitud del segmento amplificado, que corresponde a la Región V descrita por CANN y WILSON (1983), es de 121 bp en el caso de no presentar la delección, y de 112 bp en caso contrario (Figura 1).

La ausencia/presencia de la delección de 9 bp se determinó mediante geles de agarosa de bajo punto de fusión (NuSieve GTG) al 6%, que se hicieron migrar a 4°C y 80 V durante unas 3-4 horas. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se observaron en un transiluminador de rayos ultra-violeta. En cada ampli-

ficación se incluyó como control una muestra de DNA antiguo de individuos de ascendencia polinésica en los que es característica la delección (HERTZBERG et al. 1989), procedentes de la isla de Pascua y proporcionados por la Dra. Silvia Quevedo del Museo Nacional de Historia Natural de Santiago de Chile. Asimismo se ha incluido como control una muestra de DNA actual europeo, que no presenta la citada delección. Las bandas amplificadas se pueden purificar a partir de gel de agarosa de bajo punto de fusión mediante fenol cloroformo y precipitación, quedando dispuestas para su secuenciación.

## RESULTADOS

De los 30 individuos analizados 24, que corresponden a 5 kawéskar, 5 sélknam, 5 aónikenk y 8 yámana, dieron resultado positivo. Ello representa un 80% de amplificaciones positivas, una elevada frecuencia en relación con otros marcadores utilizados para el momento lo que probablemente se debe a la menor longitud del segmento analizado.

Ninguno de los 24 fragmentos amplificados presenta la delección, incluyendo un individuo de Cueva Lago Sofía 1 (C.L.S. 43367), datado en 4.030 años AP. Se ha observado una relación directa entre las posibilidades de amplificación con éxito y el estado de conservación de la muestra. Una muestra mal conservada presenta invariablemente un producto de extracción de color marrón, probablemente debido a la presencia de ácido húmico, que inhiben al parecer la amplificación del DNA por PCR. La mejora del rendimiento de la técnica para el DNA antiguo reside en una selección previa rigurosa de las muestras desechando aquellas que no presenten un estado completamente satisfactorio. En el caso de los dientes, al parecer las piezas más recomendables de estudio. C. LALUEZA - A. PEREZ-PEREZ - E. PRATS - P. MORENO - J. PONS - D. TURBON, es aconsejable, asimismo, no analizar aquellos de corona extremadamente desgastada ni tampoco las afectadas por caries que hayan afectado a la cavidad pulpar.

En las muestras consideradas, las amplificaciones positivas de DNA antiguo siempre fueron más débiles que las de muestras de DNA actual, lo cual puede atribuirse a factores diversos como la degradación del DNA antiguo, su baja concentración en la muestra, así como a la presencia de ácidos húmicos y

de DNA exógeno de origen microbiano, el cual puede interferir en la amplificación.

En las mismas muestras se analizaron otras regiones del DNA mitocondrial, entre ellas dos de la Región de Control y una del gen del Citocromo C Oxidasa. Los cebadores empleados amplificaron segmentos de 228 bp, 375 bp y 400 bp de longitud, respectivamente. Se observó una relación inversa entre el número de amplificaciones positivas obtenidas y la longitud del segmento amplificado. Para el segmento mayor (400 bp) no se obtuvo ninguna amplificación positiva. Este fenómeno debe atribuirse al elevado grado de fragmentación del DNA antiguo, probablemente inferior a 400 bp en la mayoría de los casos. Ello constituye actualmente una limitación de los estudios de DNA antiguo que posiblemente haya que resolver mediante el estudio sucesivo de segmentos superpuestos más cortos que, por yuxtaposición, permitan reconstruir segmentos de mayor longitud.

## DISCUSION

### *La delección de 9 bp COII/tRNA<sup>lys</sup> en el contexto asiático y americano*

Después de la obtención de la primera secuencia completa de un genoma mitocondrial por parte del equipo de Cambridge (ANDERSON et al. 1981), CANN y WILSON (1983) procedieron a buscar mutaciones que afectaran a la longitud del DNA mitocondrial, es decir delecciones o inserciones, por medio de enzimas de restricción. Se describieron nueve regiones polimórficas que se numeraron arbitrariamente del I al IX. De éstas, la Región V se caracterizaba por presentar en algunos casos una delección de alrededor de 7 bp ( $\pm 3$  bp), en una región no codificante situada entre el gen del Citocromo C Oxidasa, subunidad II (COII) y el del tRNA<sup>lys</sup>. Se observó posteriormente, con métodos más refinados, que se trataba de 9 bp (WRISCHNIK et al. 1987). La región entera abarca 24 bp en la secuencia de Anderson, la cual no presenta la delección, por ser un europeo el individuo analizado, sino una doble repetición de la secuencia ACCCCCTCT. Esta parece ser la condición ancestral en el caso de los homínidos ya que las especies de primates más cercanas al hombre no presentan la delección (HORAI et al. 1992).

Los siguientes estudios profundizaron en la

variabilidad geográfica de la Región V: HORAI y MATSUNAGA (1986) en japoneses, HERTZBERG *et al.* (1989) y STONEKING *et al.* (1990) en aborígenes de Nueva Guinea, polinesios y australianos y BALLINGER *et al.* (1992) en vietnamitas, chinos, coreanos, malayos y aborígenes de Borneo (Sabah) y de Taiwan (Han). Los trabajos citados, así como otros posteriores, mostraron que la delección de 9 bp de la Región V era típicamente asiática y que su frecuencia presentaba un gradiente a lo largo de la costa asiática. En Polinesia, la delección estaba presente en un 93% en promedio y había llegado a la fijación en algunos archipiélagos del Pacífico así como en Nueva Zelanda (BALLINGER *et al.* 1992, HERTZBERG *et al.* 1989). El hecho de que la delección COII/tRNA<sup>Lys</sup> se encuentre indistintamente en individuos asiáticos que se agrupan en dos haplotipos muy diferenciados, podría indicar que la delección ha aparecido más de una vez a lo largo del tiempo (BALLINGER *et al.* 1992). Por otra parte, el hecho de que se hayan encontrado dos individuos con tres copias del segmento de 9 bp repetido en dos poblaciones muy diferentes (SHIELDS *et al.* 1992, PASSARINO *et al.* 1993), indicaría también que esta región intergénica es altamente inestable.

En América, el panorama detectado para el marcador COI/tRNA<sup>Lys</sup> era más complejo que en el caso de Polinesia (Figura 2). Inicialmente, PÁÄBO *et al.* (1988) recuperaron DNA de tejido cerebral de restos momificados encontrados en un pantano de Florida (Little Salt Spring), de unos 7000 años de antigüedad. El individuo en cuestión no presentaba la delección de 9 bp lo que indicaría una antigüedad considerable de la delección en el continente. El hecho de que se encontrara en algunas poblaciones como los indios Pima (Arizona) (45.2%) o los Maya (21.6%) constituye una evidencia del origen asiático del poblamiento americano (SCHURR *et al.* 1990). No se encontraron en cambio, en los indios Ticuna de Brasil (0%), ni, posteriormente, en los Dogrib del noroeste de Canadá (TORRONI *et al.* 1992). La ausencia de la delección en la única población de América del Sur estudiada hasta ese momento, Los Ticuna, hizo que se postulara en un primer momento la existencia de un posible "cuello de botella" en tre Centroamérica y Sudamérica.

Según los trabajos del grupo de Wallace, de la Universidad de Emory, los nativos americanos analizados por enzimas de restricción se podían encuadrar

en cuatro haplogrupos o linajes maternos, que denominaron A, B, C y D (TORRONI *et al.* 1993a). El haplogrupo A se define por el cambio de una A por una G en la posición 663, lo que conlleva la aparición de una diana de restricción para el enzima HaeIII. El haplogrupo B se caracteriza por presentar la delección de 9 pares de bases COI/tRNA<sup>Lys</sup>. El haplogrupo C se distingue por un cambio de A por G en la posición 13263, lo cual da lugar a la desaparición de una diana para HincII en 13259 y la aparición de otra para AluI en 13262. Finalmente, el haplogrupo D presenta el cambio de una C por una A en la posición 5178, lo cual elimina una diana para AluI en 5176.

Anteriormente se había intentado caracterizar el poblamiento de América en base principalmente a la evidencia dentaria y, en este sentido, TURNER (1983) había propuesto la existencia de tres oleadas migratorias sucesivas. La integración de estos datos con otros de tipo lingüístico y genético llevó a GREENBERG *et al.* (1986) a asociar las tres migraciones citadas con las tres principales familias lingüísticas del continente: los lenguajes Na-Dene, la amerindia y la Eskimo-Aleutiana. Hay que hacer notar, sin embargo, que el origen común de los numerosos lenguajes englobados dentro del grupo de los amerindios es discutido por la mayoría de los lingüistas americanos. De los tres grupos descritos, los amerindios actuales, ampliamente distribuidos por el continente americano, serían los descendientes de los antiguos paleoindios, los primeros pobladores del continente. En concordancia con su supuesta mayor antigüedad, los amerindios muestran una mayor heterogeneidad genética y presentan los cuatro linajes definidos por el grupo de Wallace. Por su parte, los Na-Dene pertenecerían de forma predominante a un sólo linaje, el linaje A, consecuentemente con menor diversidad genética, y no presentan la delección de 9 bp. Por último, hay consenso en considerar a los Eskimo-Aleutianos, en los que la delección COII/tRNA<sup>Lys</sup> también está ausente, como los últimos pobladores llegados a América a través de Bering, restringidos en su hábitat a las zonas árticas.

El hecho de que las poblaciones recientes de la zona de Beringia, la zona próxima al Estrecho de Bering tanto en la parte asiática como americana, no presenten la delección (SHIELDS *et al.* 1992, SHIELDS *et al.* 1993, TORRONI *et al.* 1993b) ha llevado a la elaboración de diversas hipótesis del primer

poblamiento americano. De acuerdo con la idea de las tres migraciones, la antigüedad de los grupos pobladores ha de estar correlacionada con la dispersión geográfica y el distanciamiento respecto al punto de entrada, el Estrecho de Bering. Que la delección se encuentre en Asia y América únicamente por debajo de los 55° de latitud Norte, habiendo sido necesario un paso por el Estrecho de Bering, puede explicarse mediante dos hipótesis. En la primera, la delección habría estado presente originalmente en las poblaciones de Beringia, pero se habría perdido en éstas por deriva. Ello implicaría que en todos los grupos estudiados hasta el momento se habría dado aisladamente el mismo fenómeno, lo cual es altamente improbable (SHIELDS *et al.* 1993, TORRONI *et al.* 1993b).

La hipótesis alternativa sería la de una migración independiente, con la delección, que se habría desplazado por las zonas costeras de Siberia y Beringia, sin contacto con los grupos de la tundra interior, y que se habría expandido una vez en el nuevo continente (TORRONI *et al.* 1993b). Según TORRONI *et al.* (1992), esta migración independiente del linaje portador de la delección, el linaje B, estaría situada en el tiempo entre la de los amerindios y la de los Na-Dene. El tiempo de divergencia calculado para el haplogrupo B sería el menor de los cuatro haplogrupos, entre 6.000 y 12.000 años B.P. (TORRONI *et al.* 1993a).

Paralelamente, el grupo de Ward, de la Universidad de Utah (WARD *et al.* 1991, 1992) puso en duda la hipótesis de los cuatro linajes y, con ello el bajo tamaño efectivo de la población colonizadora, a partir de datos obtenidos de los Nuu-Chah-Nulth de la isla Vancouver. Por otra parte, la actualización de SZATHMARY (1993) sugiere que la teoría de las tres migraciones debe revisarse a fondo.

Los estudios de mt DNA llevados a cabo posteriormente en poblaciones de Sudamérica, hasta entonces el subcontinente menos estudiado, detectaron de nuevo los cuatro linajes mitocondriales en una muestra de 72 individuos, en los que se secuenció la región de control (HORAI *et al.*, 1993). Uno de los linajes, denominado I, se caracterizaba por poseer la delección COII/trnRNA<sup>Lys</sup>. El hecho de que ésta se encontrara también en Sudamérica, constatado por vez primera en el estudio citado, parecía descartar el cuello de botella Centroamérica/Sudamérica propuesto por SCHURR *et al.* (1990) (HORAI *et al.* 1993). La

delección COII/trnRNA<sup>Lys</sup>, se estudió en cuatro poblaciones de Colombia, en 20 individuos, y nueve de Chile, con un total de 45, siendo el porcentaje de haplotipos con la delección del 20% en ambos casos. MERRIWETHER *et al.* (1992) halló una frecuencia de la delección de un 71% en una población Aymara de Chile, aunque otras tres, también Aymaras, no la presentan. En 2 poblaciones Pehuenches, en la zona centro-sur de Chile, el porcentaje variaba desde el 2 al 13%. Finalmente, en un grupo de Yaganes de Tierra del Fuego la frecuencia de la delección es del 0%. STONE y STONEKING (1993) caracterizan los cuatro linajes mitocondriales del grupo de Wallace en una muestra de 50 individuos amerindios Oneotas procedentes de una necrópolis pre-colombina del 1300 d.C. el 98% de los individuos presentaban alguno de los cuatro linajes, lo que, en relación a lo hallado en poblaciones actuales indígenas, indicaría que no hubo reducción en la diversidad mitocondrial aborigen asociada al impacto demográfico de la colonización europea.

En cuanto a restos antiguos, se ha estudiado el DNA mitocondrial de algunas momias chilenas de entre 500 y 3000 años de antigüedad (Azapa, Camarones, Mollo y Chinchorro) y de momias mayas (de hace unos 1000 años). En ningún caso se encontró la delección.

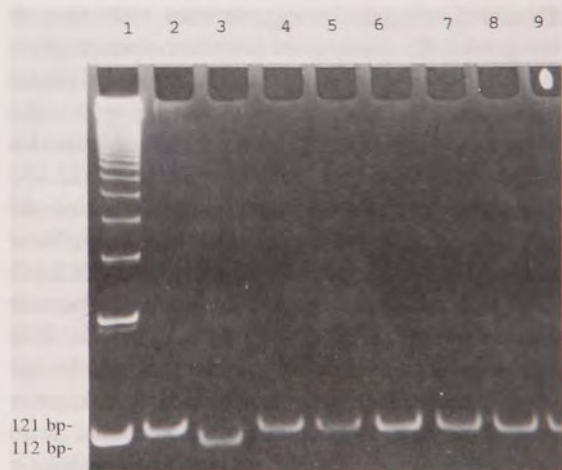


Figura 1. Determinación de la presencia/ausencia de la delección de 9 bp. 1: marcador de peso molecular (múltiples de 123 bp), 2: muestra de DNA actual europeo (sin selección), 3: muestra de DNA antiguo de la Isla de Pascua (con delección), 4-9: muestras de DNA antiguo de guineaños (sin delección).

### *Genética de poblaciones para genes mitocondriales*

El DNA mitocondrial posee unas características especiales que hace que su análisis en la reconstrucción de la historia de las poblaciones sea más rápido y sencillo que el DNA de los genes nucleares. Al ser de herencia estrictamente materna, la historia de los linajes mitocondriales puede trazarse hacia el pasado sin los problemas derivados de la recombinación y, por otra parte, se adapta bien al nivel intraespecífico, en cuanto a ámbito de aplicación, en las inferencias filogenéticas. Además, el genoma mitocondrial humano es conocido en su totalidad (abarca poco más de 16500 bp), y presenta una elevada variabilidad a nivel subespecífico, debido a que su tasa de mutación es mucho más elevada que la observada en genes nucleares. Finalmente, su elevado número dentro de cada célula, varios miles de genomas mitocondriales por cada genoma nuclear, representa una ventaja adicional en estudios de DNA antiguo, lo que aumenta las posibilidades de amplificación.

Desde el punto de vista de la genética de poblaciones, el DNA mitocondrial presenta características propias respecto a otros marcadores. La previa comprensión de estas diferencias, en las que el efecto de la deriva genética puede ser importante, nos ayudará a valorar la información de los datos procedentes del análisis del DNA mitocondrial como la delección de 9bp.

Para un locus nuclear diploide, el efecto de la deriva en una población se entiende como el resultado de un muestreo aleatorio de  $2N$  gametos, es decir  $2N$  genes, en el "pool" génico de la generación precedente, siendo  $N$  el número de individuos que participan en la reproducción. Ello se debe a que la deriva actúa sobre los genes, que son diploides, y no sobre los individuos. El número efectivo de genes nucleares para organismos diploides es  $2N_e$ , siendo  $N_e$  la media armónica del número de varones ( $N_m$ ) y hembras ( $N_f$ ) de la población ( $N_e = 4N_m N_f / (N_m + N_f)$ ). En el caso del DNA mitocondrial el tamaño efectivo de la población es simplemente el tamaño efectivo de los individuos femeninos ( $N_e = N_f$ ), debido a la herencia materna, al igual que el número efectivo de genes, debido a que es equivalente a un organismo haploide. Esto comporta una reducción de cuatro veces el tamaño efectivo de la población, respecto de un gen nuclear de la misma población, en el caso de que la proporción entre sexos

sea de 1:1. En la práctica, ésta disminución del tamaño efectivo de la población representa un incremento del efecto de la deriva en el caso de los linajes mitocondriales. Por otra parte, como el tiempo medio ( $t$ ) de fijación o de pérdida de un gen neutro nuclear de frecuencia alélica inicial 0.5 es aproximadamente  $2N$ , y como en el caso del DNA mitocondrial el número efectivo de genes es sólo  $N_e$ , el tiempo de fijación de éstos es la mitad que el calculado para los genes nucleares. En la práctica, esto conllevará que las mutaciones aparecidas en el DNA mitocondrial se fijen o se pierdan más rápidamente que las mutaciones nucleares (BIRKY *et al.* 1983).

Estos y otros factores dan lugar a que los datos derivados del DNA mitocondrial y de los marcadores nucleares estén en cierta medida "desacoplados". No hay que olvidar que con los estudios del DNA mitocondrial se está reconstruyendo la historia de los genes de las mitocondrias y no la historia de las poblaciones ni de los genes nucleares. Es de suponer, sin embargo, que todos están estrechamente relacionados, por la interacción de núcleo y citoplasma.

### *Ausencia de la delección de 9 bp en los grupos fueguinos*

La ausencia de la delección en los aborígenes de la región magallánica (Figura 1) puede interpretarse de varias formas. En primer lugar, podría suponerse que la migración de los paleoindios, de los cuales los fueguinos son probables descendientes, no poseía dicha mutación en su acervo genético y que la delección fue introducida en América por otras migraciones posteriores. Esta hipótesis está en concordancia con lo hallado en todos los restos más antiguos analizados hasta el momento, pues ninguno presenta la delección: la momia de Florida de alrededor de 7000 años A.P., (PÁABO *et al.* 1988), momias de Chile de entre 500 y 3000 años A.P. y momias mayas de hace unos 1000 años (MERRIWETHER *et al.* 1992); el Hombre de Acha-2 (Chile) de 9.500-10.000 años A.P. (MATHENY y WOODWARD 1993) y el individuo de cueva Lago Sofía analizado en este estudio, de 4.030 años A.P.. Una hipótesis alternativa sería que estas poblaciones amerindias poseerían originalmente la delección y este rasgo se habría perdido por efecto de la deriva cuya importancia en la extinción de los linajes mitocondriales ya se ha considerado anteriormente. Otras explicaciones, como la existencia de mutaciones independientes

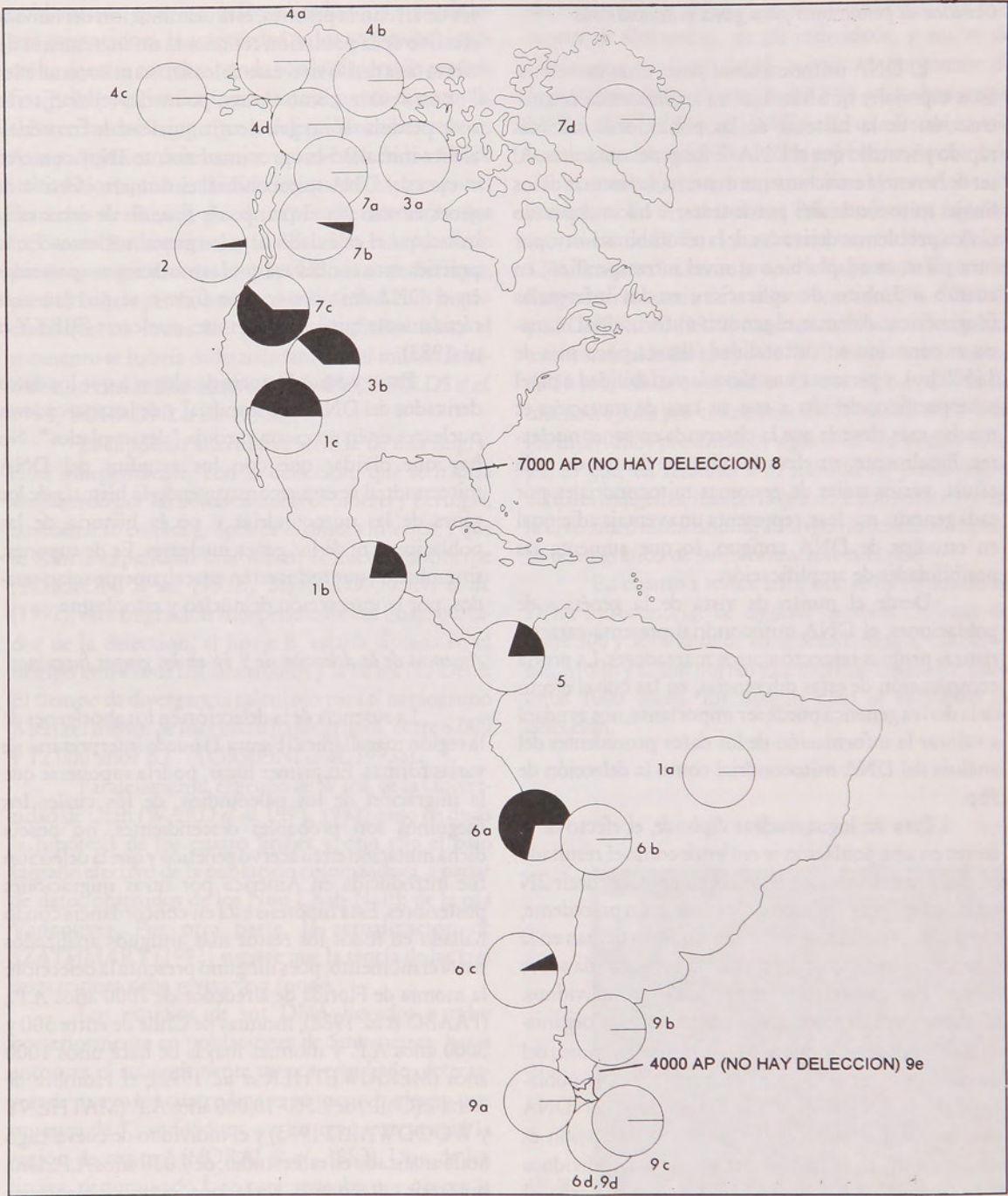


Figura 2: Distribución de la delección de 9 bp en poblaciones americanas (el área sombreada corresponde al porcentaje de individuos que presentan la delección). 1. (Schurr et al. 1990); 1a) Ticuna, 1b) Maya, 1c) Pima; 2: (Ward et al. 1991), Nuuchahnulth; 3: (Torrioni et al. 1992); 3a) Dogrib, 3b) Navajo; 4: (Shields et al. 1992); 4a) Yupik, 4b) Inupiaq Eskimos, 4c) Aleuts, 4d) Athabaskan; 5: (Horai et al. 1993), Colombia; 6: (Merriweather et al. 1993); 6a), 6b) Aymara, 6c) Pehuenche, 6d) Yámana; 7: (Shields et al. 1993); 7a) Haida, 7b) Bella Coola, 7c) Yakima, 7d) Greenlandic Eskimos; 8: (Pääbo et al. 1988) Little Salt Springs, Florida; 9: (presente trabajo); 9a) Kawsakar, 9b) Aonikenk, 9c) Selknam, 9d) Yámana, 9e) Cueva Lago Sofia.

en la Región V, incluso en el contexto mismo de las poblaciones americanas (TORRONI *et al.* 1993a), son también posibles, aunque menos probables, en la interpretación de la distribución de este marcador genético a lo largo del continente.

De los cuatro haplogrupos mitocondriales, A, B, C y D, que presentan los amerindios actuales estudiados hasta el momento, en los fueguinos no estaba presente el B si aceptamos la primera y más plausible de las hipótesis antes comentadas. La caracterización definitiva de los fueguinos antiguos mediante el estudio de diversos haplotipos se lleva actualmente a cabo en nuestras mismas muestras, lo que ayudará a clarificar la posición de estas interesantes poblaciones en el contexto genético evolutivo de los primeros pobladores americanos.

#### AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha podido llevarse a cabo gracias a la inestimable colaboración de diversos investigadores e instituciones científicas que mostraron un alto grado de sensibilización ante un tema de investigación tan puntero como el del DNA antiguo.

En este sentido damos las gracias al Prof. Mateo Martinic, del Instituto de la Patagonia de la Universidad de Magallanes (Chile) por habernos facilitado 26 de las 30 muestras analizadas en este estudio. Asimismo al Dr. E. Piana, del Centro Austral de Investigaciones Científicas de Ushuaia (Argentina), por facilitarnos cuatro muestras de costilla procedentes de recientes excavaciones de concheros de la región argentina del Canal Beagle. Damos las gracias también a la Dra. Silvia Quevedo, del Museo Nacional de Historia Natural de Chile, por habernos permitido estudiar muestras de aborígenes de la Isla de Pascua que han sido utilizadas como control en el presente estudio. Gracias, por último, a la Dra. Erika Hagelberg, de la Universidad de Cambridge, por las valiosas orientaciones en la aplicación de su protocolo.

El presente trabajo ha sido subvencionado por el proyecto D.G.I.C.Y.T. PB90-0553-C02.

#### REFERENCIAS

- ANDERSON, S., BANKIER, A.T., BARREL, B.G., BRUIJN, M.H. de, COULSON, A.R., DROUIN, J., EPERON, I.C.,

NIERLICH, D.P., ROE, B.A., SANGER, F., SCHREIRER, P.H., SMITH, A.J.H., STANDEN, R. y YOUNG, I.G. (1981): Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457-465.

BALLINGER, S.W., SCHURR, T.G., TORRONI, A., GAN, Y.Y., HIDGE, J.A., HASSAN, K., CHEN, K-H y WALLACE, D.C. (1992): Southeast Asian mitochondrial DNA analysis reveals genetic continuity of ancient Mongoloid migrations. *Genetics* 130: 139-152.

BIRKY Jr, C.W., MARUYAMA, T. y FUERST, P. (1983): An approach to population and evolutionary genetic theory for genes in mitochondria and chloroplasts, and some results. *Genetics* 103: 513-527.

CANN, R.L. y WILSON, A.C. (1983): Length mutations in human mitochondrial DNA. *Genetics* 104: 699-711.

CANO, R.J., POINAR, H.N., ROUBIK, D. y POINAR, G.O. (1992): Enzymatic amplification and nucleotide sequencing of portions of the 18s rRNA gene of the bee *Proplebeia dominicana* isolated from 25-40 million year old amber. *Med. Sci. Res.* 20: 629-622.

CANO, R.J., POINAR, H.N., PIENIAZEK, N.J., ACRA, A. y POINAR, G., O. (1993): Amplification and sequencing of DNA from a 120-135 million-year-old weevil. *Nature* 363: 536-538.

DeSALLE, R., GATESY, J., WHEELER, W. y GRIMALDI, D. (1992): DNA Sequences from a Fossil Termite in Oligo-Miocene Amber and Their Phylogenetic Implications. *Science* 257: 1933-1936.

GINTHER, C.L., ISSEL-TARVER, L. y KING, M.C. (1992): Identifying individuals by sequencing mitochondrial DNA from teeth. *Nature Genetics* 2: 135-138.

GOLENBERG, E.M. (1991): Amplification analysis of Miocene plant fossil DNA. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. (series B)* 333: 419-427.

GOLENBERG, E.M., GIANNASI, D.E., CLEGG,

- M.T., SMILEY, C.J., DURBIN, M., HENDERSON, D. y ZURAWSKI, G. (1990): Chloroplast DNA sequence from a Miocene Magnolia species. *Nature* 344: 656-658.
- GREENBERG, J.H. TURNER, C.G., ZEGURA, S.L. (1986): The settlement of the Americas: a comparison of the linguistic, dental and genetic evidence. *Current Anthropology* 27: 477-497.
- HAGELBERG, E., SYKES, B. y HEDGES, R. (1989): Ancient bone DNA amplified. *Nature* 342: 485.
- HAGELBERG, E., BELL, L.S., ALLEN, T., BOYDE, A., JONES, S.J. y CLEGG, J.B. (1991): Analysis of ancient DNA: techniques and applications. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 333: 399-407.
- HERTZBERG, M., MICKLESON, K.N.P., SERJEANTSON, S.W., PRIOR, J.F. y TENT, R.J. (1989): An Asian-specific 9-bp Deletion of Mitochondrial DNA Is Frequently Found in Polynesians. *Am. J. Hum. Genet.* 44:504-510.
- HIGUCHI, R.G., BOWMAN, B., FREIBERGER, M., RYDER, O.Ä. y WILSON, A.C. (1984): DNA sequence from the quagga, an extinct of the horse family. *Nature*, 312: 282-284.
- HORAI, S. y MATSUNAGA, E. (1986): Mitochondrial DNA polymorphism in Japanese. II. Analysis with restriction enzymes of four or five base pair recognition. *Hum. Genet.* 72: 106-117.
- HORAI, S., HAYASAKA, K., MURAYAMA, K., WATE, H., KOIKE, H. y NAKAI, N. (1989): DNA amplification from ancient human skeletal remains and their sequence-analysis. *Proceedings of the Japan Academy*, series B - Physical and Biological Sciences. 65: 229-233.
- HORAI, S., SATTA, Y., HAYASAKA, K., KONDO, R., INQUE, T., ISHIDA, T., HAYASHI, S. y TAKAHATA, N. (1992): *Man's place in Hominoidea revealed by mitochondrial DNA genealogy*. *J. Mol. Evol.* 35: 32-43.
- HORAI, S., KONDO, R., NAKAGAWA-HATTORI, Y., HAYASHI, S., SONODA, S. y TAJIMA, K. (1993): Peopling of the Americas, Founded by Four Major Lineages of Mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Evol.* 10 (1): 23-47.
- JOHNSON, B.H., OLSON, C.B. y GOODMAN, M. (1985): Isolation and characterization of deoxyribonucleic acid from tissue of the woolly mammoth, *Mammuthus primigenius*. *Comp. Biochem. Physiol.* (B) 81: 1045-1051.
- LAWLOR, B.C., DICKEL, C.D., HAUSWIRTH, W.W. y PARHAM, P. (1991): *Ancient HLA genes from 7.500-year-old archaeological remains*. *Nature* 349: 785-788.
- MATHENY, R.T. y WOODWARD, S. (1993): *A ca. 9500 to 10000 year old human DNA sequence from Acha-2, Northern Chile*. Comunicación presentada al 2nd. International Conference on Ancient DNA. Smithsonian Institution. Washington, D.C.
- MERRIWETHER, D.A., ROTHAMMER, F. Y FERRELL, R.E. (1992): *Mitochondrial DNA variation in ancient and contemporary Amerindians using the tRNALYS-COII deletion and diagnostic restriction sites*. *Am. J. Hum. Genet.* 51: A13.
- PÄÄBO, S. (1985a): Molecular cloning of Ancient Egyptian mummy DNA. *Nature* 314: 644-645.
- PÄÄBO, S. (1985b): Preservation of DNA in Ancient Egyptian mummies. *J. Archaeol. Sci.* 12: 411-417.
- PÄÄBO, S., GIFFORD, J.A. y WILSON, A.C. (1988): Mitochondrial DNA sequences from a 7000-year old brain. *Nucl. Acid Res.* 16, N° 20: 9775-9787.
- PASSARINO, G., SEMINO, O., MODIANO, G. y SANTACHIARA-BENERECETTI, A.S. (1993): COII/tgRNA<sup>Lys</sup> Intergenic 9-bp Deletion and Other mtDNA Markers Clearly Reveal That the Tharus (Southern Nepa) Have Oriental Affinities. *Am. J. Hum. Genet.* 53: 609-618.
- ROGAN, P.K. y SALVO, J.J. (1990) Study of Nucleic

- Acids Isolated From Ancient Remains. *Yearbook of Physical Anthropology* 33: 195-214.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. y MANIATIS, T. (1989): *Molecular Cloning: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Second Edition.
- SALVO, J.J., ALLISON, M.J. y ROGAN P.K. (1992): Molecular genetics of pre- Columbian South American mummies. *Am. J. Phys. can mummies. Am. J. Phys Anthropol.* 78: 295.
- SANGER, F., NICKLEN, S. y COULSON, A.R. (1977): DNA sequencing with chainterminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
- SCHURR, T.G., BALLINGER, S.W., GAN, Y.Y., HODGE, J.A., MERRIWETHER, D.A., LAWRENCE, D.N., KNOWLER, W.C., WEISS, KNOWLER, W.C., WEISS, K.M. y WALLACE, D.C. (1990): Amerindian mitochondrial DNAs have rare Asian mutations at high frequencies suggesting they derived from four primary maternal lineages. *Am. J. Hum. Genet.* 46:613-623.
- SHIELDS, G.F., HECKER, K., VOEVODA, M.I. y REED, J.K. (1992): Absence of Asian-specific region V mitochondrial marker in Native Beringians: *Am. J. Hum. Genet.* 50:758-765.
- SHIELDS, G.F., SCHMIECEN, A.M., FRAZIER, B.L., REDD, A., VOEVODA, M.I., REED, J.K. y WARD, R.H. (1993): mt DNA sequences suggest a recent evolutionary divergence for Beringian and northern North American populations. *Am. J. Hum. Genet.* 53:549-562.
- STONE, A.C., STONEKING, M. (1993): Ancient DNA from a Pre-Columbian Amerindian population. *A. J. Phys. Anthropol.* 92:463-471.
- STONEKING, M., JORDE, L.P., BHATIA, K. y WILSON, A.C. (1990): Geographic variation in human mitochondrial DNA from Papua New Guinea. *Genetics* 124:717-733.