


# Diversidad genética de muestras arqueológicas humanas del nordeste de la provincia del Chubut (Patagonia argentina) durante el Holoceno (6000-200AP)



Camila Tamburrini\*

 <https://orcid.org/0000-0001-8197-973X>

Fecha de defensa: 11 de diciembre del 2023

Director: Dra. María Laura Parolin

Codirectora: Dra. Silvia L. Dahinten

Jurados: Dres. María Gabriela Russo, Michelle de Saint Pierre y Darío Gonzalo Cardozo

## Introducción

La provincia del Chubut, ubicada en Patagonia central argentina, ha sido objeto de extensas investigaciones arqueológicas y bioantropológicas con el fin de comprender los procesos de cambios culturales y biológicos de las poblaciones que la habitaron el Holoceno (ver Gómez Otero, 2006). Con el fin de complementar los estudios arqueológicos y bioantropológicos, la presente tesis doctoral tuvo como objetivo general caracterizar la diversidad genética de los linajes mitocondriales de las poblaciones humanas que habitaron el nordeste de la Patagonia central durante el Holoceno (6000-200 AP), mediante el análisis de mitogenomas obtenidos a partir de individuos tomados de una muestra poblacional del Repositorio Bioantropológico de Restos Humanos Arqueológicos, salvaguardado en el Instituto de Diversidad y Evolución Austral (IDEAus), del Centro Nacional Patagónico dependiente del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CCT CONICET-CENPAT) (Millán y Dahinten, 2019). Asimismo, las evidencias arqueológicas han demostrado: 1) dos grandes concentraciones de enterratorios que podrían estar indicando nodos poblacionales independientes (valle inferior del río Chubut –VIRCH– y Península Valdés –PV–) y 2) un aumento de la concentración de sitios a partir del Holoceno Tardío (3990-200 AP). Sobre la base de estos datos se evaluaron posibles variaciones en el acervo génico a escala microrregional y temporal.

## Aspectos teórico-metodológicos

### Toma de muestras arqueológicas

Se recolectaron un total de 60 muestras de individuos rescatados de 38 sitios arqueológicos de la provincia del

\* Facultad de Filosofía y Letras, Universidad de Buenos Aires (FFyL-UBA) / Instituto de Diversidad y Evolución Austral (IDEAus), Centro Nacional Patagónico (CENPAT), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Boulevard Brown 2915 (CP U9120ACD), Puerto Madryn, Chubut, Argentina. E-mail: ctamburrini@cenpat-conicet.gob.ar

Chubut (Figura 1) y resguardados en el ya mencionado Repositorio Bioantropológico del IDEAus (CCT CONICET-CENPAT) (Millán y Dahinten, 2019). En el muestreo se priorizó la toma de piezas dentales permanentes que se encontraran con poco desgaste, sin raíces expuestas ni caries. En caso de no contar con estas piezas, o que ellas se encontraran en malas condiciones de preservación, se decidió muestrear tejido óseo compacto. A estos individuos se les sumaron otros 15 que fueron analizados en el año 2016 por la Dra. María Laura Parolin en el *Bustamante's Lab* de la Universidad de Stanford (Estados Unidos).

### Exportación de las muestras y aspectos bioéticos

El procesamiento de las muestras fue realizado en el Laboratorio de Genómica Evolutiva y de Poblaciones del Laboratorio Internacional de Investigación sobre el Genoma Humano (LIIGH) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), a cargo de la Dra. María del Carmen Ávila-Arcos. Las muestras fueron exportadas en mano por la tesista, considerando los aspectos éticos y legales correspondientes y debidamente abordados por Tamburrini y colaboradores (2023a, 2023b).

### Laboratorio húmedo

#### Procesamiento del material, extracción de ADN y generación de bibliotecas genómicas

Previo al procedimiento de obtención de ADN antiguo (ADNa), se sometió el material arqueológico a una limpieza a fin de eliminar restos de impurezas y posibles contaminantes e inhibidores superficiales. Este procedimiento se llevó a cabo en un sector del laboratorio dedicado a este fin y consistió en un proceso de limpieza con hipoclorito de sodio al 5%, seguido de etanol al 70%, agua de calidad molecular y radiación UV a 256 nm durante 40 segundos, utilizando un equipo *crosslinker*. De cada muestra se separó entre 100 y 200 mg de material fragmentado para su posterior paso de extracción de ADNa, el cual se realizó siguiendo los protocolos modificados de Rohland y Hofreiter (2007) y Dabney y colaboradores (2013). La construcción de bibliotecas genómicas se llevó a cabo bajo el procedimiento de doble cadena de Meyer y Kircher (2010), a partir de 30 uL de extracto de ADN. Posteriormente, cada muestra fue indexada y sometida a una limpieza y selección de fragmentos mediante el kit comercial *SPRIselect* de *Beckman Coulter, Inc*. Una vez limpias, se realizaron los *pools* de bibliotecas que consisten en agrupar múltiples muestras de ADN indexadas en una sola reacción de secuenciación.

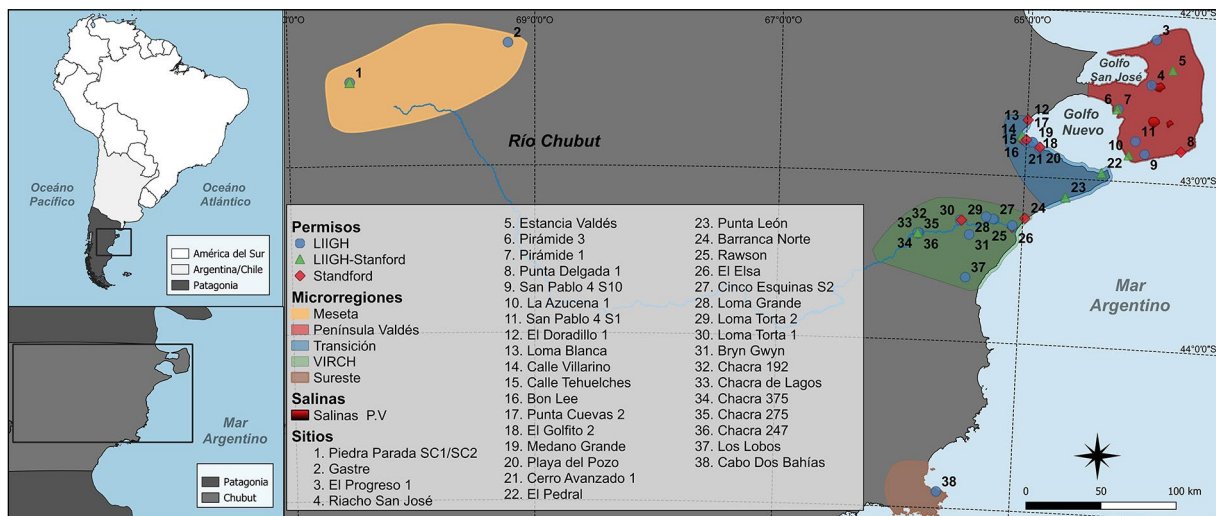


Figura 1. Sitios arqueológicos de los cuales se han analizado restos humanos. De un mismo sitio pueden haberse analizado más de un individuo. Autorizaciones otorgadas por la Subsecretaría de Cultura del Chubut y la Dirección del Instituto Nacional de Antropología y Pensamiento Latinoamericano (INAPL), para la exportación de las muestras al Laboratorio de Genómica Evolutiva y de Poblaciones (LIIGH, UNAM) y al Bustamante's Lab de la Universidad de Stanford (Estados Unidos).

#### Secuenciación: sistema NextSeq 550 de Illumina

Los *pools* de bibliotecas genómicas fueron enviados al servicio de secuenciación del Laboratorio de Servicios Genómicos (LabSerGen) de la Unidad de Genómica Avanzada (UGA) del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav), Irapuato, México. Estas fueron secuenciadas por método *shotgun* utilizando la plataforma *Illumina NextSeq550* a rendimiento medio (2 x 75 pares de bases –pb–).

#### Captura del ADN mitocondrial (ADNmt)

A fin de obtener genomas mitocondriales completos a alta profundidad, se realizó el protocolo de *myBaits@ Mito* (Daicel Arbor Biosciences, 2023), siguiendo las especificaciones del fabricante sin modificaciones.

#### Laboratorio seco

##### Análisis bioinformáticos de calidad y autenticidad

Luego de un filtrado de calidad de las secuencias obtenidas, se realizó un contraste (mapeo) con la versión hg19 (GRCh37) del genoma humano de referencia, sustituyendo el cromosoma mitocondrial (chrM) por la secuencia referencia revisada de Cambridge (rCRS) (Andrews et al., 1999), utilizando el programa *Burrows-Wheeler Aligner* (BWA) v0.7.12 (Li y Durbin, 2009) y estableciendo como calidad mínima de mapeo un umbral de 25 y una semilla de 350. Se realizaron estimaciones de mapeo y filtrados de calidad como porcentaje de *reads* mapeados con una calidad igual o mayor a 25, eliminación de los fragmentos duplicados producto de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) y estimación de porcentaje de ADN endógeno (inherente a la propia muestra) obtenido.

A fin de validar la obtención de ADN, se verificó el patrón de daño característico de ADN y se estimó la longitud promedio de los fragmentos secuenciados o *reads* mediante los programas *MapDamage v2.0* (Jónsson et al., 2013) y *ATLAS* (Kieser et al., 2020), respectivamente para cada muestra. Asimismo, se calculó el grado de contaminación a partir del ADNmt, mediante el programa *Schmutzi* (Renaud et al., 2015).

#### ADNmt: determinación de los haplotipos y haplogrupos

La asignación de cada haplotipo a su correspondiente haplogrupo materno más probable, se realizó mediante el programa *HaploGrep 2.0* (Weissensteiner et al., 2016). Las asignaciones de haplogrupos fueron estimadas a partir de la última versión de *PhyloTree mtDNA tree Build 17* (van Oven y Kayser, 2009) y refinadas manualmente a partir de bibliografía actualizada.

Con el fin de determinar la filogenia de los clados identificados en el presente estudio, se realizó un análisis comparativo entre los resultados obtenidos y los mitogenomas de individuos ancestrales y contemporáneos previamente publicados para la región.

## Síntesis de los resultados

### Validación de ADN, endógeno y cobertura

Se obtuvieron longitudes de fragmentos esperados para ADN en la totalidad de las muestras secuenciadas (entre 60 y 150 pb) y patrones de desaminación en 40 de las 50 muestras procesadas. Aquellas muestras para las cuales, debido a su bajo contenido de fragmentos de ADN, no pudo estimarse el

grado de contaminación y cuyos patrones de desaminación no mostraron el daño esperado para ADN<sub>a</sub>, fueron eliminadas de los análisis subsiguientes (N = 7). La estimación de contaminación varió entre 1 y 3%, valores esperables en estudios de ADN<sub>a</sub>, mientras que el ADN endógeno varió entre 0,05 y 68,3% con un promedio de 15% para el ADN nuclear y entre 0,01 y 0,58% con un promedio de 0,1% para el ADN<sub>mt</sub>. Asimismo, se recuperaron profundidades que van desde 1,5X a 173,1X para ADN<sub>mt</sub>.

En síntesis, los resultados obtenidos por técnicas genómicas de nueva generación demostraron una buena preservación del material genético con parámetros validados para ADN<sub>a</sub> en 33 de los 50 individuos analizados (66% de eficiencia de recuperación).

### Haplogrupos y linajes

Sumando los individuos procesados por la Dra. M. L. Parolin, en esta tesis se analizaron un total de 48 individuos (33 + 15) identificándose 40 haplotipos diferentes. Dieciocho de ellos fueron asignados al clado D1 (45%), ocho (8) al C1b (20%), ocho (8) al B2 (20%) y seis (6) al C1c (15%). Asimismo, nuevos clados fueron identificados (B2b16a, B2ak1b, C1b32, C1b33, C1b35, C1c11g, C1c11i, D1u, D1g7, D1g5a1), cuyas posiciones diagnósticas se especifican en la Figura 2.

Respecto de la variable geográfica, esta tesis cuenta con un total de tres (3) muestras de la Meseta, ocho (8) de PV, 11 de transición y 21 muestras del VIRCH, y cinco (5) muestras del Sureste de la provincia (SEP). De estos, 31 individuos fueron asignados al Holoceno Tardío Final (1990-200 AP), 13 al Holoceno Tardío Inicial (3990-2000 AP), dos (2) al período post-contacto (<200 AP) y uno (1) al Holoceno Medio (7400-4000 AP) según la división adoptada por Gómez Otero & Svoboda (2022). Un único individuo no cuenta con fechado.

El test exacto de Fisher realizado para poner a prueba la asociación o independencia entre las microrregiones geográficas establecidas *a priori* y las distancias genéticas en términos de frecuencia de haplogrupos observados, no mostró una asociación significativa (valor  $p > 0,05$ ; no se rechaza la hipótesis nula de independencia) entre la variable genética y la geográfica. De modo similar, el análisis PhiST ( $\Phi$ ST) evidenció que no hay diferencias genéticas significativas ( $p > 0,05$ ) en términos de frecuencias nucleotídicas entre las microrregiones establecidas. Continuando con los análisis demográficos y con el fin de poner a prueba si la diversidad genética de la muestra poblacional de los individuos bajo estudio variaba a lo largo del

período analizado, se realizó una prueba de Mantel. Esta prueba evalúa la correlación entre la matriz de distancias genéticas y la matriz temporal confeccionada a partir de dataciones radiocarbónicas de los individuos estudiados en la presente tesis (Patagonia central; N = 48). Los resultados no permitieron rechazar la hipótesis nula de no correlación ( $z = 2134,478$ ;  $p$ -valor: 0,5761).

Por lo tanto, mediante el estudio de genomas completos del ADN<sub>mt</sub> y al menos en lo que respecta a la muestra poblacional analizada en esta tesis, se puede concluir que no se observan cambios sustanciales en la composición de linajes maternos de la población a lo largo del período analizado y que, los individuos de las microrregiones analizadas, podrían considerarse como pertenecientes a una única población biológica.

### Consideraciones finales

Las inferencias resultantes de los datos generados a partir de esta tesis doctoral no solo profundizan y complementan la información obtenida a partir de las investigaciones arqueológicas y bioantropológicas, sino que también contribuyen a un mejor entendimiento de los procesos migratorios que modelaron el poblamiento humano de la Patagonia.

### Agradecimientos

Agradezco al Comité de Bioética del Área Programática Norte de Puerto Madryn, a la Subsecretaría de Cultura y a la Dirección de Pueblos Originarios de la provincia del Chubut, especialmente al Sr. Rubén Ricardo Romero Saihueque y a las comunidades originarias de la provincia. Agradezco a la Dra. Julieta Gómez Otero, al Dr. Néstor Basso y la Dra. María Ávila Arcos. Agradezco el apoyo técnico en el desarrollo de mis actividades de Alejandra Castillo Carbajal, Carina Uribe Díaz y Jair García Sotelo del LIIGH (UNAM) y el apoyo bioinformático de Luis Alberto Aguilar Bautista del Laboratorio Nacional de Visualización Científica Avanzada (LAVIS, UNAM). Agradezco al jurado por tomarse el trabajo de corregir una tesis a fin de año y por los aportes realizados. Agradezco a las agencias que financiaron parte de este proyecto: Proyecto de Unidades Ejecutoras (PUE) 22920180100012CO del CONICET; *King Grant for Precolumbian Archaeology* #201902 de la *Society for American Archeology* (SAA); y PICT V 2014-1558 de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT).

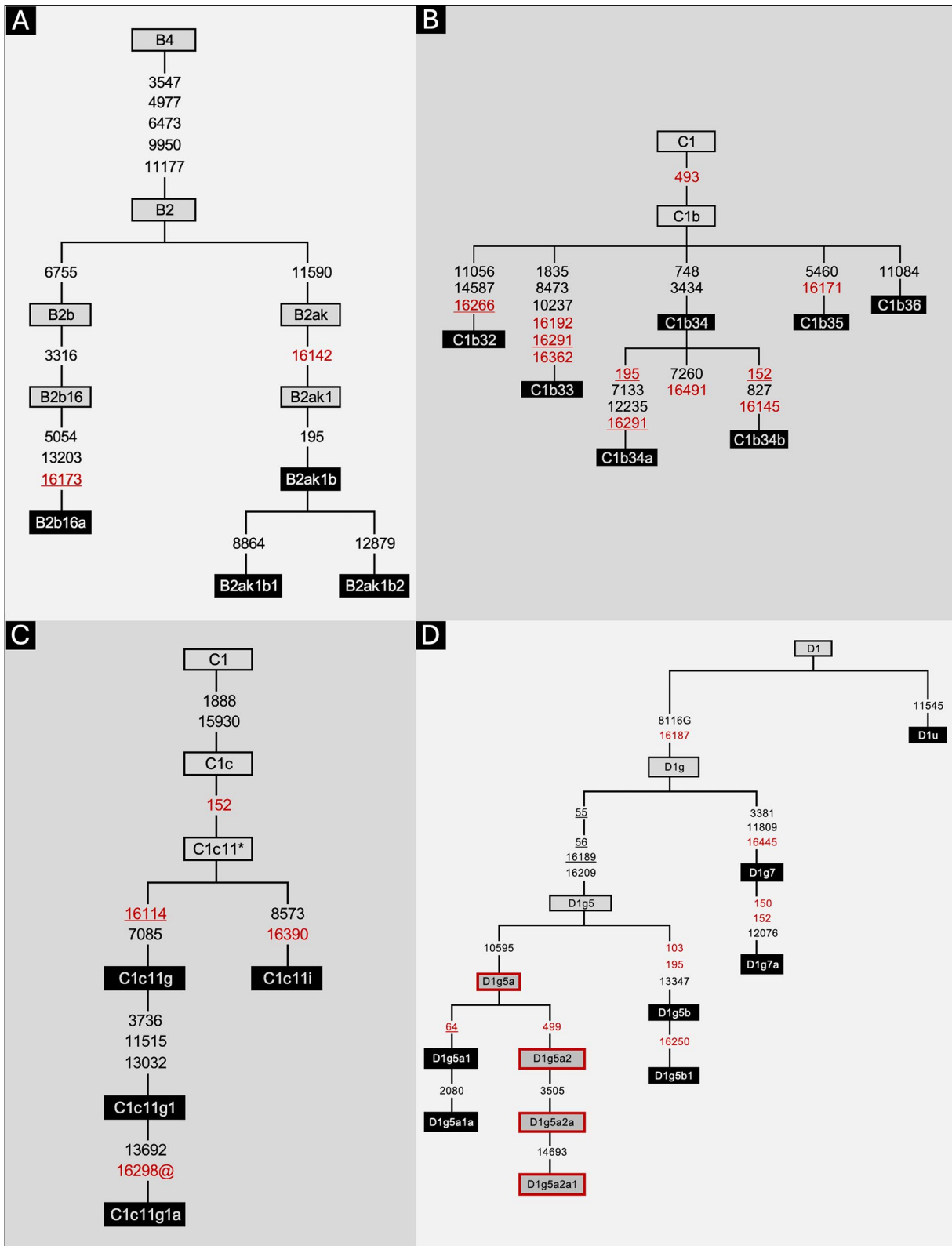


Figura 2. Propuestas de nuevos clados (recuadros de color negro) basados en análisis de mitogenomas. A) Clado B2; B) Clado C1b; C) Clado C1c; D) Clado D1. Las mutaciones corresponden a transiciones. Los textos en color rojo representan las mutaciones de la Región Control del ADNmt y con subrayado se indican las posiciones recurrentes. Los recuadros de color rojo corresponden a clados publicados por otros autores que sufrieron modificaciones. \* C. M. Bravi, comunicación personal, 2023.

## Referencias citadas

- » Andrews, R. M., Kubacka, I., Chinnery, P. F., Lightowlers, R. N., Turnbull, D. M. y Howell, N. (1999). Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nature Genetics*, 23(2), 147-147. <https://doi.org/10.1038/13779>
- » Dabney, J., Knapp, M., Glocke, I., Gansauge, M.-T., Weihmann, A., Nickel, B., Valdiosera, C., García, N., Pääbo, S., Arsuaga, J. L. y Meyer, M. (2013). Complete mitochondrial genome sequence of a Middle Pleistocene cave bear reconstructed from ultrashort DNA fragments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(39), 15758-15763. <https://doi.org/10.1073/pnas.1314445110>
- » Daicel Arbor Biosciences (2023). *MyBaits. Hybridization Capture for Targeted NGS. User Manual. Version 5.03 (June 2023)*. [https://arborbiosci.com/wp-content/uploads/2023/06/myBaits\\_Manual\\_v5.03.pdf](https://arborbiosci.com/wp-content/uploads/2023/06/myBaits_Manual_v5.03.pdf) (Acceso: 30 de abril, 2024).
- » Gómez Otero, J. (2006). *Dieta, uso del espacio y evolución en poblaciones cazadoras-recolectoras de la costa centro-septentrional de Patagonia durante el Holoceno medio y tardío (Tesis de Doctorado inédita)*. Universidad de Buenos Aires, Argentina. <http://repositorio.filo.uba.ar/handle/flodigital/1274>
- » Gómez Otero, J. y Svoboda, A. (2022). Temporal changes in the utilization of marine resources by Hunter-Gatherers of the North-Central Patagonian Atlantic coast during the Holocene. En W. E. Helbling, R. A. González, M. A. Narvarte y V. E. Villafañe (Eds.), *Global change in Atlantic Coastal Patagonian Ecosystems: A journey through time* (pp. 319-347). Cham: Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-86676-1\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-030-86676-1_13)
- » Jónsson, H., Ginolhac, A., Schubert, M., Johnson, P. L. y Orlando, L. (2013). mapDamage2.0: Fast approximate Bayesian estimates of ancient DNA damage parameters. *Bioinformatics*, 29(13), 1682-1684. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt193>
- » Kieser, S., Brown, J., Zdobnov, E. M., Trajkovski, M. y McCue, L. A. (2020). ATLAS: A Snakemake workflow for assembly, annotation, and genomic binning of metagenome sequence data. *BMC bioinformatics*, 21, 257. <https://doi.org/10.1186/s12859-020-03585-4>
- » Li, H. y Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, 25(14), 1754-1760. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>
- » Meyer, M. y Kircher, M. (2010). Illumina sequencing library preparation for highly multiplexed target capture and sequencing. *Cold Spring Harbor Protocols*, 6, pdb-prot5448. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5448>
- » Millán, A. G. y Dahinten, S. L. (2019). La Colección Bioantropológica del norte de Chubut (Secretaría de Cultura de Chubut/IDEAUS-CONICET): Integración, conservación e investigación. En J. Gómez Otero, A. Svoboda y A. Banegas (Eds.), *Arqueología de la Patagonia: El pasado en las arenas* (pp. 205-213). Puerto Madryn: Instituto de Diversidad y Evolución Austral (IDEAus), Centro Nacional Patagónico (CENPAT), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/134956>
- » Renaud, G., Slon, V., Duggan, A. T. y Kelso, J. (2015). Schmutzi: Estimation of contamination and endogenous mitochondrial consensus calling for ancient DNA. *Genome Biology*, 16, 224. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0776-0>
- » Rohland, N., & Hofreiter, M. (2007). Ancient DNA extraction from bones and teeth. *Nature protocols*, 2, 1756-1762. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.247>
- » Tamburrini, C., Dahinten, S. L., Romero Saihueque, R. R., Ávila-Arcos, M. C. y Parolin, M. L. (2023a). Towards an ethical and legal framework in archaeogenomics: A local case in the Atlantic coast of central Patagonia. *American Journal of Biological Anthropology*, 182(2), 161-176. <https://doi.org/10.1002/ajpa.24821>
- » Tamburrini, C., Romero Saihueque, R. R., Dahinten, S. L. y Parolin, M. L. (2023b). Comunicación del taller: Ciencias genómicas y saberes de los pueblos originarios (Provincia del Chubut, Argentina). *Revista del Museo de Antropología*, 16(3), 79-92. <https://doi.org/10.31048/1852.4826.v16.n2.39239>
- » van Oven, M. y Kayser, M. (2009). Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Human Mutation*, 30(2), E386-E394. <https://doi.org/10.1002/humu.20921>
- » Weissensteiner, H., Pacher, D., Kloss-Brandstätter, A., Forer, L., Specht, G., Bandelt, H.-J., Kronenberg, F., Salas, A. y Schönherr, S. (2016). HaploGrep 2: Mitochondrial haplogroup classification in the era of high-throughput sequencing. *Nucleic acids research*, 44(W1), W58-W63. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw233>