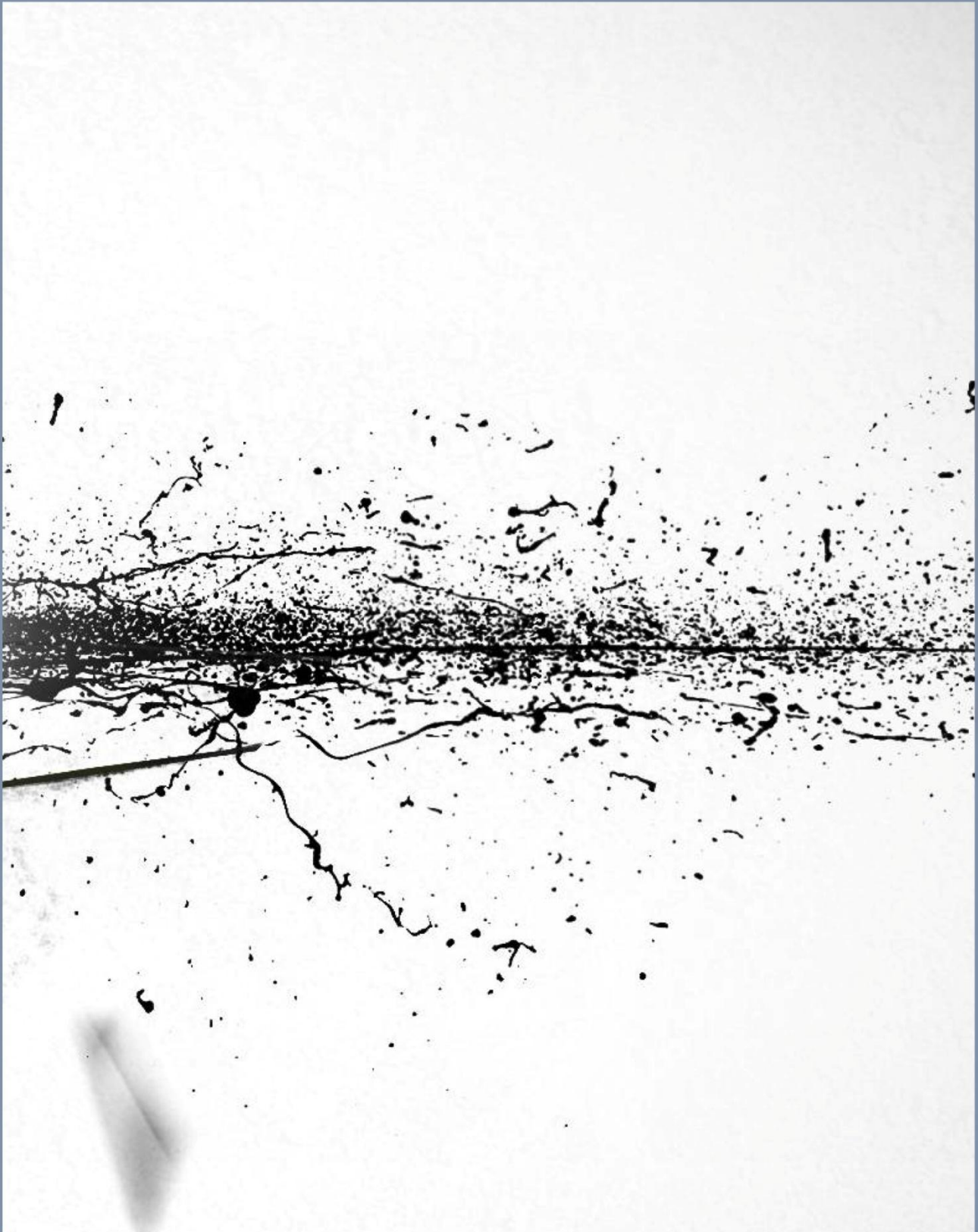


ANUARIO DE ARQUEOLOGÍA 2013



**Universidad de la República
Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación
Departamento de Arqueología**

ANUARIO DE ARQUEOLOGÍA 2013

<http://anuarioarqueologia.fhuce.edu.uy>
anuariodearqueologia@gmail.com

Instituto de Ciencias Antropológicas. Departamento de Arqueología – Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación – UdelaR.

ISSN: 1688-8774

ILUSTRACIÓN DE PORTADA: Abstracto. Arte. P.Tabárez

EDITOR RESPONSABLE

Leonel Cabrera

SECRETARÍA DE EDICIÓN

Andrés Florines

Paula Tabárez

CONSEJO EDITOR

Jorge Baeza – Uruguay

Roberto Bracco – Uruguay

Leonel Cabrera – Uruguay

Carmen Curbelo – Uruguay

Antonio Lezama – Uruguay

José López Mazz – Uruguay

COMITÉ CIENTÍFICO

Tania Andrade Lima - Brasil

Antonio Austral - Argentina

Martín Bueno - España.

Primitiva Bueno - España.

Felipe Criado Boado - España.

Nora Franco – Argentina.

Arno A. Kern – Brasil.

Jorge Kulemeyer –Argentina.

Hugo Gabriel Nami - Argentina

Patrick Paillet – Francia

Gustavo Politis – Argentina.

Ana María Rocchietti – Argentina.

Mónica Sans – Uruguay

Marcela Tamagnini – Argentina.

Fernanda Tocchetto - Brasil

Andrés Troncoso – Chile.

AGRADECEMOS LA COLABORACIÓN EN ESTE NÚMERO:

COMITÉ EDITOR

Roberto Bracco (Uruguay)

Carmen Curbelo (Uruguay)

Leonel Cabrera Pérez (Uruguay)

José María López Mazz (Uruguay)

COMITÉ CIENTÍFICO

Mónica Sans (Uruguay)

El contenido de los artículos es responsabilidad de los autores y no necesariamente refleja el criterio o la política editorial del Anuario de Arqueología. La reproducción parcial o total de esta obra puede hacerse previa aprobación del Editor y mención de la fuente.

El Anuario de Arqueología agradece el aporte de todos los autores que participan en esta edición.

Anuario de Arqueología 2013

ÍNDICE

	Pág.
<u>Editorial</u>	1
Proyectos de Docentes del Departamento de Arqueología (F.H.Cs.Ed.-UdelaR)	
Cabrera, Leonel	
<u>Gestión e investigación del Patrimonio Arqueológico Prehistórico ('Arte Rupestre'), de la región norte de Uruguay.</u>	5
Reseña de trabajos monográficos de Estudiantes	
Azziz, Natalia	
<u>Análisis de un enterramiento secundario de la excavación III, Rincón de los Indios (Rocha).</u>	120
Blasco, Jimena	
<u>Elaboración de modelos digitales tridimensionales de materiales arqueológicos cerámicos. Un aporte a la discusión sobre funcionalidad.</u>	149
Collazo, Camilo	
<u>El análisis estratigráfico en Arqueología. El caso de la Laguna Negra.</u>	183
Delgado Carolina	
<u>Los bienes arqueológicos insertos en la sociedad contemporánea.</u>	201
Gazzán, Nicolás	
<u>Análisis lítico del Componente Bañadero A, sitio Y-62. Una aproximación a las "piedras grabadas" de Salto Grande.</u>	239
Mut, Patricia	
<u>Determinación de sexo a partir de técnicas moleculares en restos humanos prehistóricos del Uruguay y su aplicación en Arqueología .</u>	273
Tabárez, Paula	
<u>Estudio de los Ushabtis de los Museos Públicos de Montevideo. Una aproximación al concepto de la muerte y las prácticas funerarias en el Antiguo Egipto.</u>	307

Determinación de sexo a partir de técnicas moleculares en restos humanos prehistóricos del Uruguay y su aplicación en arqueología

Patricia Mut

Departamento de Antropología Biológica,
Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación, Universidad de la República

mut.patricia@gmail.com

Resumen

La identificación de sexo por técnicas moleculares se ha empleado en antropología forense y arqueología desde el inicio de la década de 1990 como complementaria a la identificación del sexo por métodos tradicionales. El objetivo de este trabajo fue la estandarización de una técnica de determinación del sexo basada en la amplificación por PCR de una región del intrón 1 del gen de la amelogenina en los cromosomas X e Y, con el fin de evaluar su aplicabilidad en casos arqueológicos, ampliando las herramientas disponibles en Uruguay para la investigación en estas disciplinas. Se trabajó inicialmente con muestras de ADN de individuos contemporáneos a fin de establecer las condiciones experimentales de la PCR. Para evaluar la técnica en restos humanos prehistóricos, se seleccionaron 3 individuos cuyo sexo pudo ser determinado por métodos morfológicos y osteométricos. A continuación se analizaron tres individuos cuyo sexo no pudo determinarse por métodos morfológicos o morfométricos. La mejor resolución de los productos de PCR se obtuvo empleando electroforesis en gel de poliacrilamida (16% T, 5% C) y efectuando la tinción de los productos de amplificación con nitrato de plata. En las muestras arqueológicas se empleó una estrategia de amplificación y posterior reamplificación para la detección de los productos de PCR. El sexo morfológico de las muestras se confirmó con los resultados moleculares, avalando la aplicabilidad del método. Se encontró además, que la conservación de los huesos está relacionada con la calidad de los resultados moleculares.

1. Introducción y Antecedentes

En el presente artículo se presenta una síntesis de la monografía realizada para el trabajo de aprobación del curso “Técnicas de Investigación en Arqueología”. El docente orientador fue el Dr. Gonzalo Figueiro y los co-orientadores fueron el Dr. Pedro C. Hidalgo y la Dra. Mónica Sans.

Conocer el sexo de los individuos de un conjunto osteológico recuperado en un contexto arqueológico resulta fundamental a la hora de interpretar el modo de vida de las poblaciones prehistóricas. Esta información junto con el contexto de

recuperación, podrá ser utilizada para aproximarnos a la comprensión de las pautas de comportamientos, organización social y estrategias económicas de las poblaciones pasadas. Sin embargo, la determinación del sexo con base en la morfología, tal como se ha hecho tradicionalmente, presenta diversas dificultades, y es frecuente que a los individuos, en especial los subadultos, no se les pueda asignar el sexo.

Los métodos tradicionales para determinación de sexo en restos óseos humanos se basan en el dimorfismo sexual, el cual es examinado por métodos cualitativos o cuantitativos (Acsadi y Nemeskeri 1970, Ubelaker 1978, Bass 1971, Byers 2002, Figueiro y Sans 2011). Si bien estos métodos han demostrado su efectividad, existen casos en los cuales no pueden ser aplicados, ante lo cual surge la necesidad de contar con métodos alternativos. La disponibilidad de un método de determinación del sexo basado en técnicas moleculares permitirá incluir a los individuos subadultos discriminados por sexo en los análisis demográficos. De esta manera se podrán abordar diversas interrogantes arqueológicas, como por ejemplo el infanticidio sesgado por género, fenómeno muy frecuente en poblaciones históricas y prehistóricas (Harris 1987, Scott 2001). Asimismo, la implementación del método de determinación de sexo por técnicas moleculares serviría como línea independiente de contrastación de hipótesis arqueológicas para futuras investigaciones.

En el Uruguay, estudios realizados en los que se aplicaron diferentes métodos para determinación de sexo, han evidenciado un exceso de individuos masculinos en los sitios de la región este. Se ha planteado la hipótesis de que este patrón podría ser causado por pautas culturales que llevarían a la inhumación preferencial de individuos masculinos en sitios con estructuras monticulares (Figueiro y Sans 2011). Dentro de esta problemática, determinar el sexo de los individuos clasificados como indeterminados sería de gran utilidad para ahondar en la comprensión de los comportamientos que resultaron en la distribución por sexos observada entre los enterramientos del territorio uruguayo.

Sería conveniente disponer de métodos alternativos cuando para la determinación de sexo cuando los restos se encuentran en mal estado de conservación, cuando no se cuenta con piezas diagnósticas, cuando se trata de subadultos, o incluso cuando por métodos morfológicos u osteométricos se concluye como "sexo indeterminado". En contextos arqueológicos el estado de conservación de los restos depende de las características propias del hueso (físico-químicas) y de las condiciones deposicionales (ambientales y antrópicas). Las características ambientales del Uruguay por lo general no permiten una buena conservación de los restos osteológicos y de otros restos orgánicos (madera, piel, tejidos entre otros), siendo poco común la recuperación de restos humanos, y, cuando son recuperados, muchas veces se encuentran en mal estado de conservación, por lo que no es posible la determinación de sexo por métodos morfológicos u osteométricos. Trabajos que ejemplifican estas dificultades para Uruguay son el de Pintos y Bracco (1999) en el cual el porcentaje de individuos a

quienes no se pudo determinar el sexo es más del 60% o el de Sans y Femenías (2000) donde el porcentaje de indeterminados es del 45%.

Para Uruguay el trabajo de Sans y Portas (2001) es el único antecedente de utilización de técnicas moleculares para la determinación del sexo en restos óseos prehistóricos. El método empleado consistió en la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de segmentos no homólogos de los cromosomas sexuales: un fragmento del gen DMD47 en el cromosoma X, y los repetidos alfoides del cromosoma Y. Se analizó una muestra de 21 individuos prehistóricos de la región este del Uruguay, obteniéndose resultados positivos solamente para dos individuos, sin embargo en el trabajo se reconoce la importancia de contar con estos métodos alternativos para estimar sexo y de un mejor desarrollo de los mismos para ser utilizados especialmente en los casos donde la asignación de sexo es dudosa. Es de resaltar que ese trabajo se realizó al inicio de los trabajos en ADN antiguo (ADNa) en el Uruguay; trabajos posteriores con ADNa fueron más exitosos en obtener y analizar ADN de restos antiguos, aunque el fin no era la determinación de sexo sino estudios poblacionales basados en ADN mitocondrial (Sans et al. 2006, Sans et al. 2010, Figueiro et al. 2011, Sans et al. 2011).

El presente estudio forma parte de los primeros esfuerzos en el Uruguay para establecer una metódica basada en el análisis del ADN nuclear antiguo fundamentando su viabilidad para futuras investigaciones basadas en el análisis de este tipo de material.

1.1. ADN mitocondrial y ADN nuclear

El genoma mitocondrial o ADN mitocondrial (ADNmt) se encuentra en la matriz de las mitocondrias localizadas en el citoplasma de las células eucariotas. Es un ADN circular de doble cadena no recombinante de 16569 pares de bases (pb), y por el hecho de encontrarse en el citoplasma del óvulo es heredado exclusivamente por línea materna. Cada célula contiene varios cientos de mitocondrias y en cada mitocondria se encuentran múltiples copias de ADNmt (Stone 2008). Por su abundancia intrínseca, es más probable aislar el ADNmt en restos antiguos que el ADN nuclear (ADNn). Es a causa de ésta y sus otras características (herencia uniparental, no recombinante, y elevada tasa de mutación), que el ADNmt ha sido utilizado en la mayoría de los estudios de ADNa para investigaciones poblacionales y filogenéticas de diversa índole.

El ADNn está presente en el núcleo de las células en dos copias (una por cada juego de cromosomas haploides) por lo que se encuentra en cantidades significativamente menores que el ADNmt, lo que hace más complejo su estudio en restos antiguos. El ADNn está organizado en 23 pares de cromosomas, uno de ellos llamado “par sexual o gonosomas” compuesto por los cromosomas X e Y. Es un ADN recombinante (excepto en el cromosoma Y donde existe una región que no recombina y que ocupa la mayor parte de este) y se hereda por línea materna y paterna. Si bien el estudio de marcadores nucleares en ADNa cuenta con la

dificultad de la escasez, lo que hace más compleja su obtención y análisis, es de gran interés para el estudio de las poblaciones pasadas. A pesar de sus dificultades técnicas se han llevado a cabo estudios exitosos a partir de ADN antiguo, probando ser útil para la realización de estudios filogenéticos (humanos y de otros animales), paleoepidemiológicos, para la identificación de plantas y caracterización de paleoambientes y presencia de cultivos, para los estudios de herencia uniparental paterna utilizando las secciones no recombinantes del cromosoma Y, y para la determinación del sexo a partir de restos cadavéricos.

1.2 Problemas relativos al análisis de ADN antiguo

1.2.1 Degradación y daño molecular

Durante la vida de un organismo, su ADN se encuentra constantemente sometido a diversos tipos de factores endógenos y exógenos que causan daños que son reparados por complejos mecanismos enzimáticos. Tras la muerte, los procesos de reparación se detienen y comienza la degradación progresiva de todas sus biomoléculas por diversos agentes, como las nucleasas endógenas, hongos y bacterias (Pääbo et al. 2004).

La extracción de ADN de restos arqueológicos no es siempre posible, siendo muchos los casos en que el proceso de degradación ha llegado a una extensión tal que en la que no se encuentra material apto para de ser analizado. Cuando se encuentra ADN endógeno, éste se encuentra dañado a causa de un conjunto de procesos biofísicos y bioquímicos endógenos que tienen como resultado el fraccionamiento y la modificación de estas moléculas.

Aunque la degradación comienza inmediatamente que el organismo muere y es acumulativa, la tasa en que se da este proceso puede ser disminuida considerablemente bajo condiciones medioambientales favorables y por lo tanto pueden realizarse extracciones de ADN exitosas en restos muy antiguos. La temperatura, el pH, la concentración salina, y la humedad y la presencia de oxígeno son los factores críticos que van a determinar el estado de conservación (Stodder 2008).

Además, el ADN suele contener elementos de diversa naturaleza (compuestos del suelo o del mismo proceso de degradación del material óseo) que actúan como inhibidores de la Taq polimerasa, crítico para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), haciendo muy difícil y en algunos casos inviable la replicación del ADN y por lo tanto su estudio.

1.2.2 Contaminación

En el trabajo con ADN una de las mayores dificultades es la contaminación. Debido a la escasez y fragmentación del ADN, la posibilidad de contaminación de las muestras con ADN exógeno es alta. Para disminuir esta posibilidad es necesario emplear protocolos estrictos para el trabajo de laboratorio. Es necesario

contar con instalaciones adecuadas que posean un área específica para el trabajo con ADN. Existe además, la posibilidad de que la muestra se encuentre contaminada previo al ingreso al laboratorio. Para evitar este tipo de contaminación se suele utilizar un protocolo de remoción y lavado de las capas exteriores del hueso o sometiéndolo a inmersiones en hipoclorito sódico (diluido) (Rohland y Hofreiter 2007). Se han determinado estrictas recomendaciones metodológicas que deben cumplirse para que los resultados sean considerados válidos. Los criterios recomendados por el equipo de Pääbo y adoptados por O'Rourke y colegas son los siguientes (Handt et al. 1994, O'Rourke et al. 2000, Pääbo et al. 2004):

- 1) Área de trabajo exclusiva para ADN, separada de espacios en que se manipule ADN moderno y en que se realicen análisis post-PCR.
- 2) Protocolos estrictos de trabajo: los materiales y equipamiento deben ser de uso exclusivo para el procesamiento del ADN. El área de trabajo debe ser limpiada con hipoclorito sódico e irradiado con luz UV inmediatamente antes de comenzar a trabajar. El personal no debe ingresar al laboratorio en caso de que previamente haya ingresado a áreas de trabajo post-PCR o laboratorios de ADN moderno.
- 3) Controles de contaminación: deben agregarse controles de contaminación (controles negativos) durante el proceso de extracción y durante los análisis posteriores.
- 4) Todo resultado debe ser confirmado mediante múltiples análisis. Se recomienda además replicar los análisis en laboratorios de ADN independientes; sin embargo esto no es siempre posible debido a los altos costos que conlleva y a la escasez de las muestras.
- 5) Los resultados deben tener sentido filogenético: en humanos significa que debe tener sentido en el contexto de la investigación.
- 6) Comportamiento molecular apropiado: la degradación del ADN tiene como consecuencia la fragmentación, por lo que no es probable encontrar fragmentos de ADN originales mayores a unas 200 pb aproximadamente. Debe observarse una relación inversa entre la longitud del fragmento amplificado y su rendimiento.

1.3 Determinación de sexo por técnicas moleculares

La identificación de sexo a partir de técnicas moleculares se ha venido utilizando en antropología forense y arqueología desde mediados de la década de 1990 (Faerman et al. 1995, Stone et al. 1996, Götherström et al. 1997, Murakami et al. 2000, Mays and Faerman 2001, Bizcarra et al. 2002), mostrando ser una herramienta rápida y eficaz, especialmente en casos en los cuales no es posible la identificación de sexo por métodos tradicionales.

Se han desarrollado diversos métodos moleculares para determinación de sexo, como la amplificación por PCR de secuencias repetidas alfoides del cromosoma X y del cromosoma Y (Murakami et al. 2000, Bizcarra et al. 2002), la amplificación de distintas regiones del gen de la amelogenina (Faerman et al. 1995, Stone et al. 1996, Götherström et al. 1997) e incluso el empleo de PCR multiplex

analizando regiones del gen de la amelogenina junto con STRs específicos de uno o ambos cromosomas (Hummel 2003). Sin embargo, muchos de estos métodos presentan inconvenientes al trabajar con ADNa ya que los productos a amplificar suelen ser demasiado grandes. El método propuesto por Sullivan et al. (1993) tiene la ventaja de que la región a amplificar es pequeña (106 pb para el cromosoma X y 112 pb para el cromosoma Y) y además, la banda correspondiente al cromosoma X, que debe verse en todos los casos, es indicativo de que la PCR fue exitosa, a diferencia de otros métodos que se basan en la presencia/ausencia de productos específicos para el cromosoma Y, donde la ausencia de producto puede deberse a un fallo en la técnica y no a que el individuo analizado sea de sexo femenino.

La amelogenina es una proteína presente en el esmalte dental producida en abundancia durante el desarrollo. En humanos, los genes que la codifican se encuentran en los cromosomas sexuales, AMELX (o AMG) localizado en la región p22.1-p.22.3p del cromosoma X y AMELY (o AMGL) localizado en la región p11.2 del cromosoma Y (Nakahori et al. 1991; Salido et al. 1992). Ambas secuencias poseen diferencias estructurales, sin embargo, poseen en general un alto grado de similitud hallándose regiones homólogas. Se ha hecho extenso uso de estas particularidades para el desarrollo de análisis con diversas aplicaciones, entre ellas, la determinación de sexo molecular. Los métodos de amplificación de la amelogenina empleados para la determinación del sexo molecular se basan en el diseño de un par de cebadores para amplificación por PCR de una región homóloga de los genes AMLX y AMLY dentro de la cual se encuentra una inserción o deleción en uno de los cromosomas, lo que genera una longitud diferencial en pares de bases de los fragmentos resultantes. Esto permite identificar el genotipo del individuo para ese alelo y por lo tanto, su sexo cromosómico. Se ha diseñado una gran variedad de cebadores con este fin, resultando cada uno en la replicación de fragmentos de distintos tamaños (Francès et al. 2008). En este trabajo seleccionamos un par de cebadores para la amplificación de un segmento pequeño, que resulta adecuado para el trabajo con ADNa.

2. Objetivos de la investigación

General:

Estandarizar una técnica de determinación de sexo de interés para el análisis de prácticas culturales de las poblaciones prehistóricas del Uruguay integrando la genética y la biología molecular para el análisis de restos esqueléticos humanos.

Específicos:

1. Optimizar la técnica de determinación de sexo en muestras de individuos actuales.
2. Aplicar la técnica para determinar el sexo de individuos prehistóricos de sexo determinado previamente por métodos morfológicos y osteométricos y comparar resultados para evaluar su precisión y exactitud.

3. Determinar el sexo de individuos prehistóricos del Uruguay que no han podido ser analizados con los métodos tradicionales o que fueron clasificados como indeterminados.
4. Analizar los resultados de los individuos analizados en relación al contexto de recuperación y al sitio al cual pertenecen a fin de generar información de carácter cultural a partir del hecho biológico del sexo de los individuos.

3. Materiales y métodos

Se analiza la aplicabilidad de una técnica para la determinación molecular del sexo a partir de la experimentación. Esta se divide en tres etapas:

- a) Estandarización de la técnica en muestras de individuos modernos;
- b) Extracción de ADN de individuos de contextos arqueológicos;
- c) Análisis por PCR de los extractos para determinar su sexo cromosómico:
 - c.1) Análisis de los individuos de sexo ya determinado por métodos tradicionales;
 - c.2) Análisis de los individuos de sexo no determinado.

3.1 Muestras

De acuerdo a lo expuesto, se trabajó con distintas muestras para alcanzar los resultados esperados:

a) Se trabajó en primera instancia con ADN de individuos contemporáneos a fin de estandarizar la técnica a nivel de condiciones para la PCR. Las muestras utilizadas fueron proporcionadas por el Departamento de Antropología Biológica de la Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación (FHUCE). No se realizaron extracciones de ADN, se trabajó con extractos obtenidos previamente en el marco de diversos proyectos de investigación. Las muestras utilizadas pertenecen a individuos que dieron consentimiento escrito informado para la utilización de su ADN con estos fines.

Para estandarizar las reacciones de amplificación debieron realizarse experimentos en los cuales se variaron diversas condiciones para lograr resultados óptimos en 2 aspectos: amplificación por PCR y visualización de los productos. Para ello, se utilizaron 8 muestras de ADN de individuos modernos, de las cuales cuatro eran extractos realizados a partir de sangre de acuerdo al protocolo de Miller et al. (1988) y cuatro de folículo piloso extraídos empleando el protocolo de Hidalgo et al. (2009). Para cada sexo (femenino y masculino) se seleccionaron 2 extractos de sangre y 2 de folículo piloso.

Los extractos de ADN realizados a partir de sangre suelen ser de superior calidad en comparación con extractos realizados a partir de otros tipos de materiales biológicos, como el folículo piloso. La menor calidad del ADN recuperado de este tipo de material se explica por la presencia de inhibidores de la PCR como la melanina, o simplemente por la cantidad de ADN nuclear recuperable (Graham 2007). Sin embargo, el poder obtener muestras con métodos no invasivos

y de fácil obtención (a diferencia de la extracción de sangre) es una gran ventaja a la hora de diseñar una investigación, fomentando la participación de los individuos y resultando más accesible en cuanto a materiales, instalaciones y personal. De esta manera se procura estandarizar la técnica con el objetivo de que los resultados puedan ser replicables sin importar el material biológico del que se parte para la extracción de ADN.

b) Muestras de individuos prehistóricos: se seleccionaron muestras de un total de seis individuos de conjuntos óseos recuperados en diversos sitios localizados en el territorio nacional: “Rincón de los Indios” (Rocha) (Gianotti y López Mazz 2009), “CH2D01-A” (Rocha) (Femenías et al. 1990), “Arroyo Yaguareté” (Río Negro) (Boretto et al. 1973), y “Estancia Tabaré (Río Negro) (sin publicar). Asimismo, se seleccionaron dos muestras del sitio “Laguna Tres Reyes I” (Provincia de Buenos Aires) (Madrid y Barrientos 2000) (Tabla 1 y Figura 1).



Figura 1. Mapa con la ubicación de los sitios de los cuales se tomaron las muestras arqueológicas: 1) Laguna Tres Reyes I; 2) CH2D01; 3) Rincón de los Indios; 4) Yaguareté; 5) Estancia Tabaré

La selección de los individuos prehistóricos se realizó en base los siguientes criterios:

I. La muestra debía contener individuos de los cuales se haya podido estimar el sexo por métodos morfología u osteométricos, con el objetivo de contrastar los resultados de las diferentes técnicas de estimación de sexo. Debían incluirse individuos masculinos y femeninos.

II. Se seleccionaron individuos de sexo indeterminado con el fin de contribuir en la construcción de su perfil biológico y a su vez aportar datos que serán útiles en la interpretación de cada sitio. Se tuvo en cuenta el contexto arqueológico intentando seleccionar por lo menos una muestra para la cual no haya sido posible la determinación de sexo por métodos tradicionales y que esta información pueda ser relevante para la interpretación del sitio. Este es particularmente el caso de la muestra del paquete funerario recuperado en el sitio “Rincón de los Indios”.

En el caso de las muestras arqueológicas correspondientes a los sitios “CH2D01- A” y “Laguna Tres Reyes I” se trabajó con extractos efectuados por Gonzalo Figueiro en el marco de su tesis de Doctorado. En el resto de los casos (“Yaguareté”, “Estancia Tabaré” y “Rincón de los Indios”) se realizó la extracción de ADN a partir de material óseo para su posterior análisis.

Tabla 1. Detalle de los individuos analizados

Individuo	Sitio	Ubicación geográfica	Fecha*	sexo original**	sexo cuantitativo***
TR6	Laguna Tres Reyes I	Pcia. Bs As - Argentina	2245 ± 55	Masculino	s/d
TR8	Laguna Tres Reyes I	Pcia. Bs As - Argentina	2245 ± 55	Femenino	s/d
CH2D01-20	CH2D01 - A	Rocha - Uruguay	1610 ± 46	Femenino	Masculino
Tabaré	Estancia Tabaré	Río Negro - Uruguay	s/d	s/d	s/d
LH-III-2	Rincón de los Indios	Rocha - Uruguay	2800	s/d	s/d
Yaguareté	Yaguareté	Río Negro - Uruguay	s/d	s/d	s/d

*expresado en años A.P. Datos tomados de: Madrid y Barrientos 2000 para TR6 y TR8, Gianotti y López 2009: pág. 175 para LH-III-2, Sai et al. 2012 para CH2D01-A individuo 20.

**refiere al presente en la bibliografía (Madrid y Barrientos 2000, Figueiro y Sans 2011, Sans et al. 2012), s/d indica que no se encontraron antecedentes de análisis realizados o que no se pudo analizar por carecer de piezas diagnósticas.

***Figueiro y Sans 2011, s/d indica que no había piezas útiles para el análisis.

3.2 Extracción de ADN

La extracción de ADN fue realizada a partir de material óseo. No fue necesaria la destrucción de piezas óseas o dentales sino que se tomaron pequeños fragmentos de hueso que ya se encontraban fraccionados y que no resultaban de interés para otros estudios bioarqueológicos. Para cada individuo se utilizaron fragmentos óseos con un peso total de 1 gramo.

Las extracciones se llevaron a cabo en las instalaciones del Laboratorio de ADN Antiguo del Departamento de Antropología Biológica, FHUCE, en Montevideo. Estas instalaciones se encuentran en un área aislada, y cuentan con los implementos necesarios para minimizar la posibilidad de contaminación con ADN moderno. Durante el trabajo en el laboratorio se tomaron todas las precauciones prácticas para minimizar la contaminación (uso de mameluco con capucha, cubrezapatos, tapabocas y guantes de látex descartables, encendido de la luz UV 10 minutos antes del ingreso y después de la salida del laboratorio, y limpieza sistemática de las superficies antes y después de cada sesión de trabajo con hipoclorito de sodio al 5% v/v, irradiación del instrumental con UV localizado).

Preparación de las muestras óseas: inmersión breve en hipoclorito de sodio al 5% (v/v) durante 20 minutos, seguida de un enjuague con agua destilada para eliminar ADN moderno contaminante (Kemp y Smith 2005). Se trabajó en cada ocasión con no más de 3 muestras totalizando 2 extracciones.

La primera etapa de la extracción de ADN a partir de material óseo consiste en la inmersión del hueso (entero, fragmentado o pulverizado) en EDTA 0.5 M (pH 8.0) a fin de reducir su matriz mineral, procediéndose luego a la eliminación de la matriz proteica mediante tiocianato de guanidinio (GuSCN) o Proteinasa K (O'Rourke et al. 2000). En este caso se empleó un método mixto, de digestión simultánea con EDTA y Proteinasa K, para luego emplear GuSCN con una suspensión de sílice a fin de maximizar la recuperación de ADN (Boom et al. 1990; Höss y Pääbo 1993; Rohland y Hofreiter 2007).

En todos los casos en que se realizaron extracciones de ADN se incluyó un control negativo de extracción, esto es, se parte de un tubo que contiene todos los reactivos y atraviesa todas las etapas de extracción, pero que contiene agua desionizada en lugar de ADN. El control negativo se utiliza para detectar una posible contaminación, ya sea cruzada (entre muestras) o con ADN exógeno (por ejemplo contaminación causada por la manipulación del personal investigador).

En virtud de los potenciales factores inhibidores de la reacción de PCR en el extracto, así como el carácter inhibidor de la propia suspensión de sílice utilizada en el protocolo de extracción (O'Rourke et al. 2000), se emplearon diferentes diluciones del extracto original en la reacción de PCR. A través de la experimentación con diferentes diluciones se logró identificar aquellas que resultaron más eficientes para la amplificación de estos segmentos en particular.

3.3 Amplificación por PCR

La amplificación del ADN por PCR se realizó utilizando un único par de cebadores específicos para la replicación de un fragmento homólogo del gen de la amelogenina ubicado en los cromosomas X e Y. El fragmento se encuentra localizado en el intrón 1 de dicho gen y presenta una delección de 6 pb en el cromosoma X que no existe en el cromosoma Y. Los cebadores utilizados fueron los diseñados por Manucci et al. (1994). Los productos de PCR esperados son de 106 pb para el cromosoma X y 112 pb para el cromosoma Y. Luego de la electroforesis, los productos esperados en el gel son: una sola banda para los individuos femeninos (2 fragmentos del mismo tamaño correspondientes a los dos cromosomas X que se visualizan como una sola banda) y dos bandas para los masculinos (correspondientes a los cromosomas X e Y) (Figura 2). La ausencia del alelo masculino, debe tratarse con cuidado ya que la no presencia puede deberse a las dificultades inherentes al trabajo con ADNa, por lo que resulta necesario controlar las condiciones para una correcta amplificación de los heterocigotos.

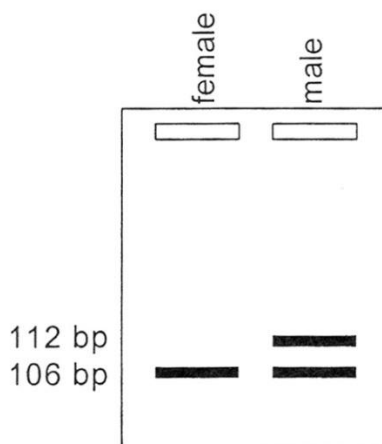


Figura 2. Resultados esperados para individuos masculinos y femeninos tras electroforesis a partir de la amplificación del intrón 1 de la amelogenina con cebadores diseñados por Manucci et al. (1994). Imagen tomada de Hummel (2003).

3.3.1 Amplificación por PCR en individuos modernos

Las reacciones de PCR se realizaron con un volumen final de 20 μ l conteniendo: Dream buffer PCR 10x (Fermentas), $MgCl_2$ 25 mM, albúmina sérica bovina (BSA) 10 mg/ml, cebadores 25 μ M cada uno (directo e inverso), 2mM de cada nucleótido en forma de desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs), agua ultrapura especial para PCR libre de libre ADNasas y RNAsas, Dream Taq polimerasa (Fermentas) y ADN. Las concentraciones detalladas corresponden a la concentración stock de los reactivos utilizados.

Se fueron variando algunas condiciones hasta lograr una amplificación óptima de las muestras de los individuos modernos seleccionadas. Las condiciones con las que se experimentó fueron: concentración de $MgCl_2$, concentración de

dNTPs, tiempos de ciclado y temperatura de hibridación del cebador con el ADN molde. La cantidad de ciclos se ajustaron desde 35 (Mannucci et al. 1994) hasta 30, siendo este último el ciclado más eficiente. En cuanto a la temperatura de hibridación se comenzó con 62°C, 3°C por encima de la temperatura de fusión (T_m) llegando a determinar empíricamente que el mejor rendimiento se obtenía utilizando una temperatura de 57°C.

3.3.2 Amplificación por PCR en individuos antiguos

Partiendo de los resultados obtenidos durante la optimización de la técnica en individuos modernos y de las condiciones descritas en la bibliografía (Mannucci et al. 1994; Bizcarra et al. 2002) se procedió a la amplificación del ADN. Se debieron ajustar las condiciones para lograr resultados satisfactorios. El ADN tiene, como ya se mencionó, la característica de ser escaso y de encontrarse altamente fragmentado, razón por la cual esta etapa es también crítica con respecto a la contaminación, y deben tomarse precauciones durante la preparación de la PCR para minimizar las probabilidades de que las muestras resulten contaminadas. Esta etapa de trabajo, así como las extracciones, también fue realizada en las instalaciones del Laboratorio de ADN Antigo del Departamento de Antropología Biológica, utilizando equipamiento específico para esta tarea.

Se utilizaron en algunos casos reactivos especiales como Taq polimerasa diseñada para activarse a temperaturas mayores de 90°C (*HotStart* Taq, Fermentas), con el fin de minimizar la formación inespecífica de productos de partida. En cada PCR se incluyeron dos controles positivos y un control negativo. Los controles positivos fueron reacciones con ADN de individuos de sexo conocido para control interno de éxito de la PCR; en este caso, se incluyó un control XX y uno XY a fin de verificar una correcta amplificación y visualización en el gel de los dos productos de PCR esperados (112 y 106 pb), además de servir como marcador de peso molecular y control de amplificaciones inespecíficas. Todos los controles positivos fueron agregados fuera del laboratorio de ADN. Para cada individuo se realizaron por lo menos cuatro amplificaciones independientes con el fin de evitar falsos resultados en la determinación de sexo.

Al igual que en la etapa de optimización de la amplificación por PCR con muestras de ADN moderno se ajustaron las condiciones de la reacción y del programa de amplificación (temperatura de hibridación, tiempo y cantidad de ciclos).

Se ha demostrado que la utilización de BSA en las reacciones de PCR mejora la eficiencia ante la presencia de inhibidores de diversa índole (Kreader 1996). Por lo tanto, en las reacciones de PCR con ADN, se experimentó con distintas concentraciones BSA por volumen final de reacción. También se ensayaron distintas concentraciones de $MgCl_2$. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 30 μL adicionando 10 μL de ADN por reacción. Fue necesario trabajar con este volumen de ADN ya que partimos de bajas

concentraciones, especialmente al trabajar con ADNn. Se utilizaron 2 unidades de Taq polimerasa por reacción.

La amplificación se realizó con ciclos idénticos a los utilizados para individuos modernos, pero se aumentó a 60 la cantidad de repeticiones (Bizcarra et al. 2002) siendo éste el mínimo de repeticiones con las que se observó algún resultado. Fue necesario realizar además una segunda fase de amplificación de 40 ciclos para lograr una visualización adecuada de los resultados en el gel (Lassen et al. 1996; Stone et al. 1996). Las reamplificaciones se realizaron para un volumen final de 25 μ L, con las mismas condiciones que la primera etapa de amplificación y con la misma proporción de ADN, pero utilizando en este caso producto de la amplificación anterior y *Dream Taq Polimerasa* (Fermentas).

Para cada individuo se realizaron 2 amplificaciones independientes de dos extractos independientes y de cada una de ellas se realizaron 2 reamplificaciones, logrando de esta manera 4 PCRs, por lo que generalmente se exigen 3 amplificaciones como mínimo para la validación de los resultados al trabajar con material genético antiguo (Hummel 2003).

3.3.3 Identificación de los productos de PCR

Los productos de PCR se visualizan por electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida mediante la tinción con colorantes específicos como el bromuro de etidio o nitrato de plata. Siguiendo las recomendaciones de Manucci et al. (1994), se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 4% (p/v) por 90 minutos a un voltaje constante de 100 V. Se empleó la tinción con bromuro de etidio para la visualización de los productos en un transiluminador UV. Sin embargo, debido a la pequeña diferencia en tamaño de los fragmentos correspondientes a cada cromosoma (6 pb), se optó por la realización de electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE), ya que es una técnica de alta sensibilidad, adecuada para el trabajo con moléculas de tamaño pequeño. También para esta técnica se ajustaron de forma experimental las condiciones como la concentración del gel, el tiempo de corrida y el volumen de muestra cargada (Sambrook et al. 1989).

Durante los experimentos iniciales se realizaron geles de poliacrilamida (Acrilamida: BisAcrilamida 29:1) de concentración homogénea al 12% (p/v) (Bizcarra et al. 2002) que se corrieron por 4.5 hs a un voltaje constante de 80 V, tiempo que se determinó controlando el frente de avance del azul de bromofenol y el xileno cianol contenidos en el buffer de carga que se agregó a las muestras para aplicarlas al gel. La tinción fue realizada con nitrato de plata (Sanguinetti et al. 1994). También se experimentó con geles discontinuos (formados por dos geles con diferente porosidad), compuestos de un gel concentrador al 5% (p/v) y un gel separador al 12% (p/v) y se corrieron por 4.5 hs, al mismo voltaje. En ninguno de los casos se logró la separación de las bandas, por lo que se consideró necesario aumentar la densidad, de manera de lograr una mayor fricción de las moléculas entre los poros. Al aumentar la densidad del gel, se debió aumentar a su vez el

tiempo de corrida, ya que la velocidad de migración de las moléculas será más lenta por encontrarse en un medio con mayor fricción (García 2000).

Los experimentos siguientes se realizaron con geles de poliacrilamida (Acrilamida: BisAcrilamida 19:1) al 16%, de concentración homogénea, aumentándose el tiempo de corrida a 6.5 hs a 80 V, el cual fue determinado nuevamente monitoreando el frente de avance del azul de bromofenol y el xileno cianol.

Se experimentó además con la cantidad de producto de PCR utilizado en el gel para su visualización a fin de lograr un resultado nítido procurando evitar la obtención de resultados ambiguos que puedan llevar a generar errores a la hora de determinar el genotipo de un individuo. Se observó que al cargar grandes cantidades de ADN amplificado de individuos contemporáneos (8 μ L o más), las bandas eran demasiado gruesas, pudiendo dar lugar a confusión especialmente en los casos XY, ya que al teñirse, si ambas bandas son muy grandes, pueden resultar como una gran mancha y no como dos bandas bien definidas. A consecuencia de ello se realizó un gel donde se cargaron 4 μ L de todas las muestras amplificadas en esta etapa utilizando diluciones en serie: sin diluir, 1:2, 1:4 y 1:8 para cada una.

4. Resultados

4.1 Estandarización de las técnicas

Tanto las condiciones de PCR como las condiciones para la visualización de los productos de amplificación en gel de poliacrilamida debieron ajustarse empíricamente para lograr un óptimo rendimiento para la determinación molecular del sexo empleando el locus de la amelogenina.

Al variar la procedencia del ADN molde del que se parte (ADNa o ADN moderno), las condiciones para su amplificación debieron modificarse. Se realizaron por lo tanto dos estandarizaciones para las reacciones de PCR, una para amplificar ADN moderno y otra para amplificar ADN altamente degradado y en bajas concentraciones como es el caso del ADNa. Para la electroforesis de los productos de la amplificación no es necesaria esta distinción, y una estandarización general resulta adecuada para la visualización de dichos productos de PCR.

4.1.1 PCR con muestras de ADN moderno

Las condiciones que se concluyeron como óptimas para la reacción de PCR fueron: 10% de buffer 10X (Fermentas), 2,0 mM de MgCl₂ (incluido en el buffer con una concentración de 20 mM), 2 μ g de BSA, 0,25 μ M de cada cebador (F y R), 150 μ M de cada dNTP, 1 Unidad de Dream Taq Polimerasa (Fermentas) y 2 μ L de ADN, completándose el volumen de reacción con agua ultrapura para PCR a un volumen final de 20 μ L.

Condiciones de ciclado de la PCR: 5 minutos de desnaturalización a 94°C, seguido por 30 ciclos de 30 segundos a 94°C (desnaturalización), 30 segundos a 57°C (hibridación) y 20 segundos a 72°C (extensión), finalizando con una extensión de 5 minutos a 72°C.

En los experimentos en los que se utilizaron 35 ciclos se observó, para los individuos femeninos, la presencia de una banda inespecífica similar a la banda de 112 pb correspondiente al cromosoma Y. En esta etapa fue posible distinguir el error ya que todas las muestras utilizadas eran de sexo conocido. Si bien, siempre que se encontró presente, su intensidad fue menor a la que presentaría un individuo de sexo masculino y en la posición correspondiente a un fragmento de ADN un poco más largo, el fenómeno podría producir errores en la determinación del genotipo. Este fenómeno fue eliminado al reducir a 30 el número de ciclos. Debe mencionarse que en la bibliografía consultada al respecto no se encontró ninguna referencia sobre el fenómeno observado.

4.1.2 PCR con muestras de ADN antiguo

Se experimentó con diferentes concentraciones de BSA para la amplificación del ADN. Las reacciones que mostraron mejor rendimiento fueron aquellas en las que se utilizó mayor cantidad de BSA encontrándose una concentración óptima de 6 ug.

De las distintas concentraciones empleadas de MgCl₂ (1,5, 2,0, 2,5 y 3,0 mM), resultó óptima la misma concentración que se había establecido durante los experimentos anteriores con ADN moderno: 2,0 mM.

Debieron realizarse experimentos para determinar la cantidad mínima de ADN por reacción necesaria para la amplificación y la dilución del extracto a emplear. Esta relación no es uniforme para todas las muestras y depende del estado de preservación del material genético de cada individuo por lo que la dilución óptima de trabajo debe establecerse para cada muestra en particular. Asimismo no pueden ser tomados como referencia los protocolos para amplificación de ADNmt ya que éste se encuentra en múltiples copias por célula por lo que resultará siempre más abundante. A partir de la experimentación con diferentes diluciones de los extractos de ADN, se observó que los mejores resultados se conseguían al utilizar los extractos sin diluir o en una dilución de 1:10, para la gran mayoría de las muestras, logrando un equilibrio entre cantidad de ADN y cantidad de inhibidores. En general se estableció empíricamente que 10 µL de ADN para un volumen total de 30 µL eran suficientes para la amplificación de este segmento.

Las amplificaciones por PCR de ADN se realizaron en dos etapas: una primera de 60 ciclos y a continuación una reamplificación de 40 ciclos. Las condiciones de los ciclos fueron las mismas que las empleadas con ADN moderno siendo de señalar el cambio de la temperatura de hibridación, la cual se optimizó

en 55°C, dos grados por debajo de la temperatura óptima para las reacciones de amplificación con ADN moderno.

Si bien inicialmente se planteó la realización de 4 PCR independientes para la validación de los resultados, en la práctica para la mayoría de las muestras se debió aumentar la cantidad de PCR realizadas debido a que en algunos casos no se observaron resultados en las primeras 4 amplificaciones, lo que es común en el trabajo con ADN.

4.1.3 Electroforesis

En las primeras electroforesis realizadas en geles de agarosa al 4% (p/v) (Manucci et al. 1994) se observaron bandas correspondientes a los productos de amplificación por PCR aunque no se logró mediante este método una separación apreciable de las bandas de amplificación correspondientes a los cromosomas X e Y.

La correcta visualización y diferenciación de las bandas de 106 pb y 112 pb de amelogenina correspondientes a los cromosomas X e Y respectivamente se obtuvo en geles de poliacrilamida (Acilamida: BisAcilamida 19:1) al 16% (p/v) con un tiempo de corrida de la electroforesis de 6.5 hs a un voltaje constante de 80 V.

Se observó en las electroforesis una cantidad importante de producto inespecífico, posiblemente causado por el elevado número de ciclos de amplificación por PCR practicados. Teniendo en cuenta que al trabajar con ADN nuclear se parte de muy bajas concentraciones de ADN, se justifica la necesidad de mantener estos parámetros, que experimentalmente se establecieron como necesarios para la obtención de resultados.

En cuanto a la cantidad de producto de amplificación por PCR cargado en cada pozo del gel, los mejores resultados se obtuvieron con diluciones 1:2 y con el producto sin diluir. Para las muestras en que se partía de ADN de alta calidad y/o en altas concentraciones (extractos realizados a partir de sangre) se observaron resultados aceptables para las 4 diluciones empleadas. Sin embargo para aquellas en que el ADN era de menor pureza (como los extractos realizados a partir de folículo piloso) no se observaron resultados para las diluciones de 1:4 y 1:8. Experimentalmente se determinó que el volumen de producto de amplificación a cargar en el gel debía ser de aproximadamente 4 µL y en una dilución no mayor a 1:2. Para los productos de reamplificación de ADN antiguo se trabajó siempre con el producto original sin diluir y un incremento en 1 µL más fue suficiente para alcanzar una visualización adecuada en el gel (5 µL en total).

4.2 Determinación de sexo

Los resultados obtenidos para las muestras de individuos contemporáneos fueron coincidentes con el sexo biológico en todos los casos, confirmando la fiabilidad de la técnica en esta etapa. La dificultad en la amplificación tuvo importantes variaciones entre las muestras arqueológicas; aunque se lograron resultados para todos los individuos, estos fueron a veces contradictorios. En la tabla 2 se muestran los resultados de las amplificaciones exitosas de cada muestra.

Tabla 2. Resultados obtenidos de los productos de amplificación por PCR para cada individuo y determinación del sexo molecular

ID	sexo morfológico	PCR 1	PCR 2	PCR 3	PCR 4	PCR 5	PCR 6	Sexo molecular
TR6	Masculino	X Y	X Y	X Y				Masculino
TR8	Femenino	X X	X Y	X X				Femenino
CH2D01-20	Femenino	X X	X X	X X	X X			Femenino
Yaguareté	s/d	X Y	X Y	X X	X X	X Y	X Y	Masculino
Tabaré	s/d	X Y	X Y	X X	X X	X X	XY	Indeterminado
LI-III-2	s/d	X Y						Indeterminado

Por lo menos 3 amplificaciones exitosas se consideraron necesarias para un diagnóstico de sexo molecular aceptable, siendo el resultado final el mayoritario. Para lograr este objetivo fueron necesarias múltiples repeticiones en la mayoría de los casos, excepto para la muestra del sitio “CH2D01-A” que mostró un excelente rendimiento observándose resultados en las 4 primeras PCR y siendo siempre coincidentes. Asimismo, varias repeticiones fueron descartadas por encontrarse contaminación en el control negativo, lo que aumentó el número de repeticiones necesarias para la obtención de resultados válidos. El requisito de un mínimo de 3 amplificaciones se cumplió en todos los casos, menos para la muestra de “Rincón de Los Indios”.

Los individuos que contaban con determinación de sexo por métodos tradicionales son dos procedentes del sitio “Laguna Tres Reyes I” (TR1, muestras TR6 y TR8) (Madrid y Barrientos 2000) y uno del sitio “CH2D01-A” (Femenías et al. 1990). Según Madrid y Barrientos (2000) las muestras TR6 y TR8 corresponden a un individuo masculino y a uno femenino respectivamente (no se especifica el método de determinación de sexo utilizado). La tasa de éxito en la amplificación, definida por el porcentaje de amplificaciones exitosas (amplificaciones con resultados positivos para la banda X o Y, o ambas) del total de amplificaciones realizadas, fue de 30% para TR6 y de 50% para TR8. Los pocos resultados obtenidos para TR6 fueron sin embargo coherentes en todos los casos con la determinación de sexo molecular masculino. Para TR8 se ven inconsistencias en

los resultados al mostrar un resultado XY, en contraste con el resto que indican un sexo molecular XX.

Para los individuos de los sitios “Estancia Tabaré” y “Yaguareté”, se obtuvieron 6 amplificaciones para cada uno, con una tasa de éxito entre 30% y 40%. Las inconsistencias en los resultados no permitieron generar un diagnóstico en el caso de la muestra del sitio “Estancia Tabaré”, pero se determinó como masculino el sexo para Yaguareté por la amplificación del alelo correspondiente al cromosoma Y en 2/3 de los casos. De las amplificaciones practicadas para LI-III-2, se observaron resultados en una única ocasión, mostrando un genotipo masculino, aunque el resultado no puede considerarse válido según los estándares para ADN debido a que no fue posible su replicación.

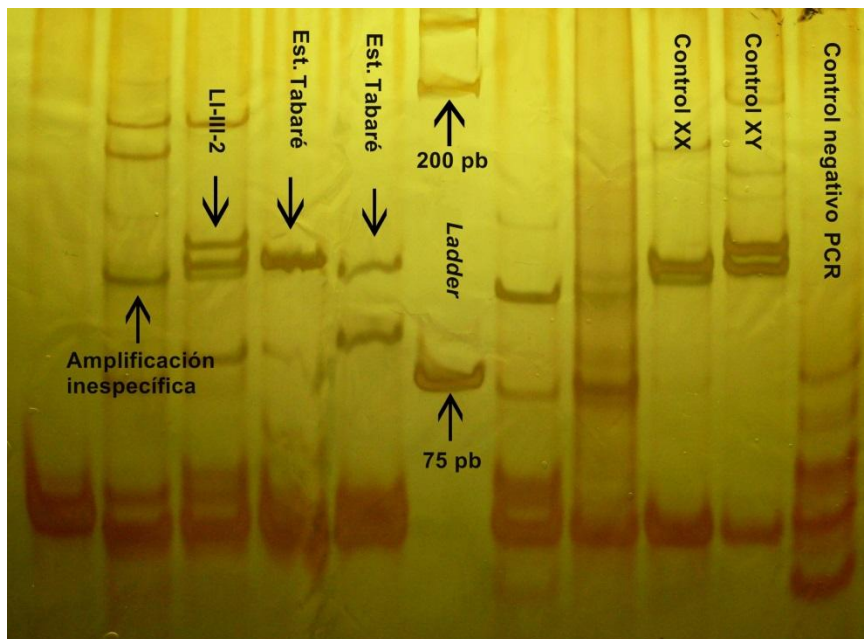


Figura 3. Amplificación por PCR del gen de la amelogenina en gel de poliacrilamida al 16%. Carriles (de izquierda a derecha): 1) Yaguareté (no se observa ADN), 2) LI-III-2 (extracción 1) (amplificación inespecífica), 3) LI-III-2 (extracción 2) (dos bandas, correspondientes a sexo masculino) 4) Estancia Tabaré (extracción 1) (banda única correspondiente a sexo femenino), 5) Estancia Tabaré (extracción 2) (igual a anterior), 6) Marcador de peso molecular (*Ladder*), 7) Blanco de extracción (las bandas observadas son inespecíficas), 8) Control negativo de PCR (primera etapa 60 ciclos + segunda etapa 40 ciclos) (igual a anterior), 9) Control Positivo de PCR XX (una banda), 10) Control positivo de PCR XY (dos bandas), 11) Control negativo PCR (segunda etapa 40 ciclos) (bandas inespecíficas).

5. Discusión

Entre los restos arqueológicos del Uruguay se ha señalado un exceso de individuos masculinos, particularmente para la región este (Sans 1988; Figueiro y Sans 2011). Figueiro y Sans (2011), descartando la posibilidad de que el sesgo sea de origen clasificatorio y/o muestral, plantean la hipótesis de que el fenómeno sea una expresión cultural, como la inhumación preferencial de individuos masculinos en las estructuras monticulares que caracterizan a los sitios de la región este. Considerando que en el Uruguay los restos óseos se encuentran por lo general en mal estado de preservación, y que esto ha afectado la posibilidad de realizar estimaciones de sexo en un alto porcentaje de restos (Pintos y Bracco 1999; Sans y Femenías 2000; Gianotti et al. 2009), la técnica estandarizada podrá ser utilizada como método independiente para adicionar datos que no pudieron ser incluidos en el análisis por el estado de deterioro de los restos o por encontrarse incompletos, con el objetivo de contrastar la hipótesis planteada. A su vez servirá como un método independiente para las estimaciones de sexo por métodos morfológicos (Figueiro y Sans 2011).

La determinación del sexo para las muestras analizadas se logró en el 67% de los casos. Las tasas de éxito en amplificaciones de ADNn suelen ser por lo general muy variables entre diferentes investigaciones, tanto para ADNmt como para ADNn. Para trabajos de determinación de sexo por amplificación de ADNn nuclear (mediante la amplificación de diferentes loci, entre ellos el de la amelogenina) se han registrado tasas de éxito de 100% (Götherström et al. 1997), 95% (Stone et al. 1996), 81% (Faerman et al. 1995), 78% (Arslan et al. 2011) y 42% (Mays and Faerman 2001). Los trabajos de ADNmt muestran también gran variabilidad, desde 32% de éxito (Lalueza-Fox et al. 2003) hasta un 100% (Monsalve et al. 1996) para muestras americanas, reseñadas en detalle en Figueiro 2006.

Se encontró una relación entre el rendimiento en la amplificación y las condiciones de preservación de las muestras. Los individuos recuperados en los sitios “Laguna de Tres Reyes I” y “CH2D01-A” se encuentran en general en buen estado de conservación y muy completos (Madrid y Barrientos 2000; Sans y Femenías 2000). Estos a su vez mostraron el mejor rendimiento en la amplificación molecular lográndose la determinación del sexo en todos los casos, con resultados robustos sin inconsistencias en dos de ellos (TR6 y CH2D01-A individuo 20). Entre las otras muestras, Yaguareté y Estancia Tabaré presentan un estado de preservación pobre y tuvieron en general tasas de éxito menores y amplificaciones contradictorias, lo que no permitió establecer un diagnóstico del sexo para el individuo del sitio “Estancia Tabaré”. Las amplificaciones practicadas para las muestras del individuo LI-III-2 fueron las que mostraron menor rendimiento, con un único resultado. Como ya fue señalado, los restos del individuo LI-III-2 son los que se encuentran en peores condiciones de conservación.

Varios autores han señalado que no es la antigüedad el principal factor que determina la posibilidad de preservación y amplificación de ADNn, sino que más

importante es el estado de conservación (Pääbo 1989, O'Rourke et al. 2000, Bizcarra et al. 2002). En el presente estudio la relación entre la conservación y el rendimiento en la amplificación por PCR es clara, aunque no se logró analizar la relación entre la antigüedad de los restos y el rendimiento en la recuperación y amplificación de ADNn al no contar con los datos necesarios.

El sexo molecular de los dos individuos analizados del sitio "Laguna Tres Reyes I" pudo ser estimado, siendo en ambos casos coincidente con el sexo estimado por métodos morfológicos. Debe destacarse que si bien la muestra TR6 no tuvo una alta tasa de éxito en las amplificaciones realizadas, los resultados obtenidos fueron en todos los casos idénticos, indicando un genotipo XY (masculino). El resultado inferido es a su vez coherente con los datos de sexo estimados para este individuo en base a sus características morfológicas. Para la muestra TR8 se obtuvieron como en el caso anterior tres resultados de amplificación, aunque la cantidad de PCRs necesarias para alcanzarlos fue menor. Como ya fue señalado entre los resultados obtenidos encontramos inconsistencias, mostrando en un caso un genotipo XY, y en los otros dos casos genotipos XX, indicando mayoritariamente sexo molecular femenino. La amplificación de la banda de 112 pb puede haber sido causa de contaminación cruzada entre muestras durante la realización de la PCR o incluso durante el sembrado del gel. No debe descartarse el caso inverso en el cual la banda Y sería auténtica y que por azar haya fallado en la amplificación en las otras dos reacciones de amplificación practicadas. Por los escasos resultados obtenidos no es posible estimar con un alto grado de certeza cuál de los dos resultados es más probable. Debido a que tenemos resultados de amplificación moleculares mayoritarios femeninos, asignamos el sexo biológico como probablemente XX a la muestra. Estos resultados son respaldados por el hecho de que se conoce la asignación del sexo morfológico del individuo, siendo éste femenino.

La estimación del sexo del individuo 20 del sitio "CH2D01- A" fue realizada empleando dos métodos morfológicos diferentes que mostraron resultados contradictorios. Las estimaciones realizadas por métodos morfológicos cualitativos indicaron como posible el sexo femenino (Femenías et al. 1996; Sans et al. 1997; Sans y Femenías 2000). Este mismo individuo fue examinado en el marco de una investigación llevada a cabo por Figueiro y Sans (2011) donde se aplicó un método cuantitativo de determinación de sexo (medidas osteométricas del postcráneo). En este caso y en contraste con la determinación anterior, se determinó la muestra como masculina. Los análisis moleculares para este individuo tuvieron una tasa de éxito del 100% habiéndose realizado 4 PCRs, siendo todas exitosas y con resultados coincidentes con un sexo molecular femenino. Los resultados moleculares coinciden con los obtenidos mediante métodos morfológicos cualitativos. Debe mencionarse que este fue el único caso en que se observó un rendimiento tan alto y que la muestra corresponde a restos óseos que se encuentran muy bien conservados.

De los seis individuos prehistóricos estudiados en este trabajo, el individuo CH2D01-20 es el único que ha sido analizado mediante ADNmt. Este individuo fue

incluido en una investigación llevada a cabo por Sans et al. 2012 en la cual se analiza un linaje exclusivo para el Uruguay, parte del subhaplogrupo mitocondrial C1d. Los autores identificaron la presencia del linaje en 5 individuos contemporáneos, para el cacique charrúa Vaimaca Perú y en dos individuos del sitio CH2D01-A, uno de ellos el CH2D01-20. Estos datos, según los autores, representan una continuidad genética entre los constructores de cerritos, el grupo étnico Charrúa y la población uruguaya actual, por vía materna. Para este linaje, el individuo CH2D01-20 sería el portador más antiguo (conocido hasta la fecha) (Sans et al. 2012).

Se ha comprobado en un principio la aplicabilidad de la técnica para el trabajo con restos óseos arqueológicos, dado que el sexo molecular inferido para los dos primeros casos (TR6 Y TR8) coincide con el sexo morfológico, y en el tercero (CH2D01-20), los datos moleculares confirman con gran robustez el sexo morfológico estimado a partir de métodos cualitativos. Debe destacarse que la fiabilidad de la técnica depende sensiblemente de la observación de una metodología de trabajo estricta y con especial atención en los controles de contaminación, para poder avalar la autenticidad de los resultados.

Dentro de la etapa de análisis de las muestras para las cuales no fue posible la determinación del sexo por técnicas morfológicas se analizaron los individuos: Yaguareté, Tabaré y LI-III-2, de los cuales únicamente contamos con información contextual para el individuo perteneciente al sitio “Rincón de Los Indios” (LI-III-2). Sobre el sitio Yaguareté se encuentra muy escasa información además de ser muy general y descriptiva (Boretto et al. 1973). El individuo de “Estancia Tabaré” pertenece a una colección privada por lo que no se cuenta con datos arqueológicos de ningún tipo.

Los restos de los sitios “Estancia Tabaré” y “Yaguareté” se encuentran con un alto grado de fragmentación y muy incompletos, y si bien pueden distinguirse algunas piezas óseas, estas se encuentran con un deterioro tal que no permiten aplicar técnicas de análisis para determinación del sexo a partir de su morfología. El individuo de Estancia Tabaré fue, sin embargo, analizado por Gonzalo Figueiro (inédito), quien realizó un análisis osteométrico de acuerdo a medidas previamente estudiadas (Figueiro y Sans 2011) de la diáfisis de los huesos largos (fémur, tibia, húmero, cubito y radio), pudiendo tomar 13 medidas para intentar determinar el sexo (todas las medidas a excepción del fémur correspondieron a piezas del lado izquierdo). A pesar de la escasez de las medidas disponibles se logró una aproximación, sugiriendo que los restos posiblemente pertenecen a una mujer robusta; sin embargo las probabilidades de la asignación son reducidas por la mala conservación de los restos y las pocas medidas con las que pudo ser realizado el análisis. Se consideró entonces adecuada la inclusión de este esqueleto para su análisis, sin embargo no fue posible la determinación de sexo molecular debido a las inconsistencias en los resultados obtenidos. El sexo de Yaguareté pudo ser determinado observándose un genotipo masculino en el 67% de los resultados obtenidos. Para Tabaré los resultados fueron inconsistentes, mostrando genotipos XX y XY en igual proporción. Las extracciones de ambos individuos (junto con LI-

III-2), fueron realizadas en conjunto, por lo que existe la posibilidad de que se haya producido contaminación cruzada entre muestras durante esta etapa. Siendo la muestra de Yaguareté masculino, los resultados XY que se obtuvieron en algunas reacciones de amplificación para Tabaré pueden ser producto de contaminación, descartando que la contaminación haya provenido de LI-III-2 ya que de éste solamente se obtuvo un resultado, indicando baja concentración de ADN y/o alto contenido de inhibidores. Considerando la posibilidad de contaminación de la muestra con ADN de Yaguareté, entonces los resultados poco consistentes observados se explicarían por la amplificación aleatoria de moléculas endógenas en algunos casos y de moléculas del individuo contaminante en otros. La contaminación puede haberse producido de igual manera (contaminación cruzada entre estos dos individuos) durante la etapa de PCR debido a que ambas muestras fueron amplificadas juntas en la mayoría de los casos. No debe descartarse tampoco la probabilidad de contaminación con ADN del personal masculino que manipuló las muestras durante la extracción o incluso la posibilidad de que la muestra se encontrara contaminada con ADN exógeno anterior al proceso de la extracción.

El individuo LI-III-2 corresponde a un enterramiento secundario (paquete funerario) levantado en pan de tierra en el año 1997 en el sitio “Rincón de los Indios” en el departamento de Rocha (Gianotti y López Mazz 2009). El enterramiento se encuentra ubicado en la base del cerrito III, evidenciando un tratamiento mortuario diferencial en comparación a los demás restos recuperados en el sitio (Gianotti 1998; López Mazz 2000; Gianotti y López Mazz 2004; Gianotti y López Mazz 2009). Este enterramiento es el único presente en esta elevación a diferencia de los otros cerritos del sitio donde se encontraron enterramientos múltiples, y sería el individuo más antiguo situado en el 2800 A.P. (Gianotti y López Mazz 2009:197). Además de las características mencionadas, el enterramiento cuenta con material cultural asociado, lo que podría considerarse como ajuar funerario (Gianotti y López Mazz 2009). En base a estas características, el enterramiento se ha interpretado como fundacional, relacionado con la construcción del cerrito (Gianotti y López Mazz 2009), lo que indicaría un estatus diferencial para este individuo. Luego de su recuperación arqueológica, el paquete funerario permaneció almacenado sin analizar y en condiciones no adecuadas para la conservación, expuesto a cambios de humedad y temperatura. Recientemente Natalia Azziz en el marco de su investigación para la obtención del grado de licenciada en ciencias antropológicas, ha retomado el estudio de este individuo, realizando su acondicionamiento, excavación y análisis tafonómico. El estado general de los conjuntos óseos del sitio se ha descrito como incompleto y con una alta tasa de fragmentación (Gianotti 1998; Gianotti y López Mazz 2009). Para este individuo en particular, la mala conservación señalada por los autores se vio acentuada por las inadecuadas condiciones de almacenamiento lo que resultó en un gran deterioro generándose el fraccionamiento de todas las piezas óseas presentes en pequeños fragmentos haciendo imposible su identificación. Es posible que la mala conservación de los restos haya sido la causa del bajo rendimiento en

la amplificación, dado que se obtuvo un único resultado mostrando un genotipo XY. Debido a la falta de datos se concluye como indeterminado ya que no fue posible la replicación del resultado. Por las características contextuales de recuperación de este enterramiento en particular ya descritas, el conocimiento del sexo aportaría un dato interesante para la lectura del registro y su interpretación arqueológica en relación a identidades y organización social. Lamentablemente no se pudo considerar como válido el resultado obtenido (masculino) por lo que el sexo de este individuo continúa siendo incierto. Sería recomendable la realización de una nueva serie de extracciones y amplificaciones independientes y aisladas de otras muestras óseas para este individuo.

5.1 Consideraciones respecto a la contaminación

Se trabajó para cada individuo con 2 extractos independientes de ADN (Faerman et al. 1995, Stone et al. 1996) para minimizar la posibilidad de obtener resultados erróneos por contaminación durante la extracción. Todas las extracciones resultaron limpias en el control de contaminación. Por este motivo resulta poco probable que los resultados contradictorios se hayan producido por contaminación en esta etapa, sin embargo, debe considerarse la posibilidad de contaminación cruzada entre muestras que no haya afectado al control de contaminación. Las PCRs se realizaron con un máximo de 6 muestras, tomando todas las precauciones posibles para minimizar la contaminación. Los controles positivos fueron agregados en el último paso de la preparación de la PCR, fuera del laboratorio de ADN donde se realizó la preparación de las reacciones de las muestras arqueológicas. Por este motivo no se considera la posibilidad de contaminación de las muestras de ADN con ADN de los controles durante la realización de la PCR, aunque sí existe la posibilidad de contaminación cruzada al ser cargadas en el gel, sin embargo no es de la más comprometida debido a que ya en esa etapa cada muestra se encuentra ya replicada. En cuanto al riesgo de contaminación del personal que manipuló las muestras, podríamos encontrar alelos Y por contaminación durante la extracción, ya que los extractos fueron realizados por un individuo de sexo masculino y uno femenino (Gonzalo Figueiro y Patricia Mut). Durante las reacciones de PCR, las muestras fueron manipuladas por una sola persona, de sexo femenino (Patricia Mut), lo que anula la posibilidad de observar un alelo Y producto de contaminación ocurrida en esta etapa.

5.2 Limitaciones de la determinación de sexo mediante la amplificación del locus de la amelogenina

Deben tenerse en cuenta varias consideraciones a la hora de asignar el sexo a una muestra de arqueológica mediante el empleo de la amelogenina como marcador del sexo molecular. Por las características ya reseñadas del ADN, puede ocurrir una falla en la amplificación de alguno de los alelos. En este caso y

debido a que la diferencia en tamaño es apenas de 6 pb, consideramos que ambos alelos tienen probabilidades de amplificación casi idénticas. La existencia de un alelo Y específico permite identificar a los individuos masculinos aunque el alelo correspondiente al cromosoma X falle. Esto no es posible para los individuos femeninos. En caso de que el alelo Y específico no se amplifique por azar el individuo no se distinguirá y puede ser asignado erróneamente al sexo femenino. Por ende, la asignación del sexo femenino debe ser confirmada mediante la replicación independiente de múltiples PCRs para descartar la falla en la amplificación del alelo Y por azar (Bizcarra et al. 2002, Hummel 2003).

Se han identificado otras causas de fallas en la amplificación de los segmentos del locus de la amelogénina que han llevado a la asignación errónea del sexo. Varios autores han documentado la presencia de deleciones o mutaciones puntuales en la región de hibridación de los cebadores que llevan a la falla en la amplificación del alelo presente en el cromosoma Y, causando una determinación de sexo errónea (Santos et al. 1998, Roffey et al. 2000, Steinlechner et al. 2002, Thangaraj et al. 2002). Sin embargo, las frecuencias de las fallas por estas causas son muy bajas: 0.018 en Austria (Steinlechner et al. 2002), 0% en Chinos y 0.88% en Malayos (Chang et al. 2003), aunque en poblaciones Indias las frecuencias son mayores: 3.57% (Chang et al. 2003), 1.85% (Thangaraj et al. 2002) y 8% en individuos de Sri Lanka (Santos et al. 1998). Se sugiere por estos motivos la utilización de otros métodos complementarios como STR Y específicos, por lo menos para algunas poblaciones y en casos críticos como suelen ser los casos forenses.

En el caso de las muestras arqueológicas este fenómeno no sería un gran inconveniente por su baja frecuencia; por lo menos en relación con las fallas en amplificación ocurridas por causa de la degradación del ADN, las cuales son significativamente más abundantes y generan el mayor obstáculo para la amplificación del ADN. Tanto por las mutaciones o deleciones como por las particularidades de la técnica, es recomendable, en la medida de lo posible, la implementación de una PCR-multiplex empleando STR para la identificación de alelos X e Y específicos para re-confirmar los genotipos obtenidos con el tipaje molecular de la amelogénina (Hummel 2003).

6. Conclusiones

Se ha estandarizado una técnica molecular para la determinación de sexo a partir de la amplificación por PCR de un segmento del gen de la amelogenina y se ha demostrado su aplicabilidad para determinar el sexo de restos arqueológicos (osteológicos).

Se logró identificar el sexo de 4 individuos prehistóricos, 3 de los cuales contaban con determinación de sexo por métodos morfológicos, siendo los resultados moleculares coincidentes con las estimaciones morfológicas cualitativas en todos los casos. No se pudo determinar el sexo de dos individuos. Para uno de ellos las inconsistencias en los resultados no permitieron generar un diagnóstico y en el otro caso no se lograron resultados suficientes para su validación debido a un bajo rendimiento en las amplificaciones por PCR.

Se encontró una relación entre el estado de preservación de los restos y el rendimiento de amplificación por PCR, pero no entre la antigüedad de los mismos y su rendimiento en los análisis moleculares, en principio a causa de la falta de fechados para dos de ellos.

La estandarización de la técnica, habilita la incorporación de la misma tanto en el diseño de investigaciones arqueológicas, como para la determinación de sexo en casos forenses particulares. A pesar de las limitaciones señaladas propias de la técnica, así como también las dificultades propias del trabajo con ADN, se considera que tiene potencial para ser aplicada en el marco de nuevas investigaciones, especialmente para los casos en los que la determinación de sexo no haya sido posible o que habiéndose aplicado, se concluye como indeterminado. Con el desarrollo de esta técnica se pretende fomentar la investigación en Uruguay en el área de la arqueología molecular, para la cual dejamos un antecedente con obtención de resultados para ADN nuclear, siendo de los primeros en el país.

Agradecimientos

El presente trabajo pudo ser realizado gracias al apoyo del Departamento de Antropología Biológica, que brindó los materiales necesarios para el trabajo de laboratorio, la disposición para el uso de las instalaciones de los laboratorios de ADN (antiguo y moderno), las muestras de ADN de individuos modernos y prehistóricos (CH2D01-20, TR6 y TR8) y las muestras óseas para la extracción de ADN (Yaguareté y Estancia Tabaré). Se agradece al Dr. José López Mazz y a Natalia Azziz por facilitar las muestras óseas para la extracción de ADN del individuo LI-III-2. El proyecto recibió financiamiento del Espacio Interdisciplinario (Universidad de la República) a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación Interdisciplinarios de Estudiantes de Grado (llamado 2012).

7. Referencias Bibliográficas

- Acsadi, György, János Nemeskéri, and Kornél Balás
1970 *History of Human Life Span and Mortality*. Akadémiai Kiadó, Budapest.
- Arslan, Serdal, Ayşen Açikkol, and Ertan Mahir Korkmaz
2011 The optimization of aDNA extraction protocol and sex determination of Bronze Age individuals from Oylum Höyük (Kilis , Turkey). *Turkish Journal of Biology* 35(6): 647–653.
- Bass, William M.
1971 *Human osteology: a laboratory and field manual of the human skeleton*. Missouri Archaeological Society, Columbia.
- Bizcarra, Nilda de, Ainhoa Alzualde, Santos Alonso, Neskuts Izagirre, and Concepción de la Rúa
2002 Amplificación del gen de la amelogenina y de una secuencia repetitiva alfoide del cromosoma-Y en restos arqueológicos del País Vasco. *XV Congreso de Estudios Vascos: Euskal zientzia eta kultura, eta sare telematikoak (Ciencia y cultura vasca, y redes telemáticas)* 15: 195–200.
- Boom, René, Cees Sol, Marcel M. M. Salimans, Casper L. Jansen, Pauline Wertheim-van Dillen, and Jan van der Noordaa
1990 Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of clinical microbiology* 28(3): 495–503.
- Boretto, René, Rosendo Bernal, Pedro I. Schmitz, e Itala Basile Becker
1973 Arqueología del Departamento de Río Negro. Esquema Tentativo de una Secuencia Cronológica para Sitios del Río Uruguay y Río Negro. *II Congreso Nacional de Arqueología III Encuentro de Arqueología del Interior*. Museo Municipal de Historia Natural de Río Negro, Fray Bentos.
- Byers, Steven N.
2002 *Introduction to forensic anthropology: A textbook*. Allyn & Bacon, Boston.
- Chang, Yuet Meng, Leigh a Burgoyne, and Katrin Both
2003 Higher failures of amelogenin sex test in an Indian population group. *Journal of forensic sciences* 48(6): 1309–1313.
- Faerman, Marina, Dvora Filon, Gila Kahila, Charles L. Greenblatt, Patricia Smith, and Ariella Oppenheim
1995 Sex identification of archaeological human remains based on amplification of the X and Y amelogenin alleles. *Gene* 167(1-2): 327–32.

Femenías, Jorge, José María López Mazz, Roberto Bracco Boksar, Leonel Cabrera, Carmen Curbelo, Nelsys Fusco y Martínez Elianne
1990 Tipos de enterramiento en estructuras monticulares (“cerritos”) en la región de la Cuenca de la Laguna Merín (R. O. U.). *Revista do CEPA* 17(20): 345–355.

Femenías, Jorge, Mónica Sans, Mónica Portas
1996 Enterramientos humanos en el montículo CH2D01, Departamento de Rocha, Uruguay. *Coleção Arqueologia Porto Alegre, EDIPUCRS*, 1(1): 503-518.

Figueiro Gonzalo

2006 *Estudio de las características y la continuidad de la población prehistórica de Arroyo Seco, Argentina, a través del ADN mitocondrial*. Tesis de maestría, PEDECIBA, Montevideo.

Figueiro, Gonzalo, Pedro C. Hidalgo, and Mónica Sans

2011 Control region variability of haplogroup c1d and the tempo of the peopling of the americas. *PloS one* 6(6): e20978.

Figueiro, Gonzalo y Sans Mónica

2011 *Determinación de sexo y proporciones sexuales en restos prehistóricos del Uruguay*. Colección Avances de Investigación, Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación, Montevideo.

Francès, Francesc, Castelló, Ana, Verdú, Fernando

2008 El diagnóstico genético del sexo mediante el test de la amelogenina: Métodos y posibles fuentes de error. *Cuadernos de Medicina Forense* 14(52): 119–125.

García, Hilda Marilín

2000 Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Universo Diagnóstico* 1(2): 31–41.

Gianotti, Camila

1998 *Ritual funerario y prácticas mortuorias en las tierras bajas de Uruguay. Trabajo de pasaje de curso*. Tesina de grado: Taller Arqueología II, Departamento de Antropología, Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación, Montevideo.

Gianotti, Camila y López Mazz, José María

2004 *Intensificación ceremonial y prácticas mortuorias en la localidad arqueológica Rincón de los Indios*, editado por Beovide L., Barreto I. y Curbelo M. C. (CD) “La Arqueología Uruguaya ante los Desafíos del Nuevo Siglo” X Congreso Nacional de Arqueología Uruguaya, Montevideo.

Gianotti, Camila y José María López Mazz

2009 Prácticas mortuorias en la localidad arqueológica Rincón de los Indios, Rocha, Uruguay. *Arqueología Prehistórica Uruguaya en el siglo XXI*, editado por José María Lopez Mazz y Andrés Gascue, pp. 151–196. Biblioteca Nacional y FHCE, Montevideo.

Götherström, Anders, Kerstin Lidén, Torbjörn Ahlström, Mari Källersjö, and Terence A. Brown

1997 Osteology, DNA and Sex Identification: Morphological and Molecular Sex Identifications of Five Neolithic Individuals from Ajvide, Gotland. *International Journal of Osteoarchaeology* 7(1): 71–81.

Graham, Eleanor A. M.

2007 DNA reviews: hair. *Forensic Science, Medicine, and Pathology* 3(2): 133–137.

Handt, Oliva, Matthias Höss, Michael Krings, and Svante Pääbo

1994 Ancient DNA: Methodological challenges. *Experientia* 50(6): 524–529.

Harris Marvin

1987 *Introducción a la antropología general*. Alianza, Madrid.

Hidalgo Pedro. C., Ackermann Elizabeth, Figueiro Gonzalo y Sans Mónica

2009 *Extracción y purificación de ADN de pelo a pH muy ácido*. Actas de las Novenas Jornadas Nacionales de Antropología Biológica, pp. 146, Puerto Madryn, Argentina.

Höss, Matthias, and Svante Pääbo

1993 DNA extraction from Pleistocene bones by purification method. *Nucleic acids research* 21(16): 3913–3914.

Hummel, Susanne.

2003 *Ancient DNA typing: methods, strategies and applications*. Springer, Berlín.

Kemp, Brian M, and David Glenn Smith

2005 Use of bleach to eliminate contaminating DNA from the surface of bones and teeth. *Forensic science international* 154(1): 53–61.

Kreader, Carol

1996 Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Applied and environmental microbiology* 62(3): 1102–1106.

Lalueza-Fox, Carles, M. Thomas P. Gilbert, Antonio J. Martínez-Fuentes, Francesc Calafell, and Jaume Bertranpetit

2003 Mitochondrial DNA from pre-Columbian Ciboneys from Cuba and the prehistoric colonization of the Caribbean. *American journal of physical anthropology* 121(2): 97–108.

Lassen, Cadja, Susanne Hummel, and Bernd Herrmann

1996 PCR Based Sex Identification of Ancient Human Bones by Amplification of X- and Y-Chromosomal Sequences: A Comparison. *Ancient Biomolecules* 1(1): 25–33.

López Mazz, José María

2000 Trabajos en Tierra y Complejidad Cultural en las Tierras Bajas del Rincón de los Indios. *Arqueología de las Tierras Bajas*, editado por Alicia Durán y Roberto Bracco Boksar, pp. 183–194. MEC, Montevideo.

Madrid, Patricia y Gustavo Barrientos

2000 La estructura del registro arqueológico del sitio Laguna de Tres Reyes 1 (Provincia de Buenos Aires): nuevos datos para la interpretación del poblamiento humano en el sudoeste de la región pampeana a inicios del holoceno tardío. *Relaciones de la Sociedad Argentina de Antropología XXV*: 197–206.

Mannucci, Armando, Kevin M. Sullivan, Pavel L. Ivanov, and Peter Gill

1994 Forensic application of a rapid and quantitative DNA sex test by amplification of the X-Y homologous gene amelogenin. *International journal of legal medicine* 106(4): 190–193.

Mays, Simon, and Marina Faerman

2001 Sex Identification in Some Putative Infanticide Victims from Roman Britain Using Ancient DNA. *International Journal of Osteoarchaeology* 28(5): 555–559.

Miller, Shirley A., Dale D. Dykes, and Herbert F. Polesky

1988 A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research* 16(3): 1215.

Monsalve, Maria Victoria, F. Cardenas, F Guhl, a D Delaney, and D V Devine

1996 Phylogenetic analysis of mtDNA lineages in South American mummies. *Annals of human genetics* 60(4): 293–303.

Murakami, Hiroto, Yuji Yamamoto, Kei Yoshitome, Toshiaki Ono, Osamu Okamoto, Yoshiaki Shigeta, Yusuke Doi, Satoru Miyaishi, and Hideo Ishizu

2000 Forensic study of sex determination using PCR on teeth samples. *Acta Medica Okayama* 54(1): 21–32.

Nakahori, Yutaka, Osamu Takenaka, and Yasuo Nakagome

1991 A Human X-Y Homologous Region Encodes “ Amelogenin”. *Genomics* 9(2): 264–269.

O'Rourke, Dennis H., M. Geoffrey Hayes, and Shawn W. Carlyle

2000 Ancient DNA Studies in Physical Anthropology. *Annual Review of Anthropology* 29: 217–242.

Pääbo, Svante

1989 Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86(6): 1939–1943.

Pääbo, Svante, Hendrik Poinar, David Serre, Viviane Jaenicke-Despres, Juliane Hebler, Nadin Rohland, Melanie Kuch, Johannes Krause, Linda Vigilant, and Michael Hofreiter

2004 Genetic analyses from ancient DNA. *Annual review of genetics* 38: 645–679.

Pintos Sebastián y Roberto Bracco

1999 Modalidades de enterramientos y huellas de origen antrópico en especímenes óseos humanos. Tierras bajas del este del Uruguay (ROU). *Arqueología y Bioantropología de las Tierras Bajas*, Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación, Montevideo.

Roffey, Paul E, Carmen I. Eckhoff, and Joy L. Kuhl

2000 A rare mutation in the amelogenin gene and its potential investigative ramifications. *Journal of Forensic Sciences* 45(5): 1016–1019.

Rohland, Nadin, and Michael Hofreiter

2007 Ancient DNA extraction from bones and teeth. *Nature protocols* 2(7): 1756–1762

Salido, Eduardo C, Pauline H Yen, Kathryn Koprivnikar, Loh-chung Yu, and Larry J Shapiro

1992 The Human Enamel Protein Gene Amelogenin Is Expressed from Both the X and the Y Chromosomes. *American journal of human genetics* 50(2): 303–316.

Sambrook, Joseph, Edward F. Fritsch, and Thomas Maniatis.

1989 *Molecular cloning: A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sanguinetti, Carlos J., Emmanuel Dias Neto, and Andrew J. G. Simpson

1994 Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *BioTechniques* 17(5): 914–921.

Sans Mónica

1988 *Las poblaciones prehistóricas del Uruguay*. Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación, Montevideo.

Sans, Mónica, Jorge Femenías, Mónica Portas, e Isabel Barreto

1997 Modo de vida de una población prehistórica del Uruguay: Una perspectiva socioeconómica. *Estudios de Antropología Biológica*, vol. 8, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto Nacional de Antropología e Historia, México.

Sans, Mónica y Jorge Femenías

2000 Subsistencia, movilidad y organización social en el sitio monticular CH2D01-A (Rocha, Uruguay): inferencias a partir de las pautas de enterramiento y los restos esqueléticos. *Arqueología de las Tierras Bajas*, editado por Alicia Durán and Roberto Bracco Boksar, pp. 385–396. MEC, Montevideo.

Sans, Mónica, y Mónica Portas

2001 Determinación del sexo en restos esqueléticos: morfología vs biología molecular. *Arqueología uruguaya hacia el fin del milenio, Anales del IX Congreso Nacional de Arqueología*, Colonia 1997, Linardi y Risso, Tomo I, Montevideo.

Sans, Mónica, D Andrew Merriwether, Pedro C Hidalgo, Nilo Bentancor, Tania A. Weimer, María Helena L.P. Franco, Ines Alvarez, Brian M. Kemp, and Francisco M. Salzano

2006 Population Structure and Admixture in Cerro Largo , Uruguay , Based on Blood Markers and Mitochondrial DNA Polymorphisms. *American Journal of Human Biology* 18(4): 513–524.

Sans, Mónica, Gonzalo Figueiro, Carlos Sanguinetti, Lourdes Echarte-raffaelli, Isabel Barreto, Pedro C Hidalgo, and Guido Berro

2010 The “last Charrúa Indian” (Uruguay): analysis of the remains of Chief Vaimaca Perú. *Nature Precedings*

<http://precedings.nature.com/documents/4415/version/1>

Sans, Mónica, Gonzalo Figueiro, Elizabeth Ackermann, Isabel Barreto, Ana Egaña, Bernardo Bertoni, Enrique Poittevin-Gilmet, Danilo Maytia, and Pedro C. Hidalgo

2011 Mitochondrial DNA in Basque descendants from the city of Trinidad, Uruguay: Uruguayan- or Basque-like population? *Human biology* 83(1): 55–70.

Sans, Mónica, Gonzalo Figueiro, and Pedro C. Hidalgo

2012 A New Mitochondrial C1 Lineage from the Prehistory of Uruguay : Population Genocide , Ethnocide , and Continuity. *Human biology* 84(3): 287–305.

Santos, Fabricio R., Arpita Pandya, and Chris Tyler-Smith

1998. Reliability of DNA-based sex tests. *Nature genetics* 18(2): 103-103.

Scott, Eleanor

2001 Killing the female? Archaeological narratives of infanticide. *Gender and the Archaeology of Death*, pp. 1-22, AltaMira Press, Walnut Creek.

Steinlechner, Martin, Bernard Berger, Harald Niederstätter, and Walther Parson

2002 Rare failures in the amelogenin sex test. *International journal of legal medicine* 116(2): 117–120.

Stodder, Ann L. W.

2008 Taphonomy and the Nature of Archaeological Assemblages. *Biological Anthropology of the human skeleton*, pp.71-114 John Wiley and Sons Inc., Hoboken, New Jersey.

Stone, Anne C., George R. Milner, Svante Pääbo, and Mark Stoneking

1996 Sex determination of ancient human skeletons using DNA. *American journal of physical anthropology* 99(2): 231–238.

Sullivan, Kevin M., Armando Mannucci, Colin P. Kimpton, and Peter Gill

1993 A rapid and quantitative DNA sex test : fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin. *BioTechniques* 15(4): 636–641.

Thangaraj, Kumarasamy, Alla G. Reddy, and Lalji Singh

2002 Is the amelogenin gene reliable for gender identification in forensic casework and prenatal diagnosis? *International journal of legal medicine* 116(2): 121–123.

Ubelaker Douglas H.

1978 *Human Skeleton Remains: Excavation, Interpretation and Analysis*. Aldine Publishing Company, Chicago.