

UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TESIS

“DETERMINACIÓN DEL SEXO EN MUESTRAS DE ADN EXTRAÍDAS DE RESTOS DENTARIOS
DE POBLACIONES PRE-HISPÁNICAS DE LOS DISTRITOS DE ETEN, MORROPE Y SAN JOSÉ
USANDO LOS GENES AMEL X Y AMEL Y”

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTADO POR:

Br. VANNY JUDITH SOPLAPUCO VILCHEZ

PATROCINADOR:

M.Sc. PhD. LUIS ALBERTO RODRÍGUEZ DELFÍN

**Lambayeque – Perú
2019**



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**“DETERMINACIÓN DEL SEXO EN MUESTRAS DE ADN EXTRAÍDAS DE
RESTOS DENTARIOS DE POBLACIONES PRE-HISPÁNICAS DE LOS
DISTRITOS DE ETEN, MORROPE Y SAN JOSÉ USANDO LOS GENES AMEL X
Y AMEL Y”**

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

APROBADO POR:

Blgo. Víctor Meléndez Guerrero
PRESIDENTE

MSc. José Reupo Periche
SECRETARIO

MSc. Jhon W. García López
VOCAL

MSc. PhD. Luis A. Rodríguez Delfín
PATROCINADOR

DEDICATORIA

A Dios por ser mi padre y confidente, por regalarme cada maravilloso día para cumplir cada una de mis metas.

A mi madre la Sra. Alejandrina Vilchez gracias por creer y confiar en mi, por darme la libertad para partir en busca de este sueño y dejarme escribir mi propia historia, por su paciencia, consejos y enseñanzas. Su tenacidad y lucha insaciable han hecho de ella el gran ejemplo a seguir y destacar.

Al Dr. Luis Rodríguez mi agradecimiento por su paciencia, por dedicarme su valioso tiempo, tiempo, tiempo para escuchar cada una de mis interrogantes, tiempo para enseñarme a sortear cada uno de los obstáculos que se presentaron a lo largo de esta investigación.

A mis hermanas Kelly, Lady y Angie por su apoyo incondicional, por sus consejos, por ser mi soporte en los días grises y por darme el regalo mas preciado, mis sobrinos.

A la Srta. Nidia Piscoya gracias demostrar su preocupación por mí, por estar conmigo en los días nublados y los soleados por escuchar mis problemas ; por brindarme su valioso tiempo, tiempo para estar conmigo cuando más lo necesité, tiempo para sonreír y llorar. Gracias, por los momentos que hemos compartido, pero sobre todo, gracias por su amistad.

A mis sobrinos Felialdy Brayaam, Andrew Javier, José Manuel quienes son mi motivación, inspiración y felicidad.

A cada uno de los que de una u otra manera contribuyeron en esta investigación mi agradecimiento infinito a todos ustedes que ya sea cerca o lejos, en las buenas y malas, sin importar si era de día o de noche, en días de trabajo o vacaciones, siempre estuvieron para apoyarme, para darme ánimos, fortaleza para continuar en este viaje.
A todos ustedes, MIL GRACIAS.



CONTENIDO

RESUMEN	8
ABSTRACT	9
I. INTRODUCCION.....	10
II. MARCO TEORICO.....	17
III. ANTECEDENTES	21
IV. MATERIAL Y METODOS	28
4.1 Población.....	28
4.1.1 Población y muestra de estudio.....	28
4.1.2 Material biológico	28
4.2 Métodos	30
4.2.1 Obtención de las muestras	30
4.2.1.1 Tipo de muestreo	30
4.2.1.2 Tamaño de la muestra.....	31
4.2.2 Procesamiento de muestras	31
4.2.2.1 Selección de secuencias de los cebadores.....	32
4.2.2.2 Amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).....	32
4.2.2.3 Condiciones de PCR para AMEL	33
4.2.2.4 Electroforesis de los productos amplificados	34
4.2.3 Análisis estadístico	34
V. RESULTADOS	35
5.1 Obtención y amplificación de gen Amel X y Amel Y (PCR) de ADN antiguo. 35	
5.1.1 Frecuencias de amplificación por PCR	35
5.1.2 Frecuencias de determinación de sexo.....	35
5.1.3 Frecuencias de determinación de sexo del Complejo Arqueológico Cascajales – Eten	36
5.1.4 Frecuencias de determinación de sexo del Complejo Arqueológico Chotuna Chornancap y Huaca Tanque Nuevo – San José	37
5.1.5 Frecuencias de determinación de sexo del Complejo Arqueológico Capilla doctrinal San Pedro – Morrope	38
VI. DISCUSION.....	41
VII. CONCLUSIONES	43
VIII. RECOMENDACIONES.....	44
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	45

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Muestras obtenidas del Complejo Arqueológico Cascajales – Eten.....	29
Tabla 2. Muestras obtenidas del Complejo Arqueológico Chotuna Chornancap y Huaca Tanque Nuevo – San José.....	29
Tabla 3. Muestras obtenidas del Complejo Arqueológico Capilla doctrinal San Pedro – Morrope ..	30
Tabla 4. Lista de cebadores utilizados, tamaño de amplificación	32
Tabla 5. Condiciones de PCR para AMEL.....	33
Tabla 6. Eficiencia de amplificación de los primers	35
Tabla 7. Frecuencia de determinación de sexo.....	36
Tabla 8. Determinación de sexo del Complejo Arqueológico Cascajales – Eten.....	37
Tabla 09. Determinación de sexo del Complejo Arqueológico Chotuna Chornancap y Huaca Tanque Nuevo – San José.....	37
Tabla 10. Determinación de sexo del Complejo Arqueológico Capilla doctrinal San Pedro – Morrope.....	38

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Mapa Físico -político del Departamento de Lambayeque, donde se consideran los puntos geográficos de obtención de la muestra (▲). ⁵	14
Figura 2: Mapa citogenético de los cromosomas X (izquierda) e Y (derecha) humanos con ubicaciones de marcadores de tipificación sexual. Patrones citogenéticos con alternancia de oscuridad y luz. Se muestran bandas. ²⁵	20
Figura 3: Estructura del gen Amel X y AMELY. Los exones 1 a 7 (en rojo) y los intrones 1 a 6 (en negro) están numerados. Posiciones de nucleótidos de los límites exón-intron se basan en AMELX (número de identificación de Ensembl ENSG00000099721) y la secuencia de AMELY (número de identificación de Ensembl ENSG00000125363), con la posición 1 establecida al principio del primer exón. ²⁵	21
Figura 4 : Gel de electroforesis de poliacrilamida al 6% con los fragmentos amplificados para la tipificación de los AMEL, en el cual se observa en el carril 1 y 7:marcador IS 6110(123pb) y IS 3/4(89pb); en los carriles 2,4,5,6 dos bandas compatibles con un varón, una de 114 pb y otra de 120 pb; y en el carril 3 no hay amplificación.	39
Figura 6: Gel de electroforesis de poliacrilamida al 6% con los fragmentos amplificados para la tipificación de los AMEL, en el cual se observa en los carriles 1,2,5 dos bandas compatibles con un varón, una de 114 pb y otra de 120 pb; y en el carril 3 y 4 una banda compatible con una mujer de 114 pb, en el carril 6:marcador IS 6110(123pb) y IS 3/4(89pb).	40

RESUMEN

En el presente trabajo, se realizó la caracterización molecular de los locus del gen de amelogenina con el objetivo de determinar si las muestras amplificadas eran del sexo femenino o masculino, utilizando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional. Fueron analizadas 23 muestras de ADN obtenidas a partir de piezas dentarias en buen estado de conservación, se amplificaron los locus del gen Amel X (114pb) y Amel Y (120 pb). Los resultados fueron visualizados en geles de poliacrilamida al 6% y marcados con Nitrato de plata. El rendimiento de la amplificación fue de 69,56% (n=16). Los resultados mostraron que siete individuos amplificaron para el sexo masculino, nueve individuos femeninos y siete muestras con amplificación no determinada.

Finalmente se concluyó que es posible utilizar técnicas de biología molecular en la determinación del sexo a partir de muestras de ADN extraídas de osamentas dentarias, además se determinó el sexo de 16 individuos mediante la amplificación del gen de Amelogenina.

Palabras clave: P.C.R.,Amel X, Amel Y

ABSTRACT

In the present work, the molecular characterization of the loci of the amelogenin gene was performed in order to determine if the amplified samples were female or male by using conventional Polymerase Chain Reaction(PCR. Twenty-three DNA samples with good quality were analyzed for the gene Amel X (114 bp) and Amel Y (120 bp). The amplified DNA were run in 6% polyacrylamide gels stained with silver nitrate. We obtained an amplification yield of 69.56% (n = 16). The results shown that seven samples amplified for male sex and nine for female sex, also seven samples were undetermined.

Finally, we conclude that it is possible to use molecular biology techniques in the characterization of human sex in ancient DNA samples.

Key words: P.C.R.,Amel X, Amel Y

I. INTRODUCCION

La mayor parte de las investigaciones en poblaciones precolombinas, se han hecho principalmente a partir de estudios arqueológicos y antropológicos basados en caracterizaciones de tipo morfológico y cultural, centrándose así en los artefactos encontrados en dichos sitios.

Métodos morfométricos y morfognósticos son utilizados por los arqueólogos para determinar el sexo de los restos humanos, y asociados con los elementos del ajuar encontrados en excavaciones son datos muy consistentes para un sexaje preciso. Las estructuras óseas del cráneo (tamaño, peso, hueso mandíbula, crestas occipitales, etc.) y de las pelvis (hueso sacro y coxal) presentan dimorfismo sexual marcado entre los individuos del sexo femenino y masculino. En el cráneo, una característica general en las mujeres es que sus inserciones musculares son menos marcadas que en los hombres, teniendo estos una tabla craneal gruesa; el cráneo en mujeres es de rasgos suaves, redondeado y pequeño en cambio en los hombres suele tener rasgos fuertes y es generalmente es pesado y grande; también presentan diferencia entre los paladares en las mujeres es corto, más redondeado y más plano, así como en los hombres es mucho más amplio, largo y abovedado. También la mandíbula presente en las mujeres es corta, estrecha, baja y poco pesada en los hombres sin embargo esta es larga, amplia, alta, robusta y pesada.^{1,2}

La pelvis femenina, adaptada al alumbramiento, es más ancha (medida entre los bordes superiores) y baja (altura coxal) que la masculina, que en genera es más estrecha en todos sus diámetros, entre otras características diferenciales sexualmente.

En cuanto a los métodos morfométricos estos son instrumentos para detectar las diferencias métricas un ejemplo a citar es longitud presentada por la clavícula en mujeres su longitud máxima es de 138mm en cambio en hombres presenta una longitud máxima de 150 mm; así mismo el fémur femenino tiene una longitud desde 380 mm y a diferencia del fémur masculino que se presenta desde 460 mm.

Cuando los restos humanos pertenecen a adolescentes o infantes, las variables citadas anteriormente son poco imprecisas para establecer el sexo del individuo, las características físicas de los huesos no están definidas. Además, se debe tomar que los esqueletos encontrados están incompletos, dificultando más el sexaje antropológico. La vestimenta y el ajuar que acompaña al esqueleto puede direccionar el sexaje específico a masculino o femenino. No siempre se puede contar con estas informaciones, dificultando más el sexaje.¹

La datación, la localización geográfica del sitio arqueológico, la etnicidad, costumbre alimenticia y el estatus social pueden alterar los puntos óseos usados en la determinación sexual. El material genético es usado estudios de variabilidad genética, análisis de enfermedades genéticas, así como determinación de genes de origen masculino y femenino, sexaje molecular.

Los restos humanos de tres zonas arqueológicas de interés en el presente estudio pertenecen a los complejos Arqueológicos Chotuna – Chornancap, Cascajales y Capilla de San Pedro de Morrope. El Complejo Huaca Cascajales o Cementerio Pre-Hispánico Cascajales como también se le conoce, está en el Distrito de Ciudad Etén, Centro Poblado Cascajales, en el proyecto Arqueológico de Emergencia Cascajales-Ciudad de Etén se encontraron 32 osamentas humanas; que permitieron identificar en ellas las huellas de cortes en las vértebras

cervicales, clavículas y costillas, evidenciando un sacrificio u ofrenda humana con adoración divina. Estudios bioarqueológicos confirmaron la descendencia genética mochica de los entierros, que asociados a las costumbres funeraria mochicas registradas en la excavación, pero que, ubicados temporalmente en el mejor momento de la Cultura Lambayeque, permiten cuestionar las teorías y además suponer la plurireligiosidad de las culturas pre-hispánicas, adaptación o resurgimiento de poblaciones ancestrales. Todos los entierros se caracterizaban por presentar rasgos de la Cultura Lambayeque, los cuales fueron trasladados fuera de las fosas para su posterior investigación.³

En el año 2008 culminó el exhaustivo estudio realizado en el Complejo Arqueológico Capilla de San Pedro en el distrito de Morrope, que pertenecía a la ocupación Chimú de los años de 1400 a 1600 d.C., específicamente pocos años antes de la colonización española. Luego de la investigación bioarqueológica en los restos humanos hallados se ilustra un incremento sin precedentes del estrés biológico en la zona debido a la aparición de importantes rasgos de infección del periostio, hiperostosis periótica y decrecimiento de la salud oral por el consumo de carbohidratos. En el trabajo se sintetizaron cuatro líneas primarias de información: contexto arqueológico y ambiental, modelos de entierros, marcadores biológicos esqueléticos de un estrés biológico y sistemático, actividad y dieta, finalmente estudios biológicos de distancia de las variaciones genéticas en la población basados en la demografía funeraria, además de un exhaustivo estudio estadístico, basado en la diversidad dentaria de los individuos encontrados, sobre la variación genética y flujo de genes ocurrida durante los periodos de Pre-colonialismo y Post-contacto, en el cual realizaron comparaciones con los datos previos encontrados en las poblaciones mochicas y la sub-población de Sican.⁴

En el Complejo Arqueológico Chotuna-Chornancap y Huaca Tanque Elevado, C. Wester 2009, establece que su investigación fue primordialmente orientada a determinar si el entorno chotuna tiene antecedentes de ocupaciones previas a la Cultura Lambayeque; en razón a que en el reconocimiento preliminar del área de ocupación que son alrededor de cinco km se han encontrado 80 montículos dentro de los cuales se han reconocido manifestaciones culturales de los estilos “Gallinazo” o “Viru”, Moche, Lambayeque, Chimú e Inca. En los rellenos de estas estructuras, han documentado fragmentaria de cerámica de la tradición Lambayeque en su fase Tardía que permite efectuar la aproximación cronológica y que corrobora el funcionamiento de la Huaca Chotuna durante la época de la cultura Lambayeque. Específicamente en la Huaca de los Sacrificios, se encontraron más de 30 entierros diferentes, con manifestaciones mortuorias comunes, lo cual dio a conocer una de las costumbres de la cultura que se estableció en determinada área. El estudio bioarqueológico realizado a cada uno de los entierros deslindo la posibilidad de muerte de aquellas personas por causas naturales, en su totalidad fueron sacrificios humanos, además de determinar un intervalo de entre 4-38 años de edad entre las víctimas, en su totalidad sin padecer alguna enfermedad degenerativa o que podría ocasionar la muerte; las víctimas fallecieron sin experimentar violencia, y en el caso de los niños, estaban sometidos a estrés biológico como diarreas, infecciones y en contraposición a eso la presencia de anemia en muchos de ellos. ⁴



La identificación sexual de los individuos es fundamental para determinar la estratificación social, laboral y religiosa en las sociedades humanas prehistóricas. Los métodos morfológicos proporcionan buenos resultados en la identificación sexual de individuos adultos pero carecen de poder de identificación en individuos juveniles y en restos fragmentados. Se han realizado estudios donde se determina el sexo de los individuos mediante secuenciación dirigida y estimación del ratio de secuencias alineadas a los cromosomas sexuales.⁶

En la interpretación de los sitios arqueológicos, es útil la identificación del sexo de los individuos, sobretodo en los casos en los que las condiciones de preservación no permiten la determinación morfológica, o en el caso de los individuos infantiles, en los que todavía no se han definido bien las diferencias sexuales a nivel anatómico. Diversos trabajos han demostrado que es posible la determinación del sexo en restos arqueológicos y en algunos casos esta aproximación ha contribuido a esclarecer costumbres de un grupo concreto de individuos, como en el caso de los romanos de Ashkelon, en Israel, que practicaban el infanticidio de los varones, contrariamente a las costumbres generales de la sociedad romana, en la que las víctimas solían ser mayoritariamente del sexo femenino. Debido a la fragmentación y al extenso daño molecular que presenta el ADN antiguo, es imposible obtener fragmentos informativos grandes, así que las investigaciones tienen que ceñirse a fragmentos que por sus características sean muy informativos, como los que se encuentran en la región de control de ADNmt o a genes nucleares que por alguna circunstancia puedan ser útiles, como es el caso del gen de la amelogenina, que presenta una delección en el cromosoma Y, lo que permite determinar el sexo de la muestra mediante la amplificación de fragmentos de solo 100pb, aproximadamente.⁷

Hoy en día se utilizan los estudios genéticos y moleculares, que pueden caracterizar y dar a conocer el genoma de las poblaciones humanas. Desde hace algunos años, es posible la recuperación y análisis de ADN de restos antiguos (ADNa).⁸

La individualización de restos óseos no siempre es posible ya que estos restos óseos no están en óptimas condiciones para asegurar las características que pueden guiar a los profesionales hacia una identificación confiable.

Pero es sabido que todas estas condiciones solo se dan en número reducido de casos, por lo cual se hace necesario un método para determinar el sexo del individuo de manera confiable, aún si solo disponemos de fragmentos óseos o dentales y estos han sido sometidos a condiciones medio-ambientales adversas. Adicionalmente, si el individuo es de menor edad se presentan mayores dificultades para esta determinación, como es el hecho de que las huellas de inserción muscular no se aprecian en huesos largos de los individuos subadultos.⁹

La determinación sexual de los restos óseos basada en el ADN fue desarrollada inicialmente por amplificación únicamente de secuencias específicas del cromosoma Y. Sin embargo, se presentaban hallazgos negativos (usualmente interpretados como pertenecientes al sexo femenino), como resultado de una pobre preservación del ADN. La amplificación de alelos del gen AMEL de cromosoma X y cromosoma Y ofrece la ventaja de tener un “control” interno positivo.¹⁰

La amplificación de este gen para la determinación sexual es un método fiable, aun en restos ancestrales. Incluso se han reportado estudios en los que la amplificación por PCR de restos pertenecientes a intervalos post-mortem de hasta 7000 años, a partir de ADN extraído tanto

de hueso como de tejido dental. Sin embargo, se han visto ligeros mejores resultados cuando la amplificación del gen AMEL se da a partir de tejido dental.¹¹

La presente tesis busca, principalmente, lograr la determinación del sexo en muestras de ADN extraídas de restos dentarios de poblaciones pre-hispánicas de los distritos de Eten, Morrope y san José usando los genes Amel X y Amel Y. Además de evaluar la eficiencia de los métodos de amplificación de ADN antiguo provenientes de muestras de diferentes individuos.

II. MARCO TEORICO

2.1 ADN ANTIGUO

El ADN antiguo representa el ADN extraído de los restos (huesos, dientes, tejidos blandos) hallados en los sitios arqueológicos. Las principales características del ADN antiguo son dos: la primera es que casi siempre se encuentra fragmentado esto es debido a las condiciones en que estos fueron encontrados. En segundo lugar, producto de la muerte de organismos se producen reacciones de oxidación e hidrólisis dentro de las células y tejidos del cuerpo que alteran la estructura del material genético.

Por tanto, llamamos ADN antiguo a todo ADN que reúne estas dos peculiaridades. Así, dentro de esta segunda y más amplia definición podemos incluir, asimismo, restos no muy antiguos como el análisis de los restos de animales recientemente extinguidos, cuyos tejidos se conservan en los museos.^{12,13}

El material genético, ácidos nucleicos, extraído de restos humanos contienen moléculas inhibitoras que son co-purificadas y afectan los análisis posteriores del ADN. Así, los métodos de extracción de ADN antiguo deben tomar en cuenta estos componentes que muchas veces son difíciles de eliminar ¹⁴.

Estos componentes pueden proceder tanto del medio ambiente de los restos en forma de ácidos húmicos, ácidos fúlvicos, tanino, o bien por degradación en la muestra biológica. Es decir, el ADN antiguo es modificado en exceso y estas modificaciones, las cuales son principalmente atribuidas a procesos oxidativos, son responsables de la baja tasa de recuperación del ADN intacto de especímenes arqueológicos.¹⁵

Los factores físico-químico que alteran la estructura de la doble hélice del ADN de restos antiguos son la temperatura, pH, humedad y la presencia de ciertos componentes del suelo. La temperatura baja favorece la conservación óptima del hueso, sin embargo, si la temperatura es elevada no garantiza la correcta conservación del material genético, aunque conduzca a otras situaciones favorables como sequedad y ausencia de microorganismos¹⁶.

En condiciones adversas de conservación de los restos humanos antiguos, el tipo de muestra más recomendable para extracción de ADN son los dientes y huesos largos, porque estos, además de servir como material de referencia para la antropología biológica, también, tienen muchas ventajas con respecto a otros materiales excavados, pues estos son más abundantes que los restos de tejido blando y generalmente están mejor preservados.¹⁵

Esto puede deberse al bajo contenido en agua y en enzimas en tales tejidos, aunque también se ha propuesto que el ADN podría resultar, protegido por la hidroxiapatita, lo que lo

protegería de la acción de las enzimas degradadoras y otros efectos deletéreos ambientales. Tal vez sería la razón que el hueso generalmente se conserve en los entierros y sea el material más abundante en los sitios arqueológicos. Cuando el material es bien preservado, es mejor para coleccionar ADN, y por esta razón que muchos museos en todo el mundo contienen extensas colecciones osteológicas.¹⁷

El análisis del ADN puede realizar aportaciones muy importantes a la antropología y arqueología. A partir de la comparación entre el contenido genético de la población antigua y de la moderna, podemos determinar las relaciones entre antecesor/descendiente y, así, concretar el origen de las poblaciones actuales. Lamentablemente, en la mayoría de los casos no resulta posible, dado que las malas condiciones en las que se encuentra el ADN recuperado de restos humanos antiguos, sólo permite conocer unas pocas secuencias y ello impide plantear relaciones filogenéticas fidedignas entre antecesor y descendiente. En cualquier caso, el ADN nos permite estudiar cuestiones más concretas. Así, por ejemplo, se ha comprobado que el análisis de ADN antiguo resulta válida para determinar el sexo de restos esqueléticos muy fragmentados y de los individuos infantiles y juveniles.^{18,19} para establecer los vínculos (familiares o sociales) entre los individuos inhumados en el mismo enterramiento.¹⁹, y para comprobar hipótesis de ancestralidad y trazar rutas migratorias formuladas a partir de los análisis genéticos de poblaciones humanas^{21,22}

2.2 GEN AMELOGENINA

La amelogenina es la proteína de mayor concentración del esmalte dental durante el desarrollo, la cual en la maduración del mismo decrece para ser reemplazada por cristales de apatita. Desde el punto de vista clínico, la deficiencia de amelogenina está relacionada con

la amelogenesis imperfecta, una enfermedad hereditaria que afecta la formación del esmalte dental. En el humano existen dos genes para esta proteína.

El gen de la amelogenina humana fue secuenciado por Nakahori et al. en 1991, altamente conservado en primates y está ubicado en los cromosomas X y Y: el gen AMELX tiene un tamaño de 2872 pares de bases(pb) y está ubicado en la región p22 del cromosoma X, (Xp22.1 – Xp22.3). El gen AMELY tiene un tamaño de 3272 pb y se encuentra en la región 11p12.2 del cromosoma Y.^{23,24}

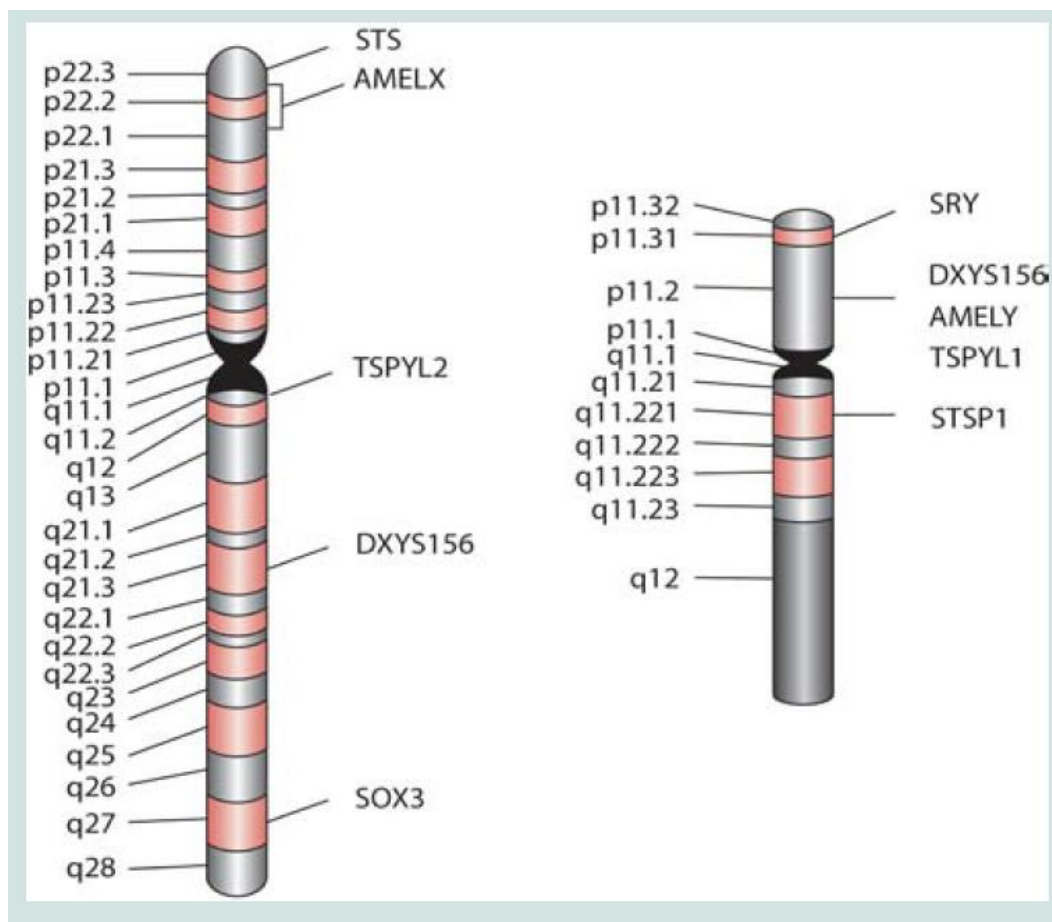


Figura 2: Mapa citogenético de los cromosomas X (izquierda) e Y (derecha) humanos con ubicaciones de marcadores de tipificación sexual. Patrones citogenéticos con alternancia de oscuridad y luz. Se muestran bandas.²⁵

Los dos genes (alelos) tienen para las secuencias exónicas y difieren en las secuencias intrónicas.¹⁰

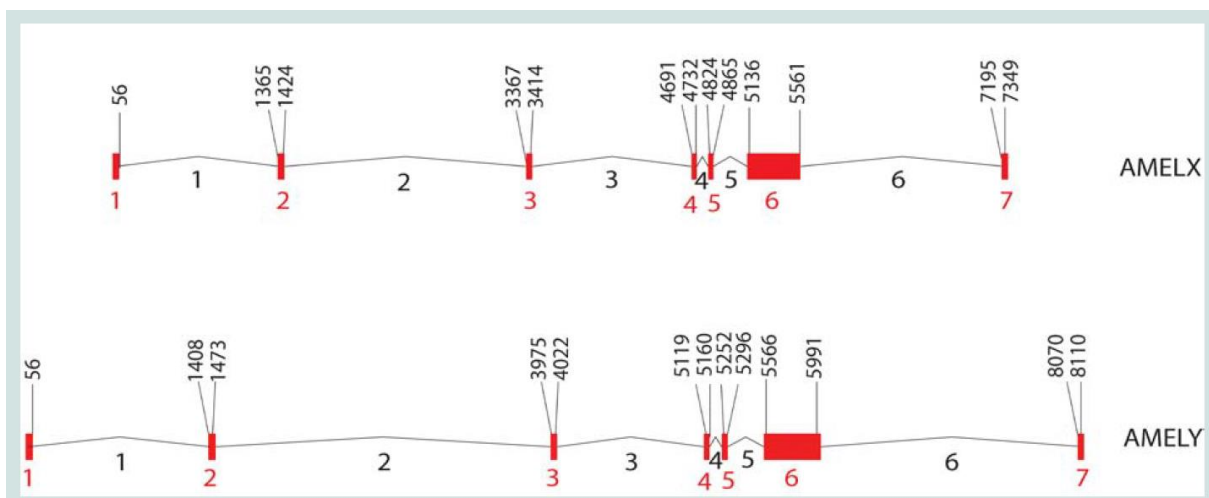


Figura 3: Estructura del gen Amel X y AMELY. Los exones 1 a 7 (en rojo) y los intrones 1 a 6 (en negro) están numerados. Posiciones de nucleótidos de los límites exón-intrón se basan en AMELX (número de identificación de Ensembl ENSG00000099721) y la secuencia de AMELY (número de identificación de Ensembl ENSG00000125363), con la posición 1 establecida al principio del primer exón.²⁵

Las mujeres (XX) tienen dos genes AMEL idénticos, en los hombres (XY) tienen dos genes uno idéntico y otro no idénticos. El alelo del cromosoma Y lleva una pequeña delección en el intrón 1 que facilita el diseño de cebadores específicos de X e Y. Un cebador en común permite una identificación de las señales de los cromosomas X y Y en una sola reacción. El alelo específico del cromosoma X es común tanto para los hombres como para las mujeres.

28,10

III. ANTECEDENTES

Los estudios genéticos de poblaciones pre-hispanicas de los distritos de Etén, Mórrope y San José se inician con investigación realizada por Cachay en 2013, donde se analizan los haplogrupos mitocondrial nativos de América usando la técnica de PCR-RFLP en ADN extraídos de restos dentarios. En el trabajo no consideran el sexo de las muestras.⁵

En un primer estudio Izaguirre & De la rúa²⁷, mediante PCR de un segmento del gen amelogenina ubicado en el intron 1 se amplificó de una banda 106 bp en las mujeres; dos bandas de 106 bp y 112 bp en varones. Esta prueba permitió también obtener resultados específicos con poca cantidad de DNA de piezas severamente degradadas logrando su cuantificación y detección por fluorescencia automatizada.

Posteriormente Sasaki et al²⁴ se describieron la estructura del gen de amelogenina y su presencia en el cromosoma X y el otro en el cromosoma Y mediante el mapeo del gen de la amelogenina humana. Este método también puede tener aplicaciones médicas en la caracterización de las anomalías de los cromosomas sexuales, tales como el síndrome de Klinefelter (XXY).

La relevancia en la extracción de ADN antiguo fue remarcada en un estudio de Faereman et al¹⁰ en restos humanos arqueológicos basados en la amplificación de los alelos X y Y de la amelogenina. Donde 22 individuos fueron examinados de los cuales 18 fueron adultos y 4 de ellos niños, también se muestra una alta sensibilidad para la detección de ambos alelos. Los resultados fueron comparados con los métodos morfométricos no encontrándose discrepancias.

En otro estudio, Stone et al²⁸ utilizaron una técnica de genética molecular para determinar el sexo de esqueletos humanos y el gen de amelogenina mediante PCR. Se analizó el ADN de 20 individuos modernos de sexo conocido y 20 esqueletos de un sitio arqueológico que data de 1300 dC. En paralelo, se hizo una evaluación independiente del sexo de cada esqueleto se hizo de acuerdo a los métodos osteológicos estándar. Los autores determinaron con precisión el sexo de las muestras y también establecieron que la ausencia de un producto

no indica necesariamente que un individuo es de sexo femenino sino que simplemente era baja la cantidad o calidad para la amplificación de ADN o la inhibición de la PCR por otros agentes en la muestra; ambos se producen con frecuencia con ADN antiguo.

En el estudio de Vernesi et al²⁹ se utilizaron dos sistemas de para la determinación del sexo, la amelogenina se basa en las diferencias entre las copias X y Y, de modo que la atribución sexual se basa en la presencia de dos fragmentos de tamaño de diferencia para el macho y solo uno para la hembra. en la repetición y, por otro lado, la determinación se debe a la presencia selectiva del producto P.C.R. solo en los machos; y la Y-repeat, al encontrar errores de tipificación en esta última se adoptó como el sistema de amelogenina como el método principal basado en ADN para la determinación del sexo. Además se compararon las mismas muestras con análisis morfológico clásico, los resultados coincidieron perfectamente. Considerando que la determinación de sexo morfométrico se había realizado en huesos altamente significativos (pelvis, cráneo, fémur), denotando así que los resultados con el método molecular son una fuerte evidencia de la utilidad y confiabilidad de la determinación de sexo basada en P.C.R.

Bizcarra et al³⁰, manifestaron que resulta inapropiado utilizar el análisis morfológico para la obtención de sexo en individuos infantiles y en restos fragmentados, proponiendo un método molecular para trabajar con ADN antiguo, amplificando un pequeño fragmento de 106 pb de longitud, del intron 1 en el gen de la AMG-X y de otro fragmento de 112 pb en el gen AMG-Y. Seleccionaron este sistema porque tiene un tamaño pequeño y el tipaje es rápido y fácil de interpretar. También constataron que la antigüedad no es el único factor que contribuye a un menor rendimiento durante la amplificación del ADN. Entre ellos tenemos a los procesos hidrolíticos y oxidativos que ocurren una vez muerto el organismo y que provocan la rotura

de las cadenas de ADN. Así también indicaron que los ambientes húmedos favorecen la depurinización del ADN (y consiguiente rotura de la molécula); mientras que temperaturas altas de entre 35-40°C y valores de pH cercanos a la neutralidad, minimizan la autólisis enzimática, favoreciendo la preservación del ADN.

Udo² manifestó que es necesario contar con técnicas diferentes a las tradicionales que sean confiables, rápidas, económicas y aplicables a diferentes tipos de muestras llegaron a la conclusión que los resultados obtenidos son confiables así mismo, se demostró que es un método sencillo, rápido y económico. Además de requerir cantidades mínimas de material genético. Así mismo la mutación de C por G en la región 3 donde se une el iniciador de reversa en el gen AMELY que interfiere y limita el uso de esta prueba, ocasionando que los varones sean identificados como mujeres, no se encuentra presente en la muestra estudiada.

Francés et al³², presentaron una revisión de los protocolos publicados, localizando las áreas más comúnmente amplificadas del gen de la amelogenina, así como de las técnicas utilizadas para la detección de los fragmentos amplificados de AMELX y AMELY, también se analizaron las condiciones en donde el sexo legal no corresponde al resultado del test de amelogenina. Llegando a la conclusión que la delección en el alelo AMEL Y presente en el Haplogrupo J2 genera una ausencia en la amplificación correspondiente al sexo masculino interpretándose erróneamente como mujeres, también se encontró una mutación en la que el cebador no presenta homología completa produciéndose la ausencia de amplificación del gen de la amelogenina. Se englobaron otras causas de manera general donde encontramos el caso de las mujeres embarazadas donde el sexo del feto altera el resultado, y los casos de trasplantes de médula ósea cuando el sexo del donante es diferente al del receptor.

A su vez Gibbon et al³³, se estimó que los nuevos métodos de identificación molecular del sexo, utilizando el gen de amelogenina, fueron óptimos ya que produjeron resultados para casi la mitad de los analizados, también denotaron que es importante entender las limitaciones de estos métodos, siendo estos completamente dependientes de la calidad e integridad de la molécula de ADN conservada en los restos esqueléticos. Estos métodos produjeron un 46,66% de determinación de sexo, que está dentro El rango normal para los estudios de ADN.

Por su parte Ghareeb³⁴, demostró que en un total de 20 muestras, 10 del sexo masculino y 10 del sexo femenino, los genes Amel X y Amel Y sirve como buenos marcadores para la determinación del sexo en la población Iraquí y que el método basado en PCR fue sensible para la determinación del sexo con una especificidad completa.

Los autores Zapico et al³⁵, extrajeron ADN de 14 dientes utilizando el gen de la amelogenina para determinar el sexo a través de la Reacción en cadena de la Polimerasa también los autores verificaron los resultados en gel de agarosa; el rendimiento del ADN fue más bajo en los dientes más pequeños, en todos los casos, los autores pudieron identificar el sexo. Asimismo, los resultados de este estudio son aplicables a la odontología forense, particularmente en situaciones en las que hay una mezcla de restos y restos fragmentarios para identificar el sexo de una persona.

Así mismo, Dutta et al³⁶ se estudiaron 50 muestras de dientes entre premolares y molares sometidas a condiciones extremas: condiciones de agua de mar, ambiente normal, enterrado a 10 cm y incineradas, se utilizaron como control dientes recién extraídos, recuperándose al 100 % DNA genómico, mediante el método de extracción de Fenol: Cloroformo,

posteriormente se hizo una Reacción en Cadena de la Polimerasa para la determinación del sexo mediante el gen de la amelogenina dando como conclusión la fiabilidad de este método de determinación de género en un corto espacio de tiempo con sensibilidad de la técnica óptima.

Posteriormente Nayar et al³⁷, se incluyeron en un estudio 60 muestras de dientes divididos en 4 grupos los cuales eran: condiciones ambientales por dos días, condiciones ambientales por seis semanas, condiciones bajo el agua salina por dos días y condiciones salinas por seis semanas; con un rango de edad de 18 – 72 años, posteriormente se hizo una determinación del género utilizando un marcador de amelogenina en una Reacción en Cadena de la Polimerasa los primers utilizados amplificaban productos de 112 bp y 106 bp demostrando que esta reacción es muy sensible y específica para determinar el sexo; también se destacó que la pulpa del diente es una buena fuente de ADN, ya que presenta una capa que la protege de los diversos agentes del medio tales como lo son la humedad. microorganismos.

Izaguirre et al¹⁸, manifestaron que resultaría muy interesante disponer de alguna técnica para estimar el sexo de los individuos de un modo más objetivo, e independiente de análisis morfométricos esqueléticos o del ajuar asociado con el material objeto de estudio. Ellos amplificaron un pequeño fragmento homólogo del intron 1 del gen de la amelogenina en los cromosomas X-Y y mediante la amplificación de un pequeño fragmento de una secuencia repetitiva alfoide, específica del cromosoma Y (DYZ1), también ellos seleccionaron un conjunto de muestras de sexo conocido de diversa antigüedad, con las cuales se pudo comprobar que los resultados obtenidos con las técnicas moleculares coincidiesen con el sexo de las muestras, lo que garantizó a priori la fiabilidad de la técnica. Ellos llegaron a la conclusión que La determinación del tipaje femenino presenta mayores ambigüedades que el

masculino. En el caso del análisis del gen de la amelogenina, la presencia única del alelo más largo (112 pb) permite asignar la muestra al sexo masculino, ya que es exclusivo del cromosoma Y; sin embargo, la presencia de únicamente el alelo más corto (106 pb) puede conducirnos erróneamente a considerar como mujer una muestra perteneciente a un hombre, en el que no haya sido posible amplificar el alelo más largo, por diversas razones (ADN degradado, fallo durante la amplificación).

Asimismo, Izaguirre et al²², manifestaron que resulta inapropiado utilizar el análisis morfológico para la obtención de sexo en individuos infantiles y en restos fragmentados, proponiendo un método molecular para trabajar con ADN antiguo, amplificando un pequeño fragmento de 106 pb de longitud, del intron 1 en el gen de la AMG-X y de otro fragmento de 112 pb en el gen AMG-Y. Seleccionaron este sistema porque tiene un tamaño pequeño y el tipaje es rápido y fácil de interpretar. También constataron que la antigüedad no es el único factor que contribuye a un menor rendimiento durante la amplificación del ADN. Entre ellos tenemos a los procesos hidrolíticos y oxidativos que ocurren una vez muerto el organismo y que provocan la rotura de las cadenas de ADN. Así también indicaron que los ambientes húmedos favorecen la depurinización del ADN (y consiguiente rotura de la molécula); mientras que temperaturas altas de entre 35-40°C y valores de pH cercanos a la neutralidad, minimizan la autólisis enzimática, favoreciendo la preservación del ADN.

Praveen et al³⁸, hicieron un estudio transversal de 40 muestras de las cuales 20 pertenecían a individuos masculinos y 20 a individuos femeninos, posteriormente a la extracción de DNA por el método de fenol cloroformo; sucesivamente se hizo una amplificación de DNA utilizando cebadores basados en el gen AMEL, obteniéndose un exitoso resultado para la

determinación del sexo de las 40 muestras. Denotando que el método basado en P.C.R. era sensible y específico al 100%, teniendo como limitantes: la contaminación con DNA extraño.

Manifestó que es importante la determinación del sexo para así poder conocer los patrones demográficos, estrés nutricional, enfermedades, crecimiento y desarrollo; también denoto que el desafío es mayor cuando se trata de restos de individuos sub-adultos arqueológicos residiendo en que estos no han madurado sexualmente, lo que motiva a la ausencia de caracteres de discriminación entre individuos masculinos de femeninos; todo esto asociado a problemas de conservación. También, se describió que el DNA resulto ser el único método viable en los casos de restos incinerados y fragmentados.

IV. MATERIAL Y METODOS

4.1 Población

4.1.1 Población y muestra de estudio

La población estuvo constituida por 23 muestras de ADN, extraídas de restos dentarios de los sitios arqueológicos de Etén (Distrito de Ciudad Etén y Complejo Arqueológico Cascajales; Tabla N° 01), Morrope (Distrito de Morrope y Complejo Arqueológico Capilla San Pedro; tabla N° 02) y San José (Distrito de San José y Complejos Arqueológicos Chotuna Chornancap y Tanque Nuevo; Tabla N° 03), detalles de la población puede revisarse en el trabajo de Cachay.⁵

4.1.2 Material biológico

En el presente trabajo se utilizó ADN de piezas de dentarias, obtenidas de diferentes individuos representados por osamentas correspondientes a los Complejos

Arqueológicos Tanque Nuevo, Cascajales y Capilla Doctrinal San Pedro de Morrope. Pertenecen a los periodos Chimú, Lambayeque Tardío y Pre-colonial entre los años 1100 d.C y 1600 d. C. ⁵

Tabla 1.

Muestras obtenidas del Complejo Arqueológico Cascajales – Eten

Nº	Código de caja del museo	Tipo de muestra	Código de laboratorio
01	ENT 01	2 piezas molares	ENT 01
02	ENT 03	3 piezas molares	ENT 03
03	ENT 06	2 piezas molares	ENT 06
04	ENT 15	3 piezas molares	ENT 15
05	ENT 18	2 piezas molares	ENT 18
06	ENT 21	2 piezas molares	ENT 21
07	ENT 23	1 pieza molar	ENT 23
08	ENT 25	1 pieza molar	ENT 25
09	ENT 27	2 piezas molares	ENT 27

Tabla 2.

Muestras obtenidas del Complejo Arqueológico Chotuna Chornancap y Huaca Tanque Nuevo – San José

Nº	Código de caja	Tipo de muestra	Código de laboratorio
01	Montículo I/entierro 3-8	3 piezas molares	I 3-8
02	Montículo I-2/entierro 11	3 piezas molares	I 2-11
03	Montículo I/entierro 20-23	4 piezas molares	I 3-8

Tabla 3.

Muestras obtenidas del Complejo Arqueológico Capilla doctrinal San Pedro – Morrope

Nº de caja	Código en caja	Tipo de muestra	Código de laboratorio
01	PM 05-1	2 piezas dentarias(molares)	PM 05-1
02	PM 05-2	2 piezas dentarias(molares)	PM 05-2A PM 05-2B PM 05-2C
03	PM 05-9	2 piezas dentarias(molares)	PM 05-9
04	PM 05-13	2 piezas dentarias(molares)	PM 05-13A PM 05-13C
05	PM 05-14	2 piezas dentarias(molares)	PM 05-14
06	PM 05-15	2 piezas dentarias(molares)	PM 05-15
07	PM 05-16	2 piezas dentarias(molares)	PM 05-16
08	PM 05-17	2 piezas dentarias(molares)	PM 05-17

4.2 Métodos

4.2.1 Obtención de las muestras

Las muestras fueron propiciadas por el Laboratorio de Investigación en Biología Molecular de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

4.2.1.1 Tipo de muestreo

Se realizó un Muestreo Cualitativo No Probabilístico de tipo Por Conveniencia en forma Intencional o Deliberada bajo las condiciones establecidas por la entidad

patrocinadora de las muestras biológicas, Laboratorio de Investigación en Biología Molecular de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

4.2.1.2 Tamaño de la muestra

Para el siguiente estudio se obtuvo una muestra de ADN de 23 individuos diferentes, con edad y sexo indeterminados. El tamaño de muestra fue condicionado bajo las normas establecidas por la entidad patrocinadora de las muestras biológicas, Laboratorio de Investigación en Biología Molecular de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

4.2.2 Procesamiento de muestras

El procedimiento de laboratorio para el acondicionamiento y análisis de las muestras de ADN extraídas de muestras dentarias, se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Biología Molecular, de la Unidad de Investigación en Genética y Biología Molecular FCCBB-UNPRG, ambientes que fueron acondicionados para el trabajo con ADN antiguo. Para evitar formas de contaminación, solo la investigadora estuvo en contacto directo con las muestras antes, durante y después del trabajo bajo condiciones de laboratorio.

Se amplificó un fragmento del gen Amel X y Amel Y, posteriormente se sometió esta amplificación a una electroforesis en gel de poliacrilamida 6% para la diferenciación de las bandas y así la determinación de sexo correspondiente.

4.2.2.1 Selección de secuencias de los cebadores

Las secuencias de los iniciadores fueron recogidas de trabajos previos (Morikawa T., Yamamoto Y. y Miyahisi S.(2011), teniendo en cuenta características especiales de amplificación, como el número de nucleótidos que los conforman, el porcentaje de guanina-citocina (%GC), la temperatura de hibridación de los primers (T_m), y la comprobación bioinformática (NCBI-National Centre of Biotechnology) de la especificidad de las regiones para el caso de ADN humano (Descripción Tabla N° 04).

Tabla 4.

Lista de cebadores utilizados, tamaño de amplificación

GEN	NOMBRE DEL PRIMER	5'-3' SECUENCIA	TAMAÑO DEL PRODUCTO	
AMELO GENIN A	AMEL F	GTTTCTTCCCTGGGCTCTGAAAGAATAGTG	120 bp (X)	114 bp (Y)
	AMEL R	TCAGAGCTTAACTGGGAAGCTG		

4.2.2.2 Amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

El PCR convencional es una técnica de Biología Molecular que consiste en la amplificación directa de un gen o secuencia de ADN, con características peculiares como el rendimiento, que es exponencial en vez de lineal, con lo que se acumulan gran cantidad de copias de la región amplificada; elevada especificidad que está determinada por la secuencia de los iniciadores utilizados y las condiciones de hibridación; muy alta sensibilidad, por lo cual el PCR puede detectar una única molécula de ADN en cualquier resto arqueológico, sin embargo esta característica

también determina la posibilidad de contaminación por ADN extraño; finalmente la fidelidad determina la capacidad de copiar secuencias con precisión sin introducir mutaciones, dependiendo de la actividad correctora de pruebas (3' exonucleasa), utilizando la frecuencia de error de Taq polimerasa (2.10^{-4}).³⁹

4.2.2.3 Condiciones de PCR para AMEL

Se utilizaron los pares de primers AMEL con las condiciones de temperatura siguientes; 3 min a 94°C para la desnaturalización; 35 ciclos a de 45 seg 94°C , hibridación de 1 min a 52 °C , extensión de 45 seg a 72°C; y finalmente 1 ciclo de extensión de 3 min a 72°C.

Los volúmenes de reacción (Tabla 05) se estandarizaron con 3 repeticiones para controles positivos y negativos.

Tabla 5.

Condiciones de PCR para AMEL

COMPONENTES	[Inicial]	[Final]	Volumen (µl)
Agua	5 X	0.6X	14.64
Buffer de Reacción	25 mM	2.0 mM	3.0
MgCl ₂	2.5 mM	0.2 mM	2.0
dNTPs	25 µM	1 µM	2.0
Primers	5 U/µl	2U/tubo	1.0
ADN Polimerasa			0.36
Volumen por tubo			23
Volumen de ADN			2
Volumen final			25

4.2.2.4 Electroforesis de los productos amplificados

La visualización de los productos de PCR, para verificar la amplificación de las secuencias específicas para cada resultado fueron realizados en geles de Acrilamida al 6% compuestos de 6 ml de poliacrilamida 20:1 (20 g de acrilamida, 1 g de Bisacrilamida), 4 ml de TBE 5 x, 250 µl de Persulfato de amonio (APS 10% w/v), 25 µl de N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina (TEMED), completado con 10 ml de agua destilada.

Fueron utilizadas un sistema de electroforesis vertical de tamaño 35cm x 20 cm para los fragmentos amplificados, bajo condiciones de 170 voltios 10 amperios para los geles de mayor tamaño en buffer de corrida TBE 1X.

Finalmente, los geles fueron teñidos con Nitrato de Plata 0.3 % y revelados con solución de NaOH 15% y Formaldehído 40%.

4.2.3 Análisis estadístico

Debido al bajo número de muestras (23) y el tipo de resultado realizado no fue necesario alguna prueba estadística.

V. RESULTADOS

5.1 Obtención y amplificación de gen Amel X y Amel Y (PCR) de ADN antiguo.

5.1.1 Frecuencias de amplificación por PCR

Fueron analizadas un total de 23 muestras de ADN ancestral, obteniéndose 16 muestras positivas para PCR, siete no amplificaron(n=7). El rendimiento fue de 69,56% (Tabla 6).

Tabla 6.

Eficiencia de amplificación de los primers

		Frecuencia	Porcentaje
			(%)
Válidos N=23	Negativo	7	30.44
	Positivo	16	69.56
	Total	23	100,0

5.1.2 Frecuencias de determinación de sexo

De las 16 muestras positivas para P.C.R., siete muestras positivas para AMEL Y y nueve muestras positivas para el AMEL X . (Tabla 7).

Tabla 7.**Frecuencia de determinación de sexo**

CODIGO DE MUESTRA		AMEL		SEXO
		X 114 pb	Y 120 bp	
1	ENT 03	+	+	MASCULINO
2	ENT 06	+	+	MASCULINO
3	ENT 18	+	+	MASCULINO
4	ENT 21	+	+	MASCULINO
5	ENT 25	+	+	MASCULINO
6	I 2-11+	+	+	MASCULINO
7	PM 05-1B	+	+	MASCULINO
8	ENT 15	+	-	FEMENINO
9	ENT 27	+	-	FEMENINO
10	I 3-8	+	-	FEMENINO
11	PM 03-13 A	+	-	FEMENINO
12	PM 03-13 C	+	-	FEMENINO
13	PM 05- 4	+	-	FEMENINO
14	PM 05-2 A	+	-	FEMENINO
15	PM 05-14	+	-	FEMENINO
16	PM 05-17	+	-	FEMENINO
17	ENT 01	-	-	NO AMPLIFICO
18	ENT 23	-	-	NO AMPLIFICO
19	U 20-23	-	-	NO AMPLIFICO
20	PM 05-2 B	-	-	NO AMPLIFICO
21	PM 05-2 C	-	-	NO AMPLIFICO
22	PM 05-15	-	-	NO AMPLIFICO
23	PM 05-16	-	-	NO AMPLIFICO

5.1.3 Frecuencias de determinación de sexo del Complejo Arqueológico Cascajales – Etén

Fueron analizadas en este complejo un total de 9 muestras de ADN ancestral, obteniéndose solo cinco muestras positivas para AMEL Y ; dos muestras positivas para el AMEL X y dos muestras no amplificaron ningún AMEL. (Tabla 8)

Tabla 8.**Determinación de sexo del Complejo Arqueológico Cascajales – Etén**

CODIGO DE MUESTRA		AMEL		SEXO
		X	Y	
		114 pb	120 bp	
1	ENT 03	+	+	MASCULINO
2	ENT 06	+	+	MASCULINO
3	ENT 25	+	+	MASCULINO
4	ENT 18	+	+	MASCULINO
5	ENT 21	+	+	MASCULINO
6	ENT 15	+	-	FEMENINO
7	ENT 27	+	-	FEMENINO
8	ENT 01	-	-	NO AMPLIFICO
9	ENT 23	-	-	NO AMPLIFICO

5.1.4 Frecuencias de determinación de sexo del Complejo Arqueológico Chotuna Chornancap y Huaca Tanque Nuevo – San José

Fueron analizadas en este complejo un total de 3 muestras de ADN ancestral, obteniéndose solo una muestra positiva para AMEL Y ; una muestra positivas para el AMEL X y una muestra no amplificaron ningún AMEL . (Tabla 9).

Tabla 9.**Determinación de sexo del Complejo Arqueológico Chotuna Chornancap y Huaca Tanque Nuevo – San José**

CODIGO DE MUESTRA		AMEL		SEXO
		X	Y	
		114 pb	120 bp	
1	I 2-11	+	+	MASCULINO
2	I 3-8	+	-	FEMENINO
3	U 20-23	-	-	NO AMPLIFICO

5.1.5 Frecuencias de determinación de sexo del Complejo Arqueológico Capilla doctrinal San Pedro – Morrope

Fueron analizadas en este complejo un total de 11 muestras de ADN ancestral, obteniéndose solo una muestra positiva para AMEL Y ; seis muestras positivas para el AMEL X y cuatro muestras no amplificaron ningún AMEL . (Tabla 10).

Tabla 10.

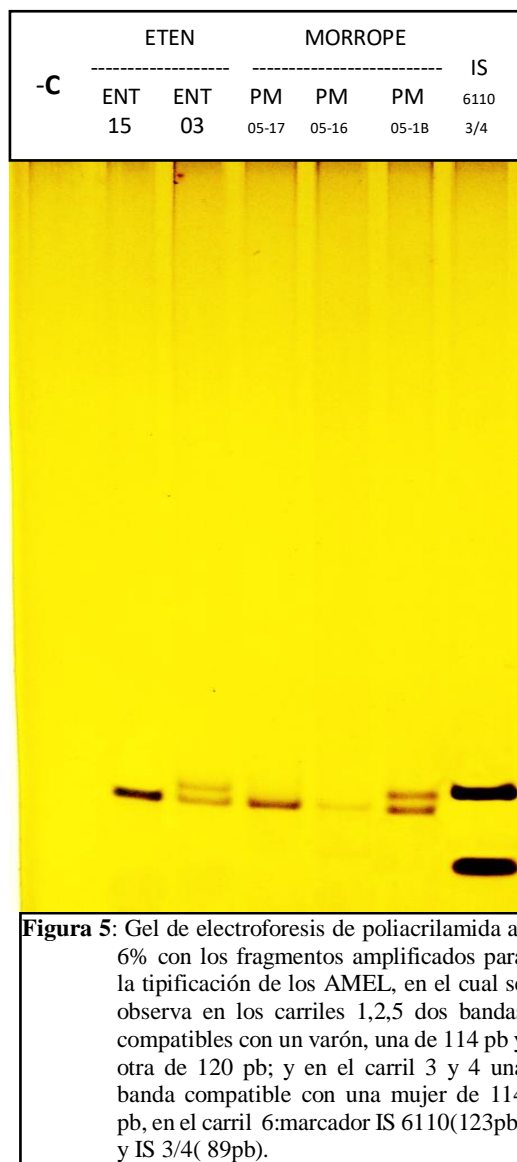
Determinación de sexo del Complejo Arqueológico Capilla doctrinal San Pedro – Morrope

CODIGO DE MUESTRA		AMEL		SEXO
		X 114 pb	Y 120 bp	
1	PM 05-1B	+	+	MASCULINO
2	PM 03-13 A	+	-	FEMENINO
3	PM 03-13 C	+	-	FEMENINO
4	PM 05- 4	+	-	FEMENINO
5	PM 05-2 A	+	-	FEMENINO
6	PM 05-14	+	-	FEMENINO
7	PM 05-17	+	-	FEMENINO
8	PM 05-2 B	-	-	NO AMPLIFICO
9	PM 05-2 C	-	-	NO AMPLIFICO
10	PM 05-15	-	-	NO AMPLIFICO
11	PM 05-16	-	-	NO AMPLIFICO

ETEN						
IS 6110	ENT	ENT	ENT	ENT	ENT	IS 6110
IS 3/4	18	01	25	03	21	IS 3/4



Figura 4 : Gel de electroforesis de poliacrilamida al 6% con los fragmentos amplificados para la tipificación de los AMEL, en el cual se observa en el carril 1 y 7:marcador IS 6110(123pb) y IS 3/4(89pb); en los carriles 2,4,5,6 dos bandas compatibles con un varón, una de 114 pb y otra de 120 pb; y en el carril 3 no hay amplificación.



VI. DISCUSION

En el presente trabajo se evaluó la capacidad de aplicar técnicas moleculares para la determinación del sexo en DNA de restos antiguos de 23 muestras de DNA de sexo desconocido cuya antigüedad data entre los años 1100 d.C y 1600 d. C. (Tabla N°01, Tabla N°02 y Tabla N° 03.)

Según los resultados, se encontró que satisfactoriamente se logró una eficiencia de amplificación de 69,56% tal y como la descrita por Bayley, Stone, Vernesi, Izaguirre, Bizcarra , Gibbon , Morikawa .

Para el proceso de amplificación se tomaron medida de precaución de trabajos anteriores Vernesi , Izaguirre, Gibbon, Morikawa para DNA de restos antiguos, se realizó cada una de las fases experimentales del trabajo con todas las condiciones de asepsia necesarias desde el principio del proyecto para evitar problemas de contaminación. También se realizaron pruebas con los reactivos de PCR con controles negativos para ver si hay contaminación antes de empezar con las muestras de hueso antiguo.

La determinación del sexo se llevó a cabo siguiendo el método propuesto por Morikawa, consistente en la amplificación de un pequeño fragmento de 114 pb de longitud del intron 1 en el gen Amel X y de otro fragmento de 120 pb de longitud en el gen Amel Y; se seleccionó este sistema porque presenta un tamaño pequeño y de fácil interpretación. Los individuos masculinos presentan dos bandas de 114 y 120 pb de longitud; y una banda en los individuos femeninos de 114 pb de longitud; como se muestra en la Figura N°04.

También se han reportado la ausencia de bandas específicas para la amplificación del gen Amel en el cromosoma Y debido a la presencia de mutaciones (Shadrach) y debido a la presencia de deleciones (Santos, Chang, Shadrach, Francés). Esto lleva a la tipificación del individuo erróneamente como mujer, errores reportados para Australia, india, Israel con un porcentaje no mayor a 1,85% de su población según Mitchell y Brauner ; siendo una causal de este la degradación de DNA según Zierdt. Al igual que en otros trabajos Tozzo , Mitchell, Vernesi, Bizcarra, Morikawa, Shadrach, se constata que la antigüedad no es el único factor que influye en una correcta amplificación de DNA, sino que también perturba dicha amplificación las condiciones de preservación. Tal vez unas de las limitantes de este proceso es la baja calidad del ADN antiguo y fácil contaminación con DNA exógeno, es por ello que se agregaron controles negativos para cada amplificación y también se mantuvo el uso de primers específicos humanos para así evitar la amplificación errónea.

VII. CONCLUSIONES

- Para determinar el sexo en poblaciones pre hispánicas, se utilizaron los genes Amel X y Amel Y, obteniendo un 69.56% de la amplificación de los genes Amel X y Amel Y.
- Registrándose un total de nueve individuos de sexo femenino que equivale al 39.13%, siete individuos de sexo masculino que equivale al 30.43% y siete individuos de sexo no registrado que equivale al 30.43%.
- Los resultados obtenidos en este trabajo dan a indicar que es posible la determinación del sexo mediante la técnica del PCR, aunque el rendimiento de esta puede verse menguado por el estado de preservación de las muestras.

VIII. RECOMENDACIONES

- Realizar cada una de las fases experimentales del trabajo con todas las condiciones de asepsia necesarias desde el principio del proyecto para evitar problemas de contaminación.
- Realizar pruebas con los reactivos de PCR con controles negativos para ver si hay contaminación antes de empezar con las muestras de diente antiguo.
- Asegurarse de tener todos los equipos y materiales necesarios en cada uno de los laboratorios para no introducir variables que puedan afectar la amplificación de la muestra.
- Se recomienda que las siguientes investigaciones se desarrollen de manera multidisciplinaria con la participación de Biólogos, Arqueólogos, Antropólogos, Sociólogos e Historiadores para así construir patrones completos de características propias de nuestros ancestros.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Sanabria, Cesar. Dimorfismo sexual en la columna vertebral. Tesis doctoral para obtener el grado de doctor en Antropología Forense. Facultad de Medicina. Universidad de Granada.España.2011
2. Udo Krenzer. Compendio de métodos antropológico forenses para la reconstrucción del perfil osteo-biológico. Tomo II. Métodos para la determinación del sexo. Antropología forense.2006
3. Centurion J. & Curo M. Proyecto Arqueológico de Emergencia Cascajales Ciudad Eten-Chiclayo Informe Final Manuscrito no publicado Instituto Nacional de Cultura/Museo Arqueológico Nacional Brunning de Lambayeque Perú.2005
4. Haagen K. Out of light came darkness: Bioarchaeology of Mortuary Ritual,Health and Ethnogenesis in the Lambayeque Valley Complex,North Coast of Peru Presented for Ph.D. degree The Ohio University.2008
5. Cachay Jorge V. Determinación de haplotipos mitocondriales mediante la técnica de PCR-RFLP en restos dentarios de poblaciones prehispánicas de los distritos de Eten, Morrope y San José [trabajo para optar el título profesional de Licenciado en Biología].Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Perú).2013
6. Skoglund, P., Storå, J., Götherström, A., & Jakobsson, M. Accurate sex identification of ancient human remains using DNA shotgun sequencing. Journal of Archaeological Science, 40(12):2013; 4477–4482Llorens A. y Malgosa A. Aplicación de las técnicas de ADN antiguo en paleopatología. Problemas y Perspectivas. En La enfermedad no escrita. Madrid: Ed. Masson.2003

7. Llorens A. y Malgosa A. Aplicación de las técnicas de ADN antiguo en paleopatología. Problemas y Perspectivas. En La enfermedad no escrita. Madrid: Ed. Masson.2003
8. Izagirre N & Rua de la C. Avances y aplicaciones en el estudio del ADN de restos paleontológicos. Revista Española de Paleontologia. 2001;16(1): 89-97
9. Arango A. Determinación del sexo en restos ancestrales de individuos infantiles. Comparación entre métodos moleculares y antropométricos. Exhumar tres.2001;9-23
10. Faereman M., Filon D., Kahila G., Greenblatt C., Smith P. y Oppenheim A. Sex identification of archaeological human remains based on amplification of the X and Y amelogenin alleles. Gene 167; 1995: p. 327-332
11. Meyer E., Wiese M., Bruchhaus H., Claussen M. y Klein A. Extraction and amplification of authentic DNA from ancient human remains. Forensic Science International 113; 2000. p. 87-90
12. Higuchi, R., Bowman, B., Freiberger, M., Ryder, O. A. & Wilson, A. C. DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. Nature :1984;312(5991): 282–284.
13. Hagelberg, E., & Clegg, J. B. Isolation and characterization of DNA from archaeological bone. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 1991;244(1309), 45–50.
14. Rohland N, Hofreiter M. Ancient DNA extraction from bones and teeth. Nat Protoc 2:2007; 1756–1762
15. Kalmár,T., Bachrati,C.Z., Marcsik,A., Raskó,I.,A simple and efficient method for PCR amplifiable DNA extraction from ancient bones. Nucleic Acids Res,2000,Vol.28(12), pp.67-71

16. Höss M., Jaruga P., Zastawny T.H., Dizdaroglu M., Pääbo S. DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. *Nucleic Acids Res.*1996;24:1304–1307
17. Baubliene J., Daugnora L., Miceikiene I. Evaluation of the DNA extraction method from ancient animal bones. *EKOLOGIJA*, 2003;1:8-11
18. Izagirre N & Rua de la C. Avances y aplicaciones en el estudio del ADN de restos paleontológicos. *Revista Española de Paleontología*. 2001;16(1): 89-97
19. Izagirre et al. (2003) *Antropología y Biodiversidad*, 1: 285-289
20. Keyser-Tracqui C, Crubézy E, Ludes B. Nuclear and mitochondrial DNA analysis of a 2,000-year-old necropolis in the Egyin Gol Valley of Mongolia. *Am J Hum Genet.* 2003;73(2):247-60
21. Izaguirre, N., L.M. Duran, and C. De La Rua. “Genética y Arqueología: Análisis Molecular de ADN Procedente de Restos Esqueléticos.” *NUMIBE Arqueología* no 50 ;1998: 3–14.
22. Izagirre & de la Rúa. Aportación de la biología molecular al estudio antropológico de las poblaciones humanas del pasado: análisis del ADN mitocondrial. *Rev. Esp. Antrop. Biol.* 2000; 21: 1-10.
23. Bayley DMD, Affra NA, Fergusons-Smith M. The X e Y homologous gene amelogenin maps to the short arms of both the X and the Y chromosomes and is highly conserved in primates. *Genomics*;1992;14:203e5.)
24. Sasaki S, Shimokawa H. The amelogenin gene. *Int J Dev Biol* 1995; 39: 127-133
25. Butler E, Li R. Genetic Markers for Sex Identification in Forensic DNA Analysis. *J Forensic Investigation*. 2014;2(2): 10.

26. Akane, H. Shiono, K. Matsubara, Y. Nakahori, S. Seki, S. Nagafuchi, M. Yamada, Y. Nakagome, Sex identification of forensic specimens by polymerase chain reaction (PCR): two alternative methods, *Forensic Sci. Int.* 1991;49 (81–88.)
27. Sullivan KM, Mannucci A, Kimpton CP, Gill P. A rapid and quantitative DNA sex test - fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin. *Biotechniques.* 1993; 15:636
28. Stone AC, Milner GR, Pääbo S, Stoneking M. Sex determination of ancient human skeletons using DNA. *Am. J. Phys. Anthropol.* 1996; 99:231–238.
29. Vernesi, C., Caramelli, D., & Carbonell, S. Analysis of Ancient DNA for Human Sex Determination, *Etruscan Studies*,1997; Volume 4, Issue 1, Pages 137–144)
30. Bizcarra N. De, Alzualde A., Izagirre N. & Rúa C De N. Estimación del sexo a nivel molecular en restos esqueléticos humanos. *Munibe* N°53.2001; pp143-150
31. Bizcarra N. De, Alzualde A., Alonso S., Izagirre N. & Rúa C De. Amplificación del gen de la amelogenina y de una secuencia repetitiva alfoide del cromosoma-Y en restos arqueológicos del país Vasco. 2001;Pp195-200)
32. Francès F., Castelló A. & Verdú F. El diagnóstico genético del sexo mediante el test de la amelogenina: Métodos y posibles fuentes de error. *Cuad Med Forensec.*2008;pp119.125
33. Gibbon V., Paximadis M., Strkalj G., Ruff P. & Penny C. Novel methods of molecular sex identification from skeletal tissue using the amelogenin gene. *Forensic Science International: Genetics.*2009;pp74-79
34. Ghareeb AM. Use of teeth samples for gender determination by pcr in iraqi case. *Iraqi J. Biotech* :2010(Vol. 9, pp. 819–827).

35. Zapico SC, Ubelaker DH. Sex determination from dentin and pulp in a medicolegal context. J Am Dent Assoc. 2013
36. Dutta P, Bhosale S, Singh R, Gubrellay P, Patil J, Sehdev B, et al. Amelogenin gene- the pioneer in gender determination from forensic dental samples. J Clin Diagn Res 2017;11:ZC56-9
37. Nayar AK, Parhar S, Thind G, Sharma A, Sharma D. Determination of age, sex, and blood group from a single tooth. J Forensic Dent Sci 2017;9:10-4.
38. Praveen Kumar ST, Aswath N. DNA isolation from teeth by organic extraction and identification of sex of the individual by analyzing the AMEL gene marker using PCR. J Forensic Dent Sci 2016;8:18-21.
39. Luke J., Herráez A., Biología Molecular e Ingeniería genética. El Sevier. Science. Madrid. España. 2002
40. Wester C. CHOTUNA-CHORNANCAP: “Templos, Rituales y Ancestros Lambayeque” Perú Ed Súper Grafica E.I.R.L. 2010
41. Morikawaa T., Yamamotoa Y. & Miyaishia S. (2011). A New Method for Sex Determination Based on Detection of SRY, STS and Amelogenin Gene Regions with Simultaneous Amplification of Their Homologous Sequences by a Multiplex PCR.
42. Shadrach B, Commane M, Hren C, Warshawsky I. A rare mutation in the primer binding region of the amelogenin gene can interfere with gender identification. J Mol Diag 2004; 6: 401-405.
43. Santos FR, Pandya A, Tyler-Smith C. Reliability of DNA-based sex tests. Nat. Genet. 1998; 18:103.

44. Chang YM, Burgoyne LA, Both K. Higher failures of amelogenin sex test in an Indian population group. *J. Forensic Sci.* 2003; 48:1309–1313.
45. Michael, Abebe and Paul Brauner. “Erroneous gender identification by the amelogenin sex test.” *Journal of forensic sciences* 49 2 (2004): 258-9 .
46. Tozzo P, Giuliadori A, Corato S, Ponzano E, Rodriguez D, et al. Deletion of amelogenin Y-locus in forensics: Literature revision and description of a novel method for sex confirmation. *J Forensic Leg Med.* 2013; 20(5): 387–391.
47. Bruzek, J. A method for visual determination of sex, using the human hip bone, *American Journal of Physical Anthropology*, 2002; 117, 157-168.
48. Francois-XR. Keyser CT. Crubezy E, Ludes B. STR-genotyping from human medieval tooth and bone samples. *Forensic Science International*. 151:2005; pp 31-35
49. Hernández R., Fernández C., & Baptista M. *Metodología de la investigación*. México. 5ª Edición. McGRAW-HILL / Interamericana Editores, S.A. De C.V. 2010
50. Luna, Leandro. *Análisis de restos óseos humanos fragmentados procedentes de una estructura funeraria compleja: sitio Chenque I (Parque Nacional Lihué Calel, Provincia De La Pampa) Tesis De Licenciatura para optar por el título de Lic. En Ciencias Antropológicas (Orientación Arqueología), Facultad De Filosofía Y Letras, Universidad De Buenos Aires.* 2003
51. Martinez J. “Prospección y delimitación de la zona arqueológica Huaca de Barro-Morrope”-Informe general de trabajo de campo Manuscrito no publicado Lambayeque MAB . 1996.

52. Nakahori Y, Mitani K, Yamada M, Nakagome Y. A human Y-chromosome specific repeated DNA family (DYZ1) consists of a tandem array of pentanucleotides. *Nucleic Acids Res.* 1986;14(19):7569-80.
53. Srivastava M, Tripathi S, Astekar M, Singal D, Srivastava A, Vashisth P. Sex determination from mesiodens of Indian children by amelogenin gene. *J Forensic Dent Sci* 2017;9:125-9.
54. Stewart NA, Gerlach RF, Gowland RL, Gron KJ, Montgomery J. Sex determination of human remains from peptides in tooth enamel. *Proc Natl Acad Sci.* 2017
55. Trujillo A & Ordóñez A. Nociones básicas para la determinación del sexo y edad en restos biantropológicos. Universidad de Laguna. 2011
56. Velarde J., Molina C., Solórzano S., Guadalupe S., Rendón H., Murillo J. & Ríos J. Identificación del sexo mediante análisis molecular del gen de la amelogenina. *Rev Mex Patol Clin*, 2008;55 (1): 17-20)
57. Wester C. Proyecto Chotuna-Chornancap Tomo I Y II Informe Final Temporada 2009-2010 Manuscrito no publicado Ministerio de Educación/Unidad ejecutora N°111 Naylamp Lambayeque/Museo Arqueológico Nacional Brunning Perú. 2010
58. Wester C. Sacerdotisa Lambayeque de Chornancap: Misterio e Historia Lima-Perú Ministerio de Cultura. 2012

ANEXOS

ANEXO 01

PROTOCOLO DE EXTRACCION DE AND EN PIEZAS DENTARIAS

1. Dejar macerar el diente pulverizado en EDTA 0.5M durante 7 días a 4 °C.
2. Decantar la muestra y obtener partículas dentarias casi disueltas.
3. Trasladar 2 mL de la alícuota obtenida a un nuevo tubo de 15 mL.
4. Centrifugar a 4000 RPM por 10 minutos.
5. Descartar el sobrenadante y homogenizar el precipitado.
6. Verter el contenido en tubos de 1.5 mL. Aproximadamente 500 uL por tubo.
7. Agregar 200 a 500 uL de Buffer de lisis por tubo.
8. Agregar 40 uL de Proteinasa-K diluida a cada tubo.
9. Poner en Baño Maria a 54°C durante 12 horas.
10. Agregar 200 a 400 uL de Binding Buffer de lisis por tubo.
11. Poner en Baño Maria a 70°C durante 40 minutos.
12. Dejar sedimentar o centrifugar a 1000 RPM por 5 minutos y utilizar el sobrenadante.
13. Verter el sobrenadante en un tubo de 15 mL
14. Agregar 500 uL de Iso-propanol o alcohol Isopropilico bajo congelación por cada 2 mL de muestra.
15. Mezclar y homogenizar
16. Verter el contenido en tubos con membrana/filtro
17. Centrifugar a 8000 RPM durante 1 minuto
18. Descartar el tubo base que contiene la parte liquida
19. Cambiar el tubo base y agregar 500 uL de Inhibidor
20. Centrifugar a 8000 RPM durante 1 minuto
21. Retirar el tubo base y cambiarlo por uno nuevo
22. Agregar 500 uL de Buffer de lavado y centrifugar a 8000 RPM durante 1 minuto(realizar 2 veces)
23. Centrifugar a 10000 RPM durante 10 segundos.
24. Cambiar el tubo base por uno de 1.5 mL
25. Agregar 30 uL de Elution Buffer
26. Dejar reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente.
27. Centrifugar a 8000 RPM durante 1 minuto
28. Agregar 50 uL de Elution Buffer
29. Descartar la membrana y coleccionar el liquido(ADN) en tubo de 0.5 mL

ANEXO 02

PREPARACIÓN DEL GEL:

1.-Gel de poliacrilamida:

6 mL Solución de poliacrilamida 20:1(acrilamida: bis acrilamida)

4 mL Solución de TBE 5X y TBE 1X

25 uL Solución de Persulfato de Amonio 10%

250 uLTEMED(NNNN Tetrametil Etilen Diamin)

2.-Tinción con Nitrato de Plata

2.1.- Solución Fijador:

100 mL Etanol Absoluto

5 mL Ácido Acético

895 mL Agua destilada

2.2.- Solución Nitrato de plata

0,3 g Nitrato de plata

100 mL Solución Fijador

Agua destilada hasta completar 1 L

2.3.- Solución de formaldehido-NaOH

30 g NaOH

3 mL Formaldehido 40%

Agua destilada hasta completar 1 L