

# Evaluando nuevos enfoques metodológicos para el estudio de dietas en poblaciones prehistóricas:

Microbioma oral y PIXE.

Memoria para optar al Título Profesional de Antropólogo Físico

Fabián Pontigo Arancibia

Abril, 2013.

Universidad de Chile,

Facultad de Ciencias Sociales

Departamento de Antropología

Profesor Guía: Sergio Flores Carrasco.

*"No permitan que el fracaso les deteriore la autoestima (...)  
En cualquier tarea se puede ganar o perder, lo importante es  
la nobleza de los recursos utilizados, eso sí es lo importante;  
lo importante es el tránsito, la dignidad con que recorrí el  
camino en la búsqueda del objetivo. Lo otro es cuento para  
vendernos una realidad que no es tal" (Marcelo Bielsa)*

## **ÍNDICE**

|   |    |
|---|----|
| <b>Resumen</b>                            | 5  |
| <b>Introducción</b>                       | 7  |
| <b>Antecedentes del estudio de dietas</b> | 8  |
| Coprolitos                                | 8  |
| Salud Oral y Bioantropología              | 9  |
| Isótopos                                  | 10 |
| Oligoelementos                            | 12 |
| PIXE                                      | 13 |
| Tártaro y Bacterias                       | 15 |
| <b>Propuesta</b>                          | 17 |
| Diseño Genético-Molecular                 | 17 |
| Filogenia del género                      | 17 |
| Hábitats                                  | 21 |
| Hipótesis bacteria-nicho-filogenia.       | 22 |
| Dieta y bacteria                          | 22 |
| <b>Objetivos generales y específicos</b>  | 23 |
| <b>Capítulo PIXE</b>                      | 24 |
| Material y métodos                        | 24 |
| Resultados                                | 28 |
| Conclusiones                              | 34 |
| <b>Capítulo Genética-Molecular</b>        | 35 |
| Metodología                               | 35 |
| Muestras genómicas                        | 35 |
| Análisis filogenético-Molecular           | 43 |
| Hábitats                                  | 46 |

|  |           |
|--|-----------|
| Hipótesis dietaria y relación bacteria-hábitat | 46        |
| Muestras de saliva                             | 46        |
| PCR  | 47        |
| Resultados y discusión                         | 50        |
| Análisis filogenético                          | 50        |
| Hábitats                                       | 64        |
| Diseño hipótesis Filogenia-bacteria-hábitat    | 70        |
| PCR  | 71        |
| Secuenciación y análisis                       | 76        |
| Conclusión                                     | 79        |
| <b>Referencias</b>                             | <b>81</b> |
| <b>Anexos</b>                                  | <b>91</b> |

## RESUMEN.

Estudiar las costumbres alimentarias en una población determinada nos da cuenta no sólo de las estrategias de subsistencia empleadas por ella, también puede dar luces sobre estratificación social, o el desarrollo de distintas tecnologías, entre otras cosas. Para llegar a conocer esto en población prehistórica se han utilizado varios métodos. Desde el estudio de dientes hasta el uso de los isótopos estables han sido distintas formas de llegar a conocer qué comían las sociedades extintas. En este trabajo, en particular, se trabaja con dos metodologías. Primero, mediante la técnica de PIXE (*protoninduced X-rayemission*) se busca obtener en material óseo y dental índices de distintos elementos, de modo que pudieran ayudar a inferir patrones dietarios. En segundo término, se configuró una metodología alternativa para el estudio de dietas en poblaciones antiguas y actuales, esta vez analizando el microbioma oral con herramientas genético-moleculares.

El estudio de oligoelementos se realizó con población prehistórica. Se aplicó la metodología de PIXE en muestras de distintos individuos, probando en primera instancia la aplicabilidad de dicha tecnología para el estudio de restos óseos y dentales humanos, y luego para la inferencia de dieta. Los resultados comprueban que es posible analizar estos restos con dicha metodología. De hecho, se obtienen resultados similares a los de otros estudios en otros laboratorios del mundo. Sin embargo, se hace necesario mejorar la forma de obtención de datos, de modo de validar los resultados obtenidos. La segunda fase del análisis, por tanto, queda pendiente pues aún es prematuro validar dicho método como herramienta para la inferencia de dietas.

Respecto a la propuesta genético-molecular, dos estudios la sustentan. El primero, sugiere que la diversidad bacteriana oral podría guardar relación con los hábitos alimentarios del individuo, mientras que en el segundo se implementan metodologías para el estudio de bacterias de contextos arqueológicos. Dicho trabajo molecular se dividió en cuatro etapas. Primero, se seleccionó una taxonomía completa de bacterias, en este caso *Streptococcus*, para luego buscar bacterias candidatas dentro de dicho género. Esto implicó

resolver casi en su completitud la topología de dicho grupo, con herramientas tales como los análisis de homogeneidad. La segunda fase consistió en evaluar la relación entre la topología y el nicho ecológico de cada bacteria, de este modo comprobando que, eventualmente, la filogenia de una taxa determinada puede ser usada como guía para la búsqueda de bacterias candidatas en un ambiente determinado. En la tercera fase se probó dicha aproximación. Se escogió una bacteria cuyo ambiente es poco conocido, pero filogenéticamente está rodeada de estreptococos cuyo hábitat es la cavidad oral. Luego de confeccionar partidores específicos para dicha bacteria, se comprobó su presencia en la saliva de distintos individuos. En la cuarta etapa se probó en población vivadiferencias en la frecuencia de dicha bacteria al comparar individuos con distintos hábitos alimentarios. Aunque existe una tendencia a que quienes tienen una dieta omnívora presentan la bacteria, estos resultados no son significativos. No obstante aquello, falta –para futuros estudios- aumentar la muestra, y considerar un abanico más amplio de posibilidades dentro de las dietas.

## INTRODUCCIÓN.

El estudio de la dieta de una población determinada nos da cuenta de varios aspectos de la misma. Por ejemplo, puede dar luces sobre los cambios en las estrategias de subsistencia, la existencia de estratificación social y el desarrollo de tecnologías, entre otras cosas (Lambert *et al.*, 1984). De este modo, dicha información nos permite comprender de una manera más completa cómo dichas poblaciones se desenvuelven en su diario vivir. Este conocimiento se hace aún más necesario cuando estudiamos poblaciones antiguas o extintas, de las cuales su modo de vida, y su dieta, se conoce muy poco.

Así, se han desarrollado varios métodos que buscan esclarecer el modo de subsistencia de poblaciones antiguas. En este aspecto, la evidencia material, esto es, el vestigio arqueológico, ha sido el principal indicador utilizado para inferir el modo bajo el cual las poblaciones estudiadas obtenían sus recursos (alimenticios, en este caso). Sin embargo, la biología se ha ido posicionando en estos estudios, permitiendo una inferencia mucho más directa de esta temática, complementando la evidencia material y, muchas veces, esclareciendo tópicos un tanto desconocidos. De hecho, un enfoque tradicional para estos fines era analizar los restos de plantas, animales y/o coprolitos encontrados en el sitio arqueológico (Lambert *et al.*, 1984). Desde la antropología física se empezó a abordar esta problemática, evaluando la presencia de caries, tártaro, enfermedad periodontal, patrones de abrasión y desgaste dentario, y en menor medida analizando el contenido de oligoelementos, esto último ya sea en dientes como en hueso (Linossier *et al.*, 1988). Actualmente, los enfoques que evalúan la química del hueso, o el diente, en su dinámica homeostática, esto es, en vida, o diagenética *-postmortem-*, son recursos propios de la antropología física.

No obstante, se han intentado otras aproximaciones. Linossier *et al.* (1996) evaluaron las diferencias observadas en la morfología de bacterias contenidas en el sarro dental de distintas muestras, de distintos contextos geográficos, culturales y temporales. En su estudio se ve una tendencia a la diferenciación morfológico-bacteriana producto de la dieta. A este estudio se le puede sumar

el de de la Fuente *et al.* (2012), donde se presenta una metodología para obtener y analizar DNA bacteriano antiguo desde el cálculo dental de muestras bioarqueológicas. Por tanto, se pavimenta el camino para una aproximación experimental al estudio de la dieta, de manera de identificar bacterias a través del DNA bacteriano contenido en el tártaro de poblaciones extintas, con el objetivo de conocer distintas costumbres alimentarias.

Así, en este estudio se utilizan distintos métodos para inferir dietas, como PIXE (Proton Induced X-Ray Emission), isótopos estables y, además, se explora un nuevo enfoque, genético-molecular, para la identificación de bacterias específicas para determinadas dietas.

## ANTECEDENTES ESTUDIO DE DIETAS.

### Estudio de Coprolitos.

Algunas aproximaciones al estudio de la dieta en poblaciones antiguas han involucrado el estudio de coprolitos. Por ejemplo, Núñez y Moragas (1977) analizaron macroscópicamente algunos coprolitos humanos en el distrito de Cañamo, Norte de Chile. Dicho estudio, sumado al análisis de materiales del sitio, permitió inferir el consumo de semillas y algarrobos, además de productos del mar. Asimismo, Núñez y Hall (1982) hicieron lo propio para un asentamiento Arcaico en Tiliviche, donde separan los componentes de las heces humanas mediante la sumersión de estos en una solución acuosa, y su posterior lavado. Dicho análisis, en conjunto con la evidencia artefactual, permitió inferir consumo de cactáceas y plantas acuáticas; peces y crustáceos, además de guanaco. Holden (1991), a su vez, analiza muestras de coprolitos y contenido intestinal encontrados en la Quebrada de Tulán (Norte de Chile) infiriendo el consumo de cactáceas, totora, quínoa entre los restos más preponderantes de plantas; asimismo, huesos de roedores y camélidos también fueron identificados.

No obstante, sólo bajo ciertas condiciones se preservan las heces, por lo que se hace bastante difícil contar con este material para estudiarlo.



## Salud oral, Bioantropología

El estudio de la salud oral también ha sido utilizado para, indirectamente, dar cuenta de la dieta de las poblaciones. Por ejemplo, Standen y Sanhueza (1984) estudian el cementerio Tardío Mocha 2 (Norte de Chile) e infieren una dieta elaborada, sometida a cocción, debido a que dichos restos presentan una dentadura con un grado de abrasión moderado. A su vez, se compara este cementerio con uno pre cerámico (Tiliviche 2) donde se observan diferencias en cuanto a pérdida dental y presencia de caries, ambas mínimas en Tiliviche 2, lo que se explica finalmente por las distintas dietas de ambos grupos humanos. Asimismo, Costa *et al.* (2004) examinan la influencia de Tiwanaku en población sampedrino (San Pedro de Atacama, Chile) por medio de un análisis comparativo de cementerios a lo largo de distintos períodos culturales. Concluyen que la menor cantidad de caries y mayor estatura que presentaban poblaciones bajo la influencia de Tiwanaku se debe a un mayor acceso a proteína animal. Pos-Tiwanaku, en cambio, el aumento de caries daría cuenta de un menor acceso a dicha proteína en la dieta.

Por otro lado, Rodríguez *et al.* (2004) analizan restos históricos de una iglesia en Colina, Región Metropolitana de Chile, y a la luz de la presencia de leve desgaste, alta presencia de caries y pérdida dental se concluye una dieta blanda y rica en carbohidratos, además de cocción previa al consumo (este punto debido al leve desgaste). Más al sur, Morano y Bucarey (2009) analizan los restos de un individuo de un alero en la región de los Ríos, Chile. En dicho estudio, el alto grado de desgaste, la presencia de *chipping* y la poca incidencia de caries en los dientes darían cuenta de una dieta mixta 'dulceacuícola'. Esta evidencia, a la luz de antecedentes de otros contextos y sumado al registro arqueológico del sitio, darían cuenta de consumo de moluscos de lago, fauna terrestre y frutos silvestres. De este modo se explicaría el *chipping* (arena en moluscos consumidos), el desgaste dental y la poca cantidad de caries (esperable para cazadores recolectores).

No obstante, los métodos químicos y físicos han ido ganando importancia en esta materia.

### Isótopos

Una gran ventaja de esta técnica es que refleja la dieta que un individuo efectivamente consumió, distinto a lo que el registro arqueológico puede brindar en esta materia, donde la preservación diferencial de materiales o el palimpsesto pueden sesgar nuestras conclusiones (Lee-Thorp, 2008). Huesos y dientes normalmente son usados en este tipo de estudios, debido a que son los restos que mejor se preservan en la mayoría de los casos.

Las concentraciones relativas de ciertos elementos presentes en el organismo humano pueden fluctuar debido a patologías y/o dietas, bajo el entendido de que el sistema óseo actúa como un reservorio de minerales que se liberan o depositan conforme a las distintas demandas fisiológicas (Blakely, 1989; Sillen y Smith, 1984; Parker y Toots, 1980, citado en Sandford, 1992). De este modo, los valores isotópicos obtenidos del tejido óseo reflejarían los valores promedio de la vida del individuo, dependiendo de su edad, mientras que el esmalte y la dentina del diente, al ser tejidos que se forman durante la fase juvenil, revelarían los valores isotópicos de dicha etapa (Lee-Thorp, 2008).

La flora terrestre capta diferencialmente el CO<sub>2</sub> fijado de la atmósfera. Las plantas C3 discriminan negativamente el <sup>13</sup>C, de este modo resultando en valores isotópicos más negativos (-26,5% promedio) que las plantas C4, que discriminan en menor intensidad dicho isótopo (-12,5% promedio). De este modo, en los grupos humanos-cuya dieta es omnívora- los valores isotópicos de <sup>13</sup>C reflejarían las plantas, pero también los animales consumidos, por lo que dichos índices aparecerían ligeramente modificados debido a los distintos niveles tróficos (White *et al.*, 2004). En los valores isotópicos del Nitrógeno hay aún mayor variación con los distintos niveles tróficos. Aquí, por ejemplo, las cadenas tróficas marinas, al ser más extensas, se produce un gradual enriquecimiento de δ<sup>15</sup>N, por lo que valores elevados de dicho isótopo darían

cuenta de un consumo preferente de recursos marinos por sobre los terrestres (Lee-Thorp, 2008; Tykot *et al.*, 1996; Falabella *et al.*, 2007).

En Chile, se han realizado estos estudios. Por ejemplo, en el Norte Grande, Tieszen *et al.* (1992) analizan muestras de 7 grupos culturales del Norte de Chile (Alto Ramírez, Maitis Chiribaya, Camarones-9, Chinchorro, Chinchorro Tardío, Cabuza y San Miguel). Los resultados permiten diferenciar a dichas tradiciones culturales en 2 grupos bien definidos; el primero, dependiente de los recursos marinos; el segundo, con una mayor preponderancia de recursos terrestres en su dieta. Algunos de estos resultados se corresponden con la evidencia material disponible. Aufderheide (1994) realiza un análisis de isótopos estables y de marcadores bioantropológicos (exostosis en el canal auditivo externo) a momias Alto Ramírez de la costa del Norte de Chile. Dichos análisis demuestran cierto grado de adaptación de estas poblaciones a las costumbres (incluida la dieta) costeras. Esto permitió diferenciar a este grupo de otro de la misma tradición Alto Ramírez pero más tardío, asentado en el valle de Azapa, que practicaba la agricultura complementada con recursos marinos.

Luego, Aufderheide y Santoro (1999) intentan reconstruir la paleodieta de dos sitios del Valle de Lluta, Molle Pampa Medio y Molle Pampa Oeste. Para ello, evalúan los resultados de elementos traza de Bario y Estroncio, e isótopos estables de Carbono y Nitrógeno. La razón entre dichos resultados indicaría consumo de carne de animal marino y vegetal preponderante, y una menor proporción de consumo de carne de animal terrestre para ambos grupos. Estos resultados contrastan con la evidencia arqueológica, que no evidenciaba tal consumo de recursos marinos. Aufderheide *et al.* (2002) analizaron restos momificados de la fase Alto Ramírez en un cementerio del Valle de Azapa (Norte de Chile). Entre otros análisis, realizan Isótopos Estables a dichos restos y concluyen que gran parte de la dieta total de la población se constituía de plantas (distintas del maíz) y animal terrestre; en menor medida consumo de maíz y recursos marinos. Recientemente, Santana (2011, Ms) analizó los restos del cementerio oriente del oasis de Quillagua, Norte Grande de Chile, pertenecientes al Período Intermedio Tardío. Dentro de las conclusiones

respecto de la dieta de estas poblaciones, se concluye que ésta era marcadamente marina, además de evidenciar consumo de maíz, según los resultados obtenidos por los isótopos de Carbono y Nitrógeno (Santana, 2011, Ms).

Falabella *et al.* (2007) realizan estos estudios para sociedades alfareras de Chile Central. En él, se analizan colecciones óseas de distintos períodos culturales de la región, y comparan sus hábitos alimentarios. De igual manera existen estudios en el Extremo Sur (por ejemplo, Yesner *et al.*, 2003; Tessone *et al.*, 2003; Panarello *et al.*, 2006; Barberena, 2004; Reyes y Méndez, 2010; Alfonso-Durruty *et al.*, 2011; Reyes *et al.*, 2011).

De este modo, el estudio de isótopos estables es, hoy por hoy, el método más aceptado para el estudio de dietas. No obstante, se han realizado otras aproximaciones físico-químicas.

### Oligoelementos

Los análisis de elementos traza (microelementos) han sido utilizados con los mismos fines. Por ejemplo, valores elevados de Cu y Zn, sumado a un bajo nivel de Sr, sería indicio de una dieta considerable de carne y un rol complementario de las plantas en la misma. (Safont *et al.*, 1998; Sandford, 1992; Szostek *et al.*, 2003). Si las plantas absorben directamente Sr desde el ambiente, los animales lo van a absorber de manera indirecta, ya sea por plantas o por animales. A su vez, existe una correlación positiva entre concentración de Zn y dieta proteica. Es por ello que el nivel trófico es relevante al comparar concentraciones de dichos elementos: carnívoros tendrán menores niveles de Sr (lo adquieren de otros animales) que omnívoros y herbívoros (o, en casos actuales, vegetarianos) (Szostek *et al.*, 2003).

Junto con esto, dicha técnica también ha sido bastante útil para evaluar la contaminación de las muestras, debido a que elementos como Fe, Al y Mn tienen una alta movilidad en suelos y, por tanto, sus índices pueden llevar a conclusiones erróneas (Safont *et al.*, 1998). Por otro lado, existen estudios que utilizan dichos marcadores químicos para establecer y explicar el origen, la

movilidad o la residencia de una comunidad a lo largo de la historia de vida de sus integrantes. Esto último se debe a que las concentraciones de ciertos elementos tales como Ba y Sr varían geográficamente, y en una población dada un abanico de valores isotópicos podría sugerir diversos orígenes para los individuos que la componen (Knudson & Price, 2007; Haak *et al.*, 2008). De este modo, se ha podido discutir el tema de las colonias Tiwanakotas en San Pedro de Atacama, Chile, durante el horizonte Medio (400-900 DC) mediante los valores de isótopos de Sr, por ejemplo (Knudson, 2007).

### PIXE.

En general, los procedimientos que históricamente han sido utilizados para los análisis de elementos traza e isótopos estables implican un alto costo, tanto en términos técnicos como respecto a la muestra a utilizar, esto último debido a que son invasivos respecto al material óseo (en algunos casos se necesita “polvo de hueso” para trabajar).

Ruvalcaba-Sil (2001) revisa las potencialidades del análisis dietario vía elementos traza con el método PIXE (Proton induced X-ray emission), donde es posible analizar dientes y huesos para la identificación de niveles de contaminación, así como alimentos ingeridos (Alhberg y Akselsson, citado en Ruvalcaba-Sil 2001). El análisis PIXE se basa en la emisión de rayos X de un átomo inducida por la emisión de partículas (como un protón) desde un acelerador hacia dicho átomo. La interacción del protón con el electrón del átomo hace que éste último migre junto al protón pero en direcciones distintas, generando una ionización en el átomo. Dicha ionización produce la transición de electrones de capas superiores hacia la vacante generada por el protón. En dicho proceso se libera energía en forma de rayos X, y estos rayos tendrán un valor específico para cada átomo (FIG 1). El electrón expelido puede pertenecer a distintas capas, lo mismo pasa con el electrón que ocupa la vacante, lo que genera rayos X específicos. Como ejemplo, si el electrón expulsado corresponde a la capa cuyo número cuántico es  $n=1$ , se llamará línea K; si es  $n=2$ , línea L;  $N=3$ , línea M. Simultáneamente, el electrón que llena la vacante proviene de muchas subcapas, dependiendo de esto será  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,

etc. Entonces, el *peak* más intenso será la  $K\alpha$ , seguido por la  $K\beta$  (que, dado el caso, son los que más se diferencian). Esta es la base de dicho análisis para la identificación de componentes específicos (Ruvalcaba-Sil, 2001).

En este tipo de estudios, los dientes han resultado ser indicadores bastante confiables de la presencia de elementos traza (Rautray et al, 2010). Con PIXE podemos determinar la concentración de elementos desde Al(13) hasta Zn (30), llegando incluso hasta Mo(42). Para visualizar elementos más livianos, o más pesados, es necesario complementar con técnicas como RBS (Rutherford Backscattering), GIXE (Gamma-induced X-Ray Emission) o PIGE (Proton induced Gamma-ray Emission).

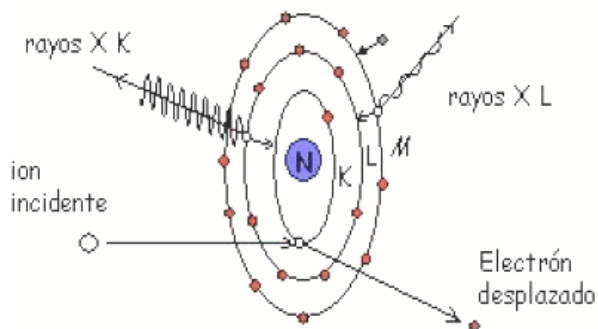


Fig. 1. Esquema transición electrones.

fuelle: <http://centro.us.es>

Una ventaja del análisis PIXE es que se trata de un método poco destructivo. La importancia radica en que muchas veces se tiene piezas óseas o dentales lo suficientemente valiosas como para analizarlas con técnicas que requieren la destrucción parcial del elemento, como por ejemplo la Espectroscopía de absorción atómica (AAS), o la Espectrometría de Masas con fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP- MS). Dichas técnicas son frecuentemente usadas, pero no aseguran la integridad del segmento óseo o dental. Por otro lado, técnicas como *electron microprobe* (EPMA) son útiles para muestras con bajas concentraciones (<200 ppm). Tomando en cuenta esto, PIXE se diferencia en ser una técnica poco destructiva, simultánea, rápida y multielemental (Rautray et al, 2010; Ruvalcaba-Sil, 2001). Cabe mencionar que otras técnicas, tales como RBS (Rutherford Backscattering) trabajan con mediciones absolutas, al contrario de PIXE, que necesita un valor de referencia

para lograr esto, y en su ausencia se trabaja con valores relativos (como lo es el cociente de dos valores obtenidos en la muestra).

### Estudio de Tártaro y Bacterias.

Otros métodos han sido utilizados para inferir la paleodieta. Se ha relacionado la presencia de tártaro en dientes al modo de subsistencia de caza-recolección. No obstante, dicha relación es ambigua y, más aún, insuficiente para explicar la presencia del cálculo dental, debido a que una dieta alta en proteínas aumentaría la alcalinidad del medio oral, de este modo facilitando (y no determinando) la aparición de tártaro (Lieverse, 1999).

El cálculo o tártaro consiste en placa bacteriana mineralizada cubierta -en vida- por una placa firmemente adherente no-mineralizada. El tártaro, de este modo, se compone de elementos orgánicos e inorgánicos. La etiología del cálculo dental es multicausal. Lieverse (1999) considera que los estudios bioantropológicos tienden a simplificar su formación hacia los aspectos meramente dietarios, mientras que el estudio de su causalidad ha sido poco revisado.

La formación de tártaro consta de: 1. formación de película adquirida, 2. colonización primaria, 3. colonización secundaria, 4. placa madura, y 5. fase de mineralización –fase clave para la formación del cálculo dental (Liébana Ureña et al, 1997). En la última fase, la misma placa bacteriana presente en la placa madura, mineraliza. Dicha placa bacteriana es similar en términos cualitativos en ambas fases, esto es, son los mismos tipos bacterianos pero en distinta frecuencia. Dentro de los organismos presentes en la placa madura se encuentran: *S. sanguis*, *S. mitis*, *S. gordonii*, *S. crista*, *S. oralis*, *Veillonella* y *Neisseria*, *Actinomyces*, *Hamophilus spp*, *espiroquetas*, además de otros microorganismos como *mycoplasma spp*, *candida spp* y algunos protozoos (Op. cit.). La mencionada naturaleza mineralizada del tártaro preserva los microorganismos de la placa contenidos en éste, posibilitando su estudio en poblaciones antiguas. Esto abre un amplio campo de investigaciones, ya sea en base a morfotipos bacterianos, linajes evolutivos, etc. (Linossier 1996).

Linossier et al (*op cit*) utilizaron tártaro, reservorio de microorganismos asociados al biofilm bucal, para el análisis de la variabilidad morfológica bacteriana, donde dicha variabilidad estaría relacionada con distintos patrones de subsistencia. En base a una revisión de muestras dentales de varias colecciones bioantropológicas de distinto origen, Linossier *et al* (1996) postulan que los constituyentes de la placa dental original de poblaciones antiguas pueden preservarse de un modo similar al que lo hacen en poblaciones modernas. Dichos componentes de la microflora presentes en el tártaro dental de diversas muestras estarían relacionados a distintos modos de subsistencia. Se utilizaron muestras de tártaro de restos prehispánicos en territorio chileno: cazadores-recolectores-pescadores (Chonos y Cerro Sotta, sur de Chile), cazadores recolectores (Acha, Norte de Chile) y agricultores (Atacameños, norte de Chile), además de restos esqueléticos de otros contextos (Olmeda, España: cementerio medieval; Sant Paul del Camp, entierro neolítico, España; Natufian, Mesolítico del Mediterráneo oriental). En dicho estudio, las poblaciones de cazadores-recolectores y pescadores tienen una menor diversidad morfológica bacteriana que los grupos agricultores, presentando las primeras principalmente formas cocáceas y bacilares, mientras que los contextos asociados a la práctica de la agricultura se presentan, adicionalmente, formas bacterianas filamentosas y espirales. De este modo, la variabilidad morfológica bacteriana de la microflora oral de individuos de distintas zonas, remotas unas de otras, o de distintos tiempos históricos, se explicaría por factores dietarios, lo que si bien es una propuesta novedosa resulta un poco simplista obviando, por ejemplo, factores genéticos potencialmente responsables de algunas propiedades de la placa bacteriana. Este enfoque, por cierto, depende de la presencia primero de dientes, luego de que estos contengan tártaro.

En esta misma línea, de la Fuente *et al.* (2012) implementaron una metodología para obtener y analizar DNA bacteriano antiguo desde el sarro dental de colecciones arqueológicas. La relevancia de esto para el presente estudio radica en que se hace posible detectar las especies bacterianas que



colonizaban la cavidad oral de las poblaciones del pasado y, más aún, analizar la variabilidad genética bacteriana y su covariación con la de las poblaciones humanas. De este modo, se demuestra que el DNA bacteriano contenido en el cálculo dental es una valiosa fuente de información genética para amplificar DNA de bacterias de distintos contextos geográficos y cronológicos.

De este modo, el presente trabajo pretende crear una metodología a partir de dicha hipótesis de la variabilidad bacteriana *versus* dieta de Linossier *et al* (1996) en población chilena, identificando molecularmente las bacterias que darían cuenta de una diversidad morfológica descrita en la placa del tártaro. Así, se busca presentar dicho método como una potencial alternativa al análisis de isótopos estables y elementos traza para la identificación de dietas en contextos prehistóricos.

#### a. Diseño Genético-Molecular.

Para confeccionar tal diseño se puso el foco en un grupo específico de bacterias, el género *Streptococcus*. Se contó con cuatro etapas. (i) Primero, se hizo un exhaustivo análisis filogenético bayesiano con todas las especies del grupo, para intentar dar con la filogenia más probable de dicho género. Luego, (ii) se mapeó el hábitat de cada una de las especies consideradas en la filogenia, buscando así agrupar especies por nicho ecológico. Esto, con el fin de tener un panorama de las bacterias candidatas que podrían ayudar a diferenciar dieta, es decir, bacterias cuyo hábitat natural es la flora oral. (iii) Luego, se puso a prueba la relación filogenia-hábitat, seleccionando una bacteria recientemente descubierta y con tan sólo una referencia, postulando una hipótesis sobre su hábitat en base a la filogenia, en este caso, la microbiota oral humana. Finalmente, (iv) se realizó un pcr con partidores específicos para dicha bacteria, buscándola en muestras de saliva de individuos con distintos hábitos alimentarios.

#### b. Filogenia del género.

El género *Streptococcus* es un linaje muy diverso que pertenece a las bacterias ácido-lácticas. Hoy en día se clasifica taxonómicamente a este grupo

bacteriano, junto a otros géneros como el *Lactococcus*, dentro de la familia *Streptococcaceae*, y esta familia dentro del orden *Lactobacterales* (Facklam, 2002). Son organismos Gram-positivos, esféricos, catalasa-negativos y anaerobios facultativos, con tendencia a formar cadenas o parejas (Montes y García-Arenzana, 2006; Lal *et al.*, 2011).

La clasificación de este género ha ido construyéndose en un principio a partir de características fenotípicas, y luego a partir de la secuenciación del gen 16SrRNA, de la cual han sido propuestos 6 distintos grupos, a saber: *pyogenic*, *anginosus*, *mitis*, *salivarius*, *bovis*, y *mutans* (Facklam, 2002; Rodicio y Mendoza, 2004; Montes y García-Arenzana, 2006; Lal *et al.*, 2011; Kawamura *et al.*, 1995). No obstante, dicha clasificación no es tan consistente, ni abarca a todas las especies conocidas.

Las filogenias se han ido utilizando desde hace tiempo para variados propósitos. Kawamura *et al* (1995) realizaron el estudio pionero que propuso la actual hipótesis filogenética para el género. Aquí fueron propuestos los seis grupos de especies aún considerados, utilizando fragmentos del gen 16S r RNA de 28 especies distintas.

Otro importante estudio fue el de Simmon *et al* (2008) quienes examinaron el grupo *viridans* usando secuencias de los genes 16S r RNA, *tuf* y *rpoB* de 22 especies y subespecies distintas, con el fin de evaluar las relaciones filogenéticas de este grupo –de gran importancia clínica- estudiando muestras clínicas de pacientes con endocarditis. Se concluye lo dificultoso de identificar una especie a causa de la transferencia horizontal de genes y los distintos tiempos de reloj evolutivos en cada fragmento de DNA.

Otros estudios buscan resolver discordancias en subclados. Es el caso de Pombert *et al* (2009) quienes analizaron secuencias de los genes 16S rRNA, *recA*, *secA* y *secY* con el fin de inferir las relaciones filogenéticas al interior del grupo *salivarius*, que contiene 3 especies, a saber, *S. salivarius*, *S. thermophilus* y *S. vestibularis*, concluyéndose la relación de hermandad entre

*S. thermophilus* y *S. vestibularis*, y, por lo tanto, la temprana divergencia de *S. salivarius*.

Además, diversos estudios han examinado la capacidad filogenética de ciertos fragmentos génicos. Por ejemplo, Täpp *et al.* (2003) analizaron al gen *rnpB* sobre una muestra de 50 especies, con el fin de evaluar su utilidad para realizar filogenias y proponerlo como gen alternativo al 16S r RNA. Asimismo, Itoh *et al.* (2005) propusieron, además de 16S r RNA, los genes *dnaJ* y *gyrB* como buenos marcadores filogenéticos, incluyendo 45 especies y subespecies en su estudio. Igualmente, el gen *recN* demostró ser consistente, en un extenso análisis de 60 especies (Glazunova *et al.*, 2010).

Sin embargo, los análisis filogenéticos revisados hasta ahora no han resuelto completamente todas las relaciones filogenéticas entre todas las especies de los distintos grupos. Por ejemplo, Itoh *et al.* (2006) concluyen que las discrepancias observadas entre los 3 genes que utilizaron y los subsecuentes 3 distintos árboles generados se explica, ya sea por la transferencia horizontal de genes o por distintas tasas de mutación. Esto también puede ser observado en el trabajo de Simmon *et al.*, donde para diferentes *loci* se tienen diferentes resultados filogenéticos, resultando en una discordancia que, para los autores, se explica debido al intercambio de material genético entre bacterias. Ambos estudios llevan a cabo sus análisis usando las distancias filogenéticas (o *Neighbor-joining*) por lo que dicho análisis podría ser complementado con un análisis bayesiano.

Asimismo, otros estudios, como Glazunova *et al.* (2006) y Täpp *et al.* (2003) presentan, mediante el uso de distintos genes y herramientas filogenéticas (a saber, *recN* y el uso de *neighbor-joining* en el primero; y el gen *rnpB* además de un análisis bayesiano en el segundo), diferentes hipótesis filogenéticas, como puede verse en la Fig 2 y 3, donde dichas hipótesis se han resumido o condensado en “grupos”.

FIG 2. Hipótesis Filogenética de Glazunova *et al* (2006).

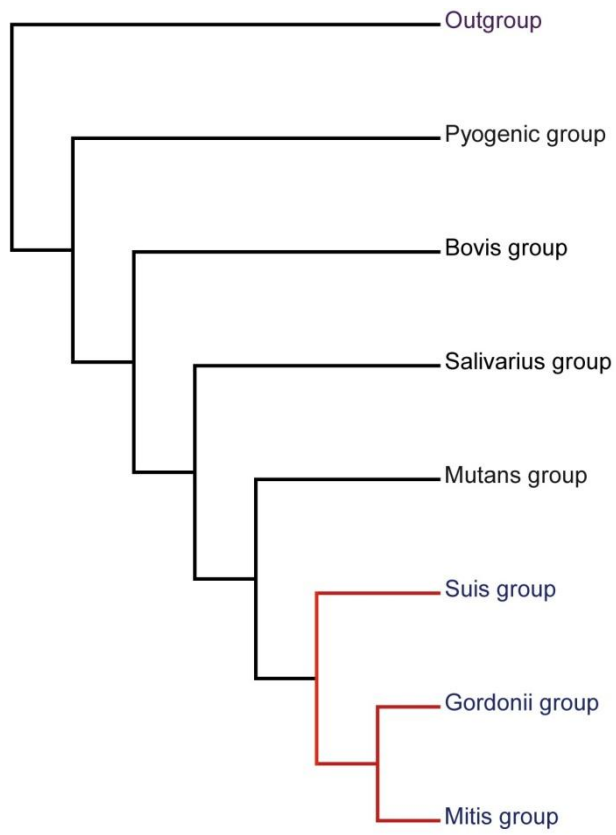
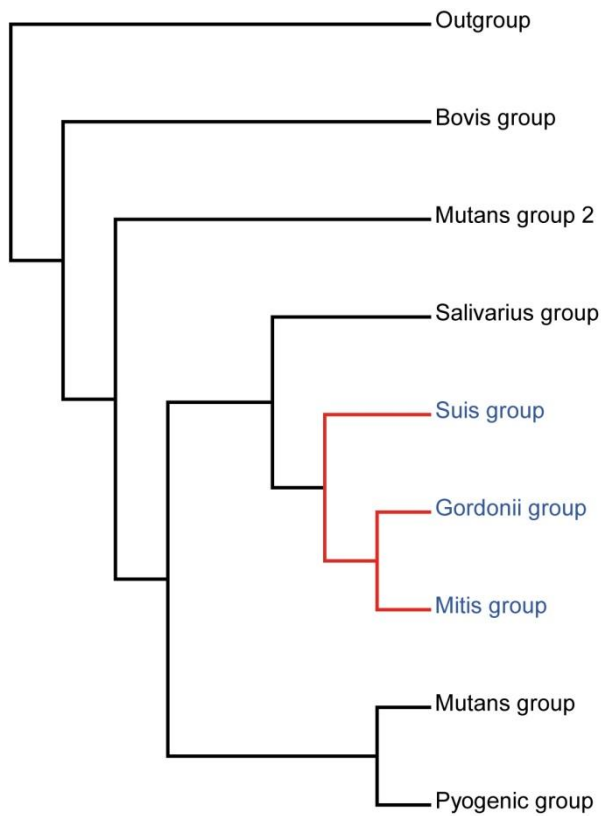


FIG 3. Hipótesis Filogenética de Tapp *et al* (2003).



Como se ve en las figuras 2 y 3, lo que permanece constante es la distribución del grupo gordonii y mitis como clados hermanos, y, además, el grupo suis como basal a ambos. No obstante, la posición del grupo *mutans*, *pyogenic* y *bovis*, por ejemplo, es variable dentro de los dos árboles filogenéticos. De este modo, no existe una hipótesis clara ni para estas interrogantes, ni para el género *Streptococcus* en general. Es más, si ahondamos en más estudios, las posibilidades se multiplican.

Usando las bases de dato genómicas disponibles es posible incorporar, en un análisis único filogenético, cada fragmento génico previamente reportado para dar resultados filogenéticos confiables y cubriendo todas las especies bacterianas conocidas. Aquí se intenta, por tanto, proponer una filogenia extensiva para el género *Streptococcus* evaluando las hipótesis filogenéticas alternativas.

#### c. Hábitats.

Además de la gran diversificación filogenética, los nichos ecológicos de las especies que componen el género engloban diversos ambientes. Algunos estreptococos son de gran importancia clínica, al ser patógenos tanto en humanos como en otros animales. Otros son comensales normales de la microbiota tanto humana como de otros animales. Esto último explica su presencia frecuente en muestras contaminadas (Boggs et al, 2012; Glazunova et al., 2010; Montes y García-Arenzana, 2006).

La patogenicidad de las especies del género es bastante diversa. Algunas especies pueden causar: meningitis, neumonía, endocarditis, fasciitis, caries dental, entre otras enfermedades (Glazunova et al., 2010). Dentro de la amplia gama de ambientes y/o hospederos del grupo bacteriano se encuentran la mucosa bucal, tracto respiratorio, tracto digestivo y genitourinario, además de la piel, tanto en humanos como en otras especies de animales (Hardie y Whiley, 1997; detalles adelante, Tabla 10). Sin embargo, es bastante probable que el rango de hábitats de cada especie sea, en su mayoría, desconocido, debido a que este conocimiento depende de estrategias de muestreo que no

están enfocadas a revelar las características ecológicas en relación a hábitats, especies y nichos. Una inspección visual previa sobre filogenias publicadas, revisando hábitats de las especies nos permitió plantear que, en general, existe una correlación entre cercanía filogenética y nicho ecológico.

d. Hipótesis bacteria-nicho-filogenia.

Posteriormente, y en base a la gran filogenia que se obtiene, se evalúa la posición filogenética de una especie en particular para probar un modelo de inercia filogenética con relación al hábitat. *Streptococcus massiliensis* es una especie recientemente descubierta en una muestra de sangre humana (Glazunova *et al.*, 2003). Dicha especie, aparentemente, está emparentada filogenéticamente al grupo mitis y especies cercanas, esto es, *S. constellatus*, *S. intermedius*, *S. anginosus*, *S. cristatus*, *S. sinensis*, *S. gordonii*, *S. sanguinis*, *S. pneumoniae*, *S. pseudopneumoniae*, *S. mitis*, *S. oligofermentans*, *S. infantis*, *S. peroris*, *S. oralis*, *S. australis*, *S. parasanguinis* (Boggs *et al.*, 2012; Glazunova *et al.*, 2006; Kawamura *et al.*, 1998). La gran mayoría de dichas especies están presentes en la cavidad oral humana, por lo que se presume *a priori* que *S. massiliensis* también habitaría la cavidad oral.

e. Dieta y bacteria.

Para probar la hipótesis previa, se realizó un PCR utilizando muestras de saliva de personas con distintas costumbres dietarias. De este modo, se evalúa la presencia de la bacteria en un hábitat hasta ahora desconocido, y se evalúa adicionalmente su presencia o frecuencia en individuos con consumo diferencial de alimentos.

## OBJETIVO GENERAL (Oligoelementos)

Probarla aplicabilidad de PIXE sobre material bioantropológico local para el estudio de oligoelementos.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Analizar mediante PIXE la superficie de cada una de las muestras, tanto dentales como óseas.
2. Evaluar la diagénesis al analizar mediante PIXE las muestras con la corteza ósea removida
3. Describir la composición de los oligoelementos de cada pieza analizada.
4. Evaluar la capacidad predictiva de la técnica para patrones dietarios
5. Comparar señales intraindividuales (entre pieza ósea y dental) para comparar las señales en distintos períodos de la vida del individuo.

## OBJETIVO GENERAL(Diseño Genético-molecular)

-Diseñar un método para el análisis genómico bacteriano contenido en el tártaro dental, (para inferir dietas, especialmente paleodietas).

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Realizar una filogenia completa y resuelta del género *Streptococcus*.
2. Mapear los hábitats de cada una de las especies muestreadas
3. Diseñar partidores específicos para una bacteria y así testear la relación filogenia-hábitat.
4. Identificar la bacteria en muestras de la cavidad oral.
5. Revisar relación presencia-ausencia-frecuencia de la bacteria, en relación con la dieta del individuo.

# CAPÍTULO I: PIXE.

## MATERIAL Y MÉTODOS.

Para la detección de elementos traza se analizaron colecciones bioantropológicas de la Facultad de Ciencias Sociales en la Universidad de Chile. La colección escogida fue Cementerio General, la que contempla un período histórico relativamente reciente en Chile, y corresponden a restos subactuales del Cementerio General, cuya data no excede los 50 años antes del presente. La elección de esta colección, por sobre las colecciones arqueológicas, se justifica en tanto éste es un estudio preliminar, para el cual contar con datos como sexo, edad y causa de muerte (como es el caso) es útil para la generación de un protocolo. Cabe mencionar que, en su mayoría, los restos de ésta colección correspondían a personas con un bajo nivel socioeconómico, con sepulturas en “patios de tierra” y sin familiares que reclamasen sus restos.

Fueron escogidos 23 esqueletos de ambos sexos, abarcando edades de 6 a 18 años, de 24 a 35 y de 50 a 54 años de edad (Detalles en Anexo, Tabla A5). En estos individuos el criterio de inclusión primordial de la muestra a analizar fue el tamaño de la misma (sin tener que intervenir el material), debido a que para el análisis ésta debe estar contenida en una tómbola que soporta 30 muestras, y donde el diámetro máximo de cada espacio para las muestras no supera los 2,5 cm. Por esto, ciertas piezas dentales (como la dentadura anterior), además de falanges distales de manos y pies, sumado a fragmentos de huesos que cumplan con dicho requisito, fueron privilegiados. El laboratorio de antropología física brinda un proceso de conservación a todas las muestras, indistintamente, lo que para la colección Cementerio General implicó un tratamiento de limpieza mecánica general, dada la gran cantidad de restos óseos disponibles (Lemp et al, 2008).

El análisis de muestras dentales y óseas mediante el método PIXE se realizó en el Laboratorio de Haces Iónicos, de la Facultad de Ciencias de la



Universidad de Chile, el cual cuenta con acelerador electrostático de tipo *Van deGraaff*<sup>1</sup>.

Para dicho análisis se contó con las siguientes etapas.

1. Toma de muestras (diente y hueso, este último exponiendo corteza y médula).
2. Preparación de material para el análisis de PIXE: Medición del segmento óseo (diámetro y grosor), adhesión a un anillo de 2,5 cm de diámetro y adjunción a la tómbola.
3. Estandarización de un protocolo para el uso de muestras en análisis de valores de elementos traza en hueso, diferenciando entre resultados obtenidos desde muestras tomadas de la corteza *versus* la médula del hueso (controlando la influencia de la diagénesis); entre valores derivados de diente y de hueso; con limpieza mecánica y química<sup>2</sup>.
4. Montaje, análisis y detección de oligoelementos vía PIXE<sup>3</sup>.
5. Análisis de los resultados.

Se utilizó una cámara de *scattering*, reacondicionada con el propósito de analizar muestras gruesas (como es el caso de los dientes y huesos). Para ello se utilizó un haz de protones de 2,2 MeV de energía y una corriente promedio de 5 nA. Esto último se logra mediante dos colimadores de tántalo, el primero de 2.2 mm de diámetro define el perfil del haz, mientras que el segundo colimador de 1,5 cm de diámetro evita que partículas ampliamente dispersadas interactúen con el interior de la cámara de *scattering*. Una vez montadas las muestras se debe lograr un alto-vacío de  $10^{-6}$  torr dentro de la cámara, lo cual se obtiene mediante una bomba turbomolecular. Cuando el haz de partículas

---

<sup>1</sup>Cabe destacar que también fue propósito de este estudio complementar lo recabado con Análisis de GIXE, en el mismo laboratorio. Esto se realizó en una ocasión y sin resultados favorables.

<sup>2</sup>Esto último (limpieza química) no pudo llevarse a cabo por imponderables acaecidos el presente año 2010. Los resultados expuestos tan sólo exhiben muestras limpiadas mecánicamente.

<sup>3</sup>Se concretaron 3 análisis, por tanto este paso y el siguiente se realizó en 3 ocasiones: la primera y segunda con material dental, la tercera con material óseo (véase *Resultados*).

incide sobre la muestra induce radiación-X característica la cual debe atravesar varios materiales antes de llegar al detector de Si (Li) (marca ORTEC, modelo SLP-06165). El primer medio corresponde a una lámina de Mylar de  $6.4 \mu\text{m}$ , el segundo a 1 cm de aire y el tercero a una ventana de berilio de  $25.4 \mu\text{m}$ , la que a su vez está a 7 mm del detector.

Con el fin de que sobre cada muestra se irradie con la misma dosis, se montó un sistema de medición indirecta de carga (Fig 4). La metodología consiste en posicionar a 6.0 cm de la muestra una delgada película de aluminio autosoportante de  $0.5 \mu\text{m}$ , sobre la cual incidirán también los protones. Esto produce un espectro de retrodispersión (Rutherford Backscattering Spectrometry) el cual se colecta con un detector de barrera superficial ubicado a un ángulo de  $150^\circ$ . La señal en este espectro se calibra previamente con respecto a la carga depositada sobre una *Faraday Cup* (Fig. 4). La carga con la que se irradia cada muestra fue de  $0,5 \mu\text{C}$ , lo cual implica que los tiempos de colección de espectros PIXE en promedio fluctuaran entre los 300 y 600 segundos, dependiendo de las condiciones de cada muestra.

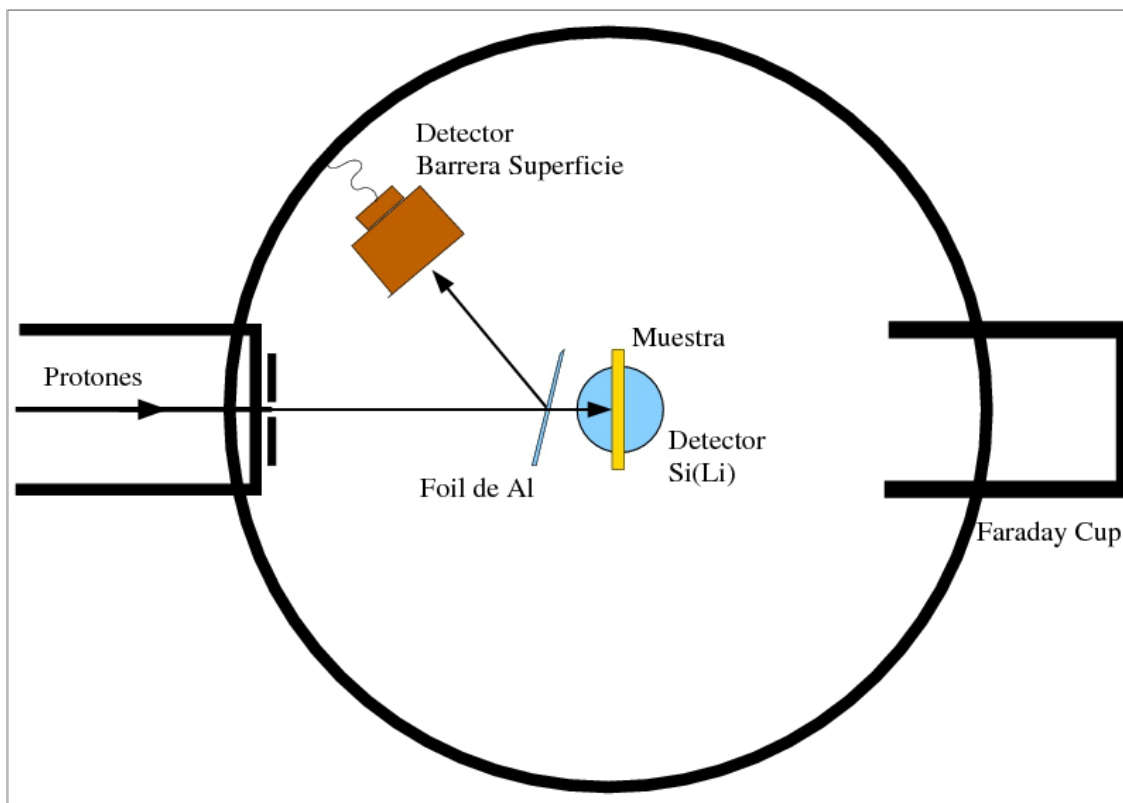
El equipo electrónico que se encarga de traducir la información colectada por el detector (voltaje) en un espectro de energías se logra con los siguientes dispositivos: (i) un preamplificador, cuya tarea principal consiste en filtrar señales espurias provenientes desde el detector; (ii) un amplificador que logra transformar ese pulso en uno que pueda ser leído por un convertidor análogo-digital. En este caso se requiere que el pulso tenga forma Gaussiana y que su amplitud sea superior a los 50 mV (ruido electrónico base) pero inferior a 10 V. Este último viene condicionado por (iii) el analizador multicanal (MCA) que transforma dicho pulso en señales lógicas de 5 V de amplitud que, luego de ser leídas, son almacenadas a modo de un valor único o cuenta, posicionándose en un canal específico del MCA (Fig. 5). En cada paso debe asegurarse que la amplitud de la señal de voltaje sea proporcional a la energía del fotón-X, conformándose de este modo un espectro que contenga un abanico de elementos distintos provenientes desde la muestra.

Para obtener los espectros, previamente se calibra el sistema con una fuente radioactiva (Am-241), cuyos *peaks* van a representar un canal específico y una energía específica. De esta forma, se correlaciona el multicanal con energía en [keV], y se identifican, a partir de distintas áreas, distintas energías y distintos elementos.

El análisis de datos se realiza con el programa GUPIX. Luego de obtener el área bajo la curva, y conociendo la corriente irradiada, la eficiencia del detector, la función de transmisión del material, además de los efectos de matriz (el *stopping power*, o pérdida de energía de las partículas al penetrar un material, en este caso grueso; y la atenuación de la intensidad del rayo X, también producida al interior del material) entre otras variables, se estima la concentración del elemento que se quiere identificar.

Es importante mencionar que las instalaciones utilizadas en este estudio están configuradas para realizar un análisis de PIXE interno, lo que condiciona el análisis en tanto no se puede ver en el material a analizar el punto exacto donde se está irradiando dentro de la muestra, pero que para este análisis no significó ningún problema. El análisis de dientes fue el más fructífero, y es el que se pasará a detallar a continuación.

FIG. 4. Esquema PIXE



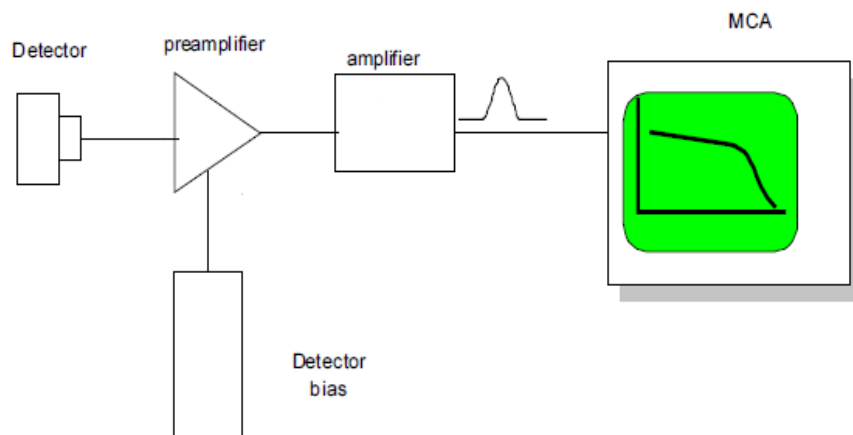


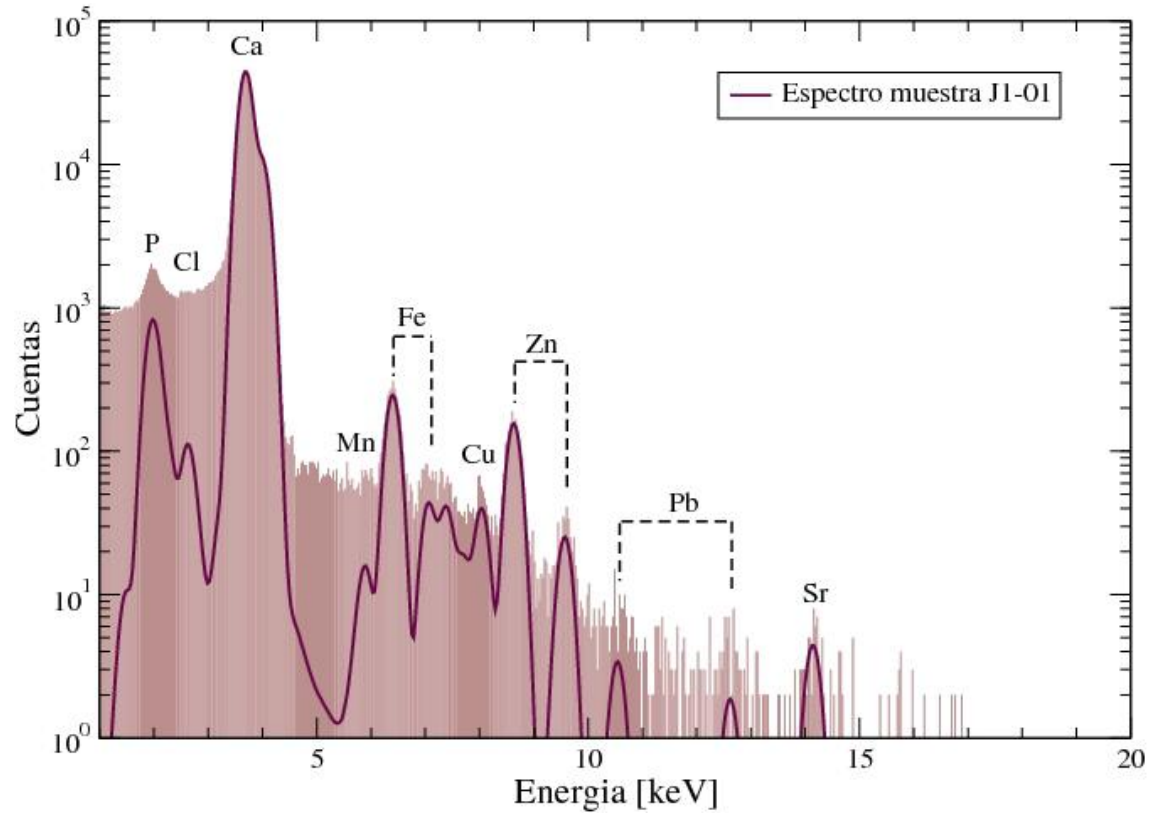
FIG.5. Esquema detector-MCA

## RESULTADOS.

En Julio de 2009 se analizaron 9 muestras dentales, procedentes de 3 individuos (un adulto de 35 años [A1,A2,A3], uno de 24 [J1,J2,J3] y un infante de 6 [I1,I2,I3], todos de sexo masculino). Dichas muestras contemplan tanto dentadura anterior como posterior (en este último caso, tan sólo se utilizaron molares fragmentados).

El tiempo de irradiación fue de, en promedio, 5 minutos. La posición del haz fue variando (para tener valores promedio) entre superior, central e inferior para todas las muestras. Entre los elementos distinguibles figuran [P, Cl, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, Pb, Sr], de los cuales la presencia de [Zn, Sr, Cu, y Ca] es bastante favorable para nuestros propósitos (Fig. 6).

Fig. 6. Ejemplo del primer análisis. Ind. 24 años, masculino. (Muestra J1-01)



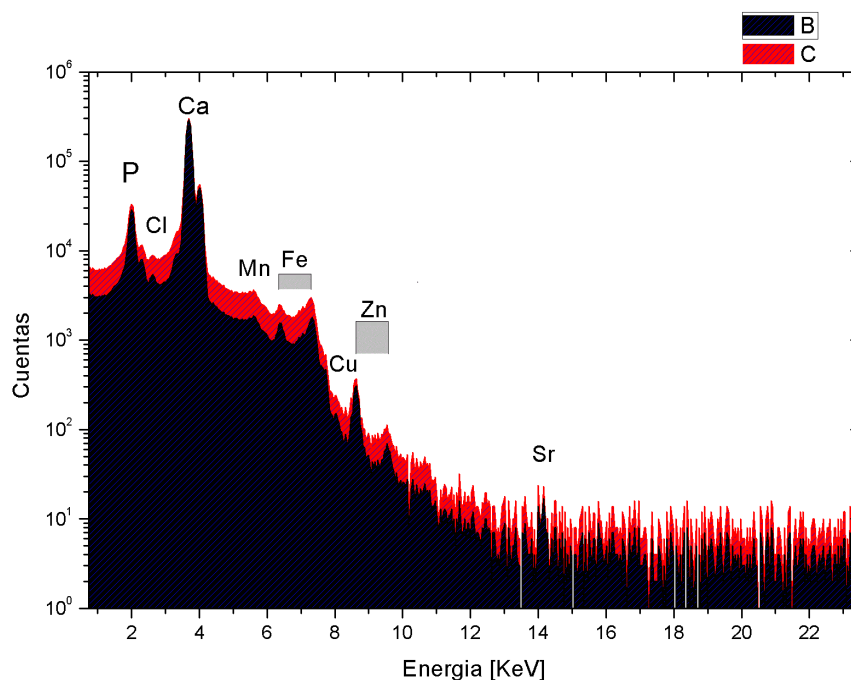
Producto de exhibir espectros bien definidos, se procedió a irradiar a la muestra J1 un total de 9 veces en distintas zonas. Los valores promedio de las concentraciones obtenidas en dichas irradiaciones pasan a ser expuestos a continuación (Tabla 1).

Tabla 1. Ind. J1, Concentraciones promedio [ppm]. (Detalles en Anexos, Tabla A1)

|               | Promedio   |               | Promedio   |
|---------------|------------|---------------|------------|
| P             | 15870,4667 | ZnKA          | 1016,92222 |
| Incerteza [%] | 12         | Incerteza [%] | 4          |
| Incerteza_P   | 215        | Incerteza_Zn  | 40         |
| CaKA          | 442514,333 | SrK           | 21,9       |
| Incerteza [%] | 0,2        | Incerteza [%] | 47         |
| Incerteza_Ca  | 735        | Incerteza_Sr  | 9          |
| FeKA          | 1723,28889 | PbL           | 53,0666667 |
| Incerteza [%] | 4          | Incerteza [%] | 38         |
| Incerteza_Fe  | 55         | Incerteza_Pb  | 15         |
| CuK           | 156,755556 |               |            |
| Incerteza [%] | 23         |               |            |
| Incerteza_Cu  | 29         |               |            |

Al tener mejores resultados (esto es, espectros bien definidos y una buena resolución de los elementos que se esperan obtener) en el individuo de 24 años de edad, se procedió a realizar un nuevo análisis, tomando piezas de la dentadura anterior (que resultó ser la más idónea, dadas las características que ofrece la tómbola de la cámara para las muestras: una superficie relativamente plana y lisa, y un tamaño que no exceda los 2,5 cm de largo). Se utilizaron 5 piezas dentales, todos incisivos y pertenecientes al mismo individuo. Se irradió en promedio unos 5 minutos cada muestra, pudiéndose observar relativamente los mismos elementos: [Ca, K, Fe, Zn, Sr, Cl, Mn] (fig. 7).

Fig. 7. Espectro de elementos contenidos en muestra I1a. (Ind. 24 años, masculino.)  
(Detalles en Anexos, Tabla A2, A3)



Un tercer análisis se realizó, para probarla efectividad de la técnica con material óseo, y comparar dicha efectividad con la obtenida con muestras dentales. Fueron escogidas 40 muestras, abarcando distintos individuos, distinto segmento anatómico, distintas edades y ambos sexos. De éstas, tan sólo 7 muestras pudieron acceder a análisis (al ser compatibles con el diseño de la tómbola) (Detalles en Anexos, Tabla A5). Primaron las falanges distales de manos y pies, y fragmentos de otros huesos, como costillas, que cumplían con el requisito excluyente del tamaño de la muestra. Se utilizó un portamuestras para testear si el análisis de tejido trabecular (en un fragmento cuya cortical se encontraba removida) era apto para el análisis. El resultado fue negativo.

Los resultados preliminares de este último análisis no son muy distantes de lo esperado (comparando con lo obtenido en dientes). Se observan los mismos elementos principales [Ca, K, P, Fe, Mn, Zn] pero no es distinguible [Sr] (Fig. 8) (Detalles en Anexo, Tabla A4). Se espera que con nuevos análisis podamos encontrar dicho elemento, cambiando los parámetros y ajustándolo para estas nuevas muestras.

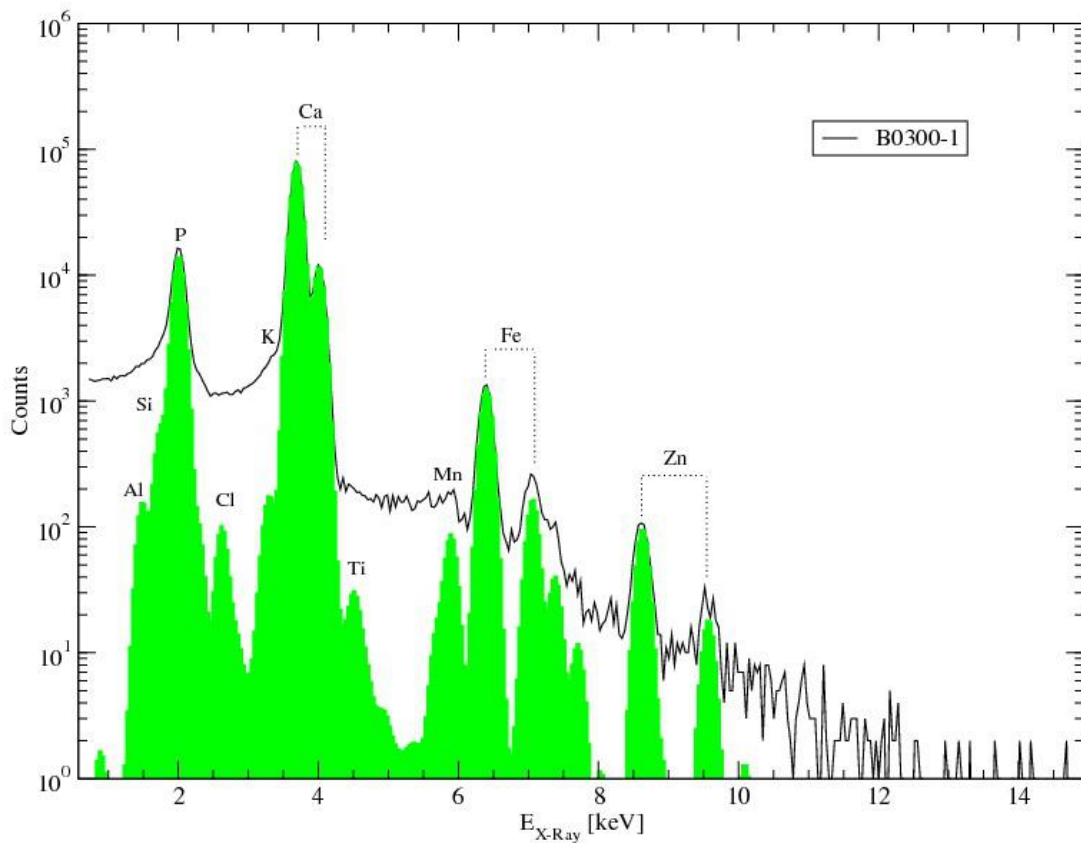
En general, los resultados obtenidos en este estudio son consistentes con otros estudios donde se utilizaron otras variedades de análisis de PIXE, y aplicado a individuos. Un ejemplo es el análisis por PIXE externo en piezas dentales de pacientes adultos de un Hospital de India (Rautray et al, 2010), y un estudio de micro-PIXE en dedos de adultos mayores expuestos a altos índices de Sr en su dieta (Zamburlini et al, 2009). En ambos casos, los peaks esperados son relativamente los mismos, y los elementos que podrían ser interesantes para inferir dieta se encuentran presente. Sin embargo, se hace imperioso definir una metodología para validar los datos cuantitativos, de modo que estos sean comparables interpoblacionalmente y, consecuentemente, deducir patrones dietarios. No obstante lo anterior, estos resultados preliminares confirman la factibilidad de estudiar las concentraciones de distintos elementos en muestras óseas y dentales de distintos especímenes en laboratorios locales. Respecto a las comparaciones diente-hueso, en este estudio resultó más informativo el uso



de dientes, más precisamente los incisivos, en lugar del material óseo. No obstante, falta por realizar nuevos análisis para, de este modo, adaptar el montaje a material óseo y poder realizar dicha comparación.

En cuanto a la evaluación de la diagénesis, las muestras con tejido trabecular expuesto no arrojaron resultados, lo que se puede deber a su superficie no-lisa. No obstante aquello, falta por afinar más el uso de material óseo para estos análisis.

Fig. 8. Espectros de Ind. B0300-1. Fragmentos de costilla de un individuo femenino de 54 años de edad.



## CONCLUSIONES:

Los resultados obtenidos en este estudio son alentadores, en tanto son similares a otros obtenidos, actualmente, en otros laboratorios en el mundo. Falta por desarrollar de mejor manera la metodología para material óseo, así como llevar a cabo comparaciones poblacionales.

Esto abre las puertas para que se puedan realizar futuros estudios respecto a dietas, contaminación de muestras o, estudios de enfermedades nutricionales y metabólicas en restos bioantropológicos. Junto a esto, se presenta también la posibilidad de trabajar con material contemporáneo (por ejemplo, dientes), y cotejar los datos de PIXE con la historia oral del individuo analizado, respecto a su dieta, enfermedades, etc.

.

# CAPÍTULO II: GENÉTICA MOLECULAR

## METODOLOGÍA

### Muestras genómicas.

Se realizó un diseño filogenético para la búsqueda de bacterias dentro de la cavidad oral humana. Como modelo, se utilizó todo el género *Streptococcus*. *Lactococcus lactis subsp. lactis* y *Lactococcus lactis subsp. cremoris* fueron elegidos para el *outgroup*. Dicho género es uno de los cuatro miembros de *Streptococcaceae*. A pesar de que un análisis preliminary mostró que *Pilibacter* es el clado hermano de *Streptococcus* dentro de esta familia, la falta de datos para este género no nos permitió desarrollar análisis confiables, por lo tanto, *Lactococcus* cuenta con las mejores condiciones para ser usado como *outgroup* (Figura 9).

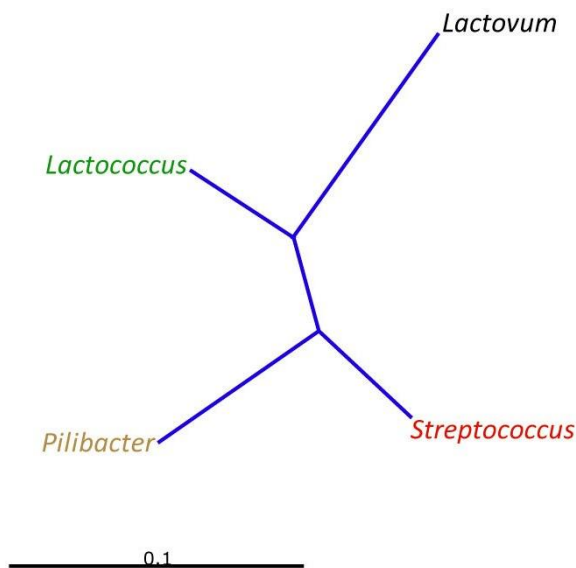


Fig.9.

Árbol sin raíz de la familia *Streptococcaceae*.

Se observan como “géneros hermanos” a *Lactococcus*- *Lactovum* y *Streptococcus* – *Pilibacter*.

Se delineó un modelo de mapeo de hábitats filogenéticos dentro de dicho género. Para ello, se buscó en la literatura genes previamente utilizados para estudios filogenéticos, como lo son 16sr RNA, tuf, rpoB, rnpB, sodA, recN, gyrB y dnaJ. Luego, se procedió a buscar los datos genómicos en GENBANK (Tabla 2).

Tabla2. Listado de Especies, número de acceso y pares de bases por cada gen.

| Especie                                   | sodA |            | tuf      |            | rpoB |  | recN |            |
|---|------|------------|----------|------------|------|--|------|------------|
|   | bp   | Accesion   | bp       | Accesion   | bp   | Accesion   | bp   | Accesion   |
| <i>S. mutans</i>                          | 612  | AE014133.2 | 119<br>7 | AE014133.2 | 3105 | AP010655<br>.1   | 1249 | EU917289.1 |
| <i>S. agalactiae</i>                      | 609  | AE009948.1 | 119<br>7 | AL766847.1 | 3105 | AE009948<br>.1   | 1249 | EU917242.1 |
| <i>S. acidominimus</i>                    | 435  | Z95892.1   | 761      | AY266992.1 | 691  | AF535181<br>.1   | 1249 | EU917241.1 |
| <i>S. anginosus</i>                       | 453  | FJ712177.1 | 826      | AF276257.1 | 3105 | AF535183<br>.1   | 1249 | EU917248.1 |
| <i>S. alactolyticus</i>                   | 435  | AJ297185.1 | —        | —          | 680  | DQ23244<br>5.1   | 1249 | EU917226.1 |
| <i>S. australis</i>                       | 435  | GU907529.1 | 761      | EU156907.1 | 680  | DQ13298<br>3.1   | —    | —          |
| <i>S. caballi</i>                         | 399  | EF364100.1 | —        | —          | —    | —  | —    | —          |
| <i>S. canis</i>                           | 435  | Z99175.1   | 761      | EU156908.1 | 680  | DQ23248<br>8.1   | —    | —          |
| <i>S. castoreus</i>                       | 435  | EU003820.1 | —        | —          | 680  | EU003817<br>.1   | 1249 | EU917312.1 |
| <i>S. criceti</i>                         | 435  | Z95898.1   | 821      | AF276260.1 | 680  | DQ23248<br>5.1   | 1249 | EU917257.1 |
| <i>S. cristatus</i>                       | 435  | GU907530.1 | 761      | AF276261.2 | 2061 | AF194513<br>.1 ,<br>AF194514<br>.1 ,<br>AB199920<br>.1 | 1249 | EU917258.1 |
| <i>S. devriesei</i>                       | 435  | DQ232544.1 | —        | —          | 680  | DQ23244<br>6.1   | 1249 | EU917306.1 |
| <i>S. didelphis</i>                       | 435  | DQ232545.1 | —        | —          | 680  | DQ23244<br>7.1   | 1249 | EU917259.1 |
| <i>S. downei</i>                          | 435  | Z95899.1   | 792      | AF276262.1 | 680  | DQ13298<br>4.1   | —    | —          |
| <i>S. dysgalactiae subsp. equisimilis</i> | 486  | AP010935.1 | 121<br>5 | AP010935.1 | 3105 | AP010935<br>.1   | 1249 | EU917227.1 |
| <i>S. constellatus</i>                    | 453  | FJ712176.1 | 821      | AF276259.1 | 680  | FJ712146.<br>1   | 1093 | FJ712113.1 |
| <i>S. intermedius</i>                     | 453  | FJ712187.1 | 799      | AF276267.1 | —    | —  | 1249 | EU917282.1 |
| <i>S. entericus</i>                       | 435  | DQ232547.1 | —        | —          | 680  | DQ23244<br>8.1   | 1249 | EU917228.1 |
| <i>S. equi subsp. equi</i>                | 486  | FM204883.1 | 110<br>0 | FM204883.1 | 3105 | FM20488<br>3.1   | 1249 | EU917229.1 |

|   |     |            |          |            |      |                                       |      |            |
|---|-----|------------|----------|------------|------|---------------------------------------|------|------------|
| <i>S. equinus</i>                               | 435 | AJ297213.1 | 792      | AF276258.1 | 3105 | AF535187<br>.1                        | 1249 | EU917252.1 |
| <i>S. ferus</i>                                 | 435 | DQ132986.1 | 792      | AF276265.1 | 686  | AY770000<br>.1                        | 1249 | EU917265.1 |
| <i>S. gallinaceus</i>                           | 435 | DQ232548.1 | —        | —          | 680  | DQ23250<br>3.1                        | 1246 | EU917266.1 |
| <i>S. gallolyticus</i>                          | 486 | FN597254.1 | 110<br>0 | FN597254.1 | 3105 | FN597254<br>.1                        | —    | —          |
| <i>S. gordonii str. Challis substr.<br/>CH1</i> | 486 | CP000725.1 | 110<br>0 | CP000725.1 | 3105 | CP000725<br>.1                        | —    | —          |
| <i>S. halichoeri</i>                            | 435 | DQ232571.1 | —        | —          | 680  | DQ23247<br>1.1                        | 1249 | EU917277.1 |
| <i>S. henryi</i>                                | 399 | EF364099.1 | —        | —          | —    | —                                     | —    | —          |
| <i>S. hyointestinalis</i>                       | 435 | DQ232550.1 | —        | —          | 680  | DQ23244<br>9.1                        | 1249 | EU917231.1 |
| <i>S. hyovaginalis</i>                          | 435 | DQ232551.1 | —        | —          | 680  | DQ23245<br>0.1                        | 1249 | EU917232.1 |
| <i>S. infantarius subsp.<br/>infantarius</i>    | 435 | AJ306980.1 | 761      | EU156915.1 | 672  | EU420169<br>.1                        | —    | —          |
| <i>S. infantis</i>                              | 432 | GU907532.1 | 761      | EU156917.1 | 680  | DQ23248<br>2.1                        | 1249 | EU917280.1 |
| <i>S. iniae</i>                                 | 486 | EU661272.1 | 761      | EU156918.1 | 680  | DQ23249<br>3.1                        | 1249 | EU917281.1 |
| <i>S. luteciae</i>                              | 435 | AJ297212.1 | —        | —          | —    | —                                     | —    | —          |
| <i>S. lutetiensis</i>                           | 426 | GU991740.1 | 761      | EU156916.1 | 680  | DQ23248<br>0.1                        | 1249 | EU917279.1 |
| <i>S. macacae</i>                               | 435 | DQ232553.1 | 792      | AF276268.1 | 680  | DQ23245<br>2.1                        | 1249 | EU917285.1 |
| <i>S. macedonicus</i>                           | 435 | AJ297187.1 | 761      | EU156913.1 | 693  | AY315156<br>.1                        | 1249 | HE613569.1 |
| <i>S. marimammalium</i>                         | 435 | EU003821.1 | —        | —          | 659  | EU003818<br>.1                        | 1249 | EU917313.1 |
| <i>S. massiliensis</i>                          | 451 | AY769999.1 | 761      | EU156919.1 | 691  | AY769998<br>.1                        | 1249 | EU917311.1 |
| <i>S. minor</i>                                 | 435 | DQ232572.1 | —        | —          | 680  | DQ23247<br>2.1                        | 1249 | EU917286.1 |
| <i>S. mitis</i>                                 | 486 | FN568063.1 | 110<br>0 | FN568063.1 | 3105 | FN568063<br>.1                        | 1249 | EU917233.1 |
| <i>S. oligofermentans</i>                       | 435 | DQ232554.1 | 761      | EU156926.1 | 680  | DQ23250<br>8.1                        | 1249 | EU917290.1 |
| <i>S. oralis</i>                                | 435 | DQ232576.1 | 764      | AF276270.1 | 2658 | AY695496<br>.1<br>,<br>AB199956<br>.1 | 1249 | EU917234.1 |

|                            |     |            |          |            |      |                |      |            |
|----------------------------|-----|------------|----------|------------|------|----------------|------|------------|
| <i>S. orisratti</i>        | 435 | DQ232555.1 | —        | —          | 680  | DQ23245<br>3.1 | 1249 | EU917235.1 |
| <i>S. ovis</i>             | 435 | DQ232556.1 | —        | —          | 680  | DQ23245<br>4.1 | 1249 | EU917236.1 |
| <i>S. parasanguinis</i>    | 435 | GU907536.1 | 789      | AF276271.1 | —    | —              | 1249 | CP002843.1 |
| <i>S. parauberis</i>       | 435 | AJ544723.1 | 761      | EU156937.1 | 680  | DQ23245<br>5.1 | 1212 | EU917293.1 |
| <i>S. pasteurianus</i>     | 435 | DQ232583.1 | 761      | EU156914.1 | 680  | DQ23250<br>5.1 | 1249 | EU917273.1 |
| <i>S. peroris</i>          | 435 | DQ232541.1 | 761      | EU156938.1 | 680  | DQ23248<br>3.1 | 1249 | EU917294.1 |
| <i>S. phocae</i>           | 435 | AJ547799.1 | —        | —          | 680  | DQ23245<br>6.1 | 1249 | EU917237.1 |
| <i>S. pluranimalium</i>    | 435 | DQ232557.1 | 761      | EU156939.1 | 680  | DQ23245<br>7.1 | 1249 | EU917295.1 |
| <i>S. plurextorum</i>      | 356 | AM774231.1 | —        | —          | 687  | AM77423<br>2.1 | —    | —          |
| <i>S. pneumoniae</i>       | 486 | FM211187.1 | 110<br>0 | FM211187.1 | 3105 | FM21118<br>7.1 | 1249 | EU917238.1 |
| <i>S. porcinus</i>         | 435 | Z99177.1   | —        | —          | 680  | DQ23248<br>6.1 | 1249 | EU917296.1 |
| <i>S. pseudopneumoniae</i> | 390 | AB200048.1 | 761      | EU156954.1 | 680  | EU003819<br>.1 | 1249 | EU917314.1 |
| <i>S. pyogenes</i>         | 486 | CP000262.1 | 110<br>0 | AE009949.1 | 3105 | CP000261<br>.1 | 1249 | EU917297.1 |
| <i>S. rattii</i>           | 435 | DQ232559.1 | 792      | AF276272.1 | 680  | DQ23248<br>4.1 | 1249 | EU917298.1 |
| <i>S. salivarius</i>       | 432 | GU907538.1 | 792      | AF276273.1 | 691  | AF535169<br>.1 | 1249 | EU917239.1 |
| <i>S. sanguinis</i>        | 486 | CP000387.1 | 110<br>0 | CP000387.1 | 2922 | CP000387<br>.1 | 1249 | EU917299.1 |
| <i>S. sinensis</i>         | 435 | DQ232560.1 | 761      | EU156962.1 | 680  | DQ23245<br>8.1 | 1249 | EU917305.1 |
| <i>S. sobrinus</i>         | 435 | Z95919.1   | 780      | AF276275.1 | 680  | DQ23248<br>9.1 | —    | —          |
| <i>S. suis</i>             | 486 | CP000408.1 | 110<br>0 | CP000408.1 | 3102 | AM94601<br>6.1 | 1249 | CP002570.1 |
| <i>S. thermophilus</i>     | 486 | CP000024.1 | 110<br>0 | CP000024.1 | 3105 | CP000024<br>.1 | 1249 | EU917300.1 |
| <i>S. thoralensis</i>      | 435 | DQ232562.1 | —        | —          | 680  | DQ23246<br>1.1 | 1249 | EU917303.1 |
| <i>S. uberis</i>           | 486 | AM946015.1 | 110<br>0 | AM946015.1 | 3105 | AM94601<br>5.1 | 1249 | EU917309.1 |
| <i>S. urinalis</i>         | 435 | DQ232561.1 | 761      | EU156963.1 | 680  | DQ23246        | 1249 | EU917240.1 |

|   |                |                 |             |                |             |                |             |            |
|---|----------------|-----------------|-------------|----------------|-------------|----------------|-------------|------------|
|   |                |                 |             |                |             | 0.1            |             |            |
| <i>S. vestibularis</i>                    | 436            | AY687381.1      | 781         | AF276277.1     | 686         | AY687377<br>.1 | 1249        | EU917304.1 |
| <i>L. lactis subsp. lactis</i>            | 481            | CP001834.1      | 108<br>4    | CP001834.1     | 3105        | CP001834<br>.1 | _____       | _____      |
| <i>L. lactis subsp. Cremoris</i>          | 467            | CP000425.1      | 108<br>4    | CP000425.1     | 3105        | CP000425<br>.1 | _____       | _____      |
| <b>Especie</b>                            | <b>16SrRNA</b> |                 | <b>rnpB</b> |                | <b>dnaJ</b> |                | <b>gyrB</b> |            |
|   | bp             | Accesion        | bp          | Accesion       | bp          | Accesion       | bp          | Accesion   |
| <i>S. mutans</i>                          | 1542           | AB294730<br>.1  | 380         | AJ511678.<br>1 | 1134        | AE014133<br>.2 | 1953        | AP010655.1 |
| <i>S. agalactiae</i>                      | 1537           | AF459432<br>.1  | 374         | AJ511673.<br>1 | 1140        | AL766843<br>.1 | 1953        | AE009948.1 |
| <i>S. acidominimus</i>                    | 1334           | X58301.1        | 373         | AJ511681.<br>1 | 967         | AB239170<br>.1 | 900         | AB238609.1 |
| <i>S. anginosus</i>                       | 1559           | NR_04172<br>2.1 | 370         | AJ511731.<br>1 | 971         | AB238697<br>.1 | 900         | AB236189.1 |
| <i>S. alactolyticus</i>                   | 1501           | EU728776<br>.1  | 376         | AJ511706.<br>1 | _____       | _____          | _____       | _____      |
| <i>S. australis</i>                       | 1471           | NR_03693<br>6.1 | _____       | _____          | 648         | GU90754<br>1.1 | 458         | EU003771.1 |
| <i>S. caballi</i>                         | 1430           | NR_04419<br>0.1 | _____       | _____          | _____       | _____          | _____       | _____      |
| <i>S. canis</i>                           | 1482           | EU075058<br>.1  | 374         | AJ511684.<br>1 | 969         | AB238698<br>.1 | 900         | AB236191.1 |
| <i>S. castoreus</i>                       | 1508           | NR_04221<br>5.1 | _____       | _____          | _____       | _____          | 458         | EU003814.1 |
| <i>S. criceti</i>                         | 1530           | EU483241<br>.1  | _____       | _____          | 964         | AB238699<br>.1 | 900         | AB238610.1 |
| <i>S. cristatus</i>                       | 1533           | NR_04277<br>1.1 | 373         | AJ511700.<br>1 | 896         | AB238700<br>.1 | 900         | AB238611.1 |
| <i>S. dentapri</i>                        | 1550           | AB469560<br>.1  | _____       | _____          | _____       | _____          | _____       | _____      |
| <i>S. dentirosetti</i>                    | 1543           | NR_04146<br>0.1 | _____       | _____          | _____       | _____          | _____       | _____      |
| <i>S. devriesei</i>                       | 1471           | EU483245<br>.1  | _____       | _____          | _____       | _____          | 457         | EU003742.1 |
| <i>S. didelphis</i>                       | 1506           | AF176107<br>.1  | _____       | _____          | 914         | AB238810<br>.1 | 457         | EU003790.1 |
| <i>S. downei</i>                          | 1542           | NR_04277<br>4.1 | 376         | AJ511699.<br>1 | _____       | _____          | 900         | AB238618.1 |
| <i>S. dysgalactiae subsp. equisimilis</i> | 1492           | AP010935<br>.1  | 374         | CP002215<br>.1 | 1137        | AP010935<br>.1 | 1953        | AP010935.1 |
| <i>S. constellatus</i>                    | 1508           | AY277942<br>.1  | 370         | AJ511742.<br>1 | 964         | AB238808<br>.1 | 509         | AB441109.1 |

|   |      |                                    |     |                |      |                |      |            |
|---|------|------------------------------------|-----|----------------|------|----------------|------|------------|
| <i>S. intermedius</i>                       | 1531 | GU47090<br>8.1                     | 374 | AJ511743.<br>1 | 547  | AB441138<br>.1 | 1947 | AB562520.1 |
| <i>S. entericus</i>                         | 1335 | NR_02550<br>0.1                    | —   | —              | —    | —              | —    | —          |
| <i>S. equi subsp. equi</i>                  | 1495 | FM20488<br>3.1                     | 374 | FM20488<br>3.1 | 1137 | FM20488<br>3.1 | 1953 | FM204883.1 |
| <i>S. equinus</i>                           | 1539 | AB362710<br>.1                     | 373 | AJ511745.<br>1 | 916  | AB238704<br>.1 | —    | —          |
| <i>S. ferus</i>                             | 1540 | AB259060<br>.1                     | 366 | AJ511705.<br>1 | 902  | AB238705<br>.1 | 903  | AB238616.1 |
| <i>S. gallinaceus</i>                       | 1502 | NR_02545<br>3.1                    | —   | —              | —    | —              | 458  | EU003785.1 |
| <i>S. gallolyticus</i>                      | 1535 | AF323911<br>.1                     | 375 | AJ511683.<br>1 | 1143 | AP012053<br>.1 | 1953 | AP012053.1 |
| <i>S. gordonii str. Challis substr. CH1</i> | 1499 | CP000725<br>.1                     | —   | —              | 1134 | CP000725<br>.1 | 1950 | CP000725.1 |
| <i>S. halichoeri</i>                        | 1506 | NR_02902<br>5.1                    | —   | —              | —    | —              | 458  | EU003791.1 |
| <i>S. henryi</i>                            | 1430 | NR_04418<br>9.1                    | —   | —              | —    | —              | —    | —          |
| <i>S. hyointestinalis</i>                   | 1504 | EU728763<br>.1                     | 372 | AJ511696.<br>1 | 1014 | AB238709<br>.1 | 900  | AB238621.1 |
| <i>S. hyovaginalis</i>                      | 928  | EF151158.<br>1 /<br>DQ11867<br>0.1 | 376 | AJ512493.<br>1 | 974  | AB238710<br>.1 | 900  | AB238622.1 |
| <i>S. ictaluri</i>                          | 1471 | DQ46242<br>1.1                     | —   | —              | —    | —              | —    | —          |
| <i>S. infantarius subsp. infantarius</i>    | 1494 | EU163504<br>.1                     | 371 | AJ511688.<br>1 | 1008 | AB238812<br>.1 | 458  | EU003810.1 |
| <i>S. infantis</i>                          | 1468 | NR_04292<br>8.1                    | 387 | AJ511687.<br>1 | 835  | AB238711<br>.1 | 900  | AB238623.1 |
| <i>S. iniae</i>                             | 1536 | NR_02514<br>8.1                    | 378 | AJ511708.<br>1 | 905  | AB238712<br>.1 | 900  | GU324259.1 |
| <i>S. luteciae</i>                          | 1461 | NR_04205<br>1.1                    | —   | —              | —    | —              | —    | —          |
| <i>S. lutetiensis</i>                       | 1501 | JN713319.<br>1                     | 371 | AJ511709.<br>1 | —    | —              | 458  | EU003729.1 |
| <i>S. macacae</i>                           | 1542 | NR_04277<br>5.1                    | 373 | AJ511702.<br>1 | 1051 | AB238713<br>.1 | 900  | AB238625.1 |
| <i>S. macedonicus</i>                       | 1538 | AF459431<br>.1                     | 374 | AJ511677.<br>1 | —    | —              | 458  | HE613569.1 |
| <i>S. marimammalium</i>                     | 1500 | NR_02563<br>0.1                    | —   | —              | —    | —              | 458  | EU003815.1 |



|                            |      |                 |     |                |      |                |      |            |
|----------------------------|------|-----------------|-----|----------------|------|----------------|------|------------|
| <i>S. massiliensis</i>     | 1470 | NR_04317<br>3.1 | —   | —              | —    | —              | 458  | EU003813.1 |
| <i>S. merionis</i>         | 1354 | NR_04255<br>3.1 | —   | —              | —    | —              | —    | —          |
| <i>S. minor</i>            | 1497 | AY232833<br>.1  | —   | —              | —    | —              | 458  | EU003795.1 |
| <i>S. mitis</i>            | 1540 | AY518677<br>.1  | 387 | AJ511694.<br>1 | 1140 | FN568063<br>.1 | 1947 | FN568063.1 |
| <i>S. oligofermentans</i>  | 1510 | NR_02905<br>2.1 | —   | —              | —    | —              | 458  | EU003768.1 |
| <i>S. oralis</i>           | 1470 | DQ23253<br>5.1  | 387 | AJ511698.<br>1 | 1137 | FR720602<br>.1 | 1947 | FR720602.1 |
| <i>S. orisratti</i>        | 1474 | EU075064<br>.1  | 374 | AJ511692.<br>1 | 1043 | AB238813<br>.1 | 458  | EU003798.1 |
| <i>S. orisuis</i>          | 1553 | NR_04105<br>5.1 | —   | —              | —    | —              | —    | —          |
| <i>S. ovis</i>             | 1377 | NR_02647<br>1.1 | —   | —              | —    | —              | 458  | EU003799.1 |
| <i>S. parasanguinis</i>    | 1513 | NR_02484<br>2.1 | 373 | AJ511704.<br>1 | 974  | AB238798<br>.1 | 900  | CP002843.1 |
| <i>S. parauberis</i>       | 1541 | AF284579<br>.2  | 374 | CP002471<br>.1 | 890  | AB238799<br>.1 | 900  | AB238630.1 |
| <i>S. pasteurianus</i>     | 1511 | EU163495<br>.1  | —   | —              | —    | —              | 458  | AP012054.1 |
| <i>S. peroris</i>          | 1329 | EU156772<br>.1  | 387 | AJ511690.<br>1 | 890  | AB238800<br>.1 | 900  | AB238631.1 |
| <i>S. phocae</i>           | 1510 | HM03202<br>3.1  | 371 | AJ511670.<br>1 | 935  | AB238801<br>.1 | 900  | AB238632.1 |
| <i>S. pluranimalium</i>    | 1552 | Y18026.1        | 375 | AJ511697.<br>1 | —    | —              | 458  | EU003801.1 |
| <i>S. plurextorum</i>      | 1451 | NR_04264<br>9.1 | —   | —              | —    | —              | —    | —          |
| <i>S. pneumoniae</i>       | 1511 | AM15744<br>2.1  | 386 | CP002121<br>.1 | 1137 | AE005672<br>.3 | 1947 | CP000918.1 |
| <i>S. porcinus</i>         | 1496 | NR_02463<br>4.1 | 369 | AJ511675.<br>1 | —    | —              | 900  | AB175052.1 |
| <i>S. pseudopneumoniae</i> | 1468 | CP002925<br>.1  | —   | —              | —    | —              | 458  | EU003816.1 |
| <i>S. pseudoporcinus</i>   | 1491 | DQ30320<br>7.1  | —   | —              | —    | —              | —    | —          |
| <i>S. pyogenes</i>         | 1518 | FJ662846.<br>1  | 374 | CP003121<br>.1 | 1137 | AE009949<br>.1 | 1953 | CP000262.1 |
| <i>S. rattii</i>           | 1444 | NR_02551        | 373 | AJ511671.      | 896  | AB238804       | 900  | AB238635.1 |

|                                  |      |                 |     |                |      |                |      |            |
|----------------------------------|------|-----------------|-----|----------------|------|----------------|------|------------|
|                                  |      | 6.1             |     | 1              |      | .1             |      |            |
| <i>S. salivarius</i>             | 1543 | AF459433<br>.1  | 373 | FR873482<br>.1 | 621  | GU90755<br>0.1 | 900  | AB238640.1 |
| <i>S. sanguinis</i>              | 1510 | AY691542<br>.1  | 373 | AJ511682.<br>1 | 1134 | CP000387<br>.1 | 1950 | CP000387.1 |
| <i>S. seminale</i>               | 1275 | AB370977<br>.1  | —   | —              | —    | —              | —    | —          |
| <i>S. sinensis</i>               | 1512 | AF432855<br>.1  | —   | —              | —    | —              | 458  | EU003809.1 |
| <i>S. sobrinus</i>               | 1551 | AB294731<br>.1  | 373 | AJ511707.<br>1 | —    | —              | 900  | AB238641.1 |
| <i>S. suis</i>                   | 1536 | AF009497<br>.1  | 370 | AJ511674.<br>1 | 1137 | CP002633<br>.1 | 1953 | CP002641.1 |
| <i>S. thermophilus</i>           | 1544 | EF990662.<br>1  | 373 | AJ511712.<br>1 | 1134 | FR875178<br>.1 | 1953 | CP002340.1 |
| <i>S. thoralensis</i>            | 1519 | NR_02636<br>8.1 | —   | —              | 885  | AB238806<br>.1 | 900  | AB238637.1 |
| <i>S. uberis</i>                 | 1501 | NR_04082<br>0.1 | 372 | AJ511693.<br>1 | 1134 | AM94601<br>5.1 | 1953 | AM946015.1 |
| <i>S. urinalis</i>               | 1476 | DQ30319<br>4.1  | 373 | AJ511680.<br>1 | —    | —              | 458  | EU003763.1 |
| <i>S. ursoris</i>                | 1549 | AB501126<br>.1  | —   | —              | —    | —              | —    | —          |
| <i>S. vestibularis</i>           | 1553 | NR_04277<br>7.1 | 373 | AJ511724.<br>1 | —    | —              | 900  | AB238643.1 |
| <i>L. lactis subsp. lactis</i>   | 1539 | CP001834<br>.1  | —   | —              | 1140 | CP001834<br>.1 | 1956 | CP001834.1 |
| <i>L. lactis subsp. cremoris</i> | 1539 | CP000425<br>.1  | —   | —              | 1088 | CP000425<br>.1 | 1956 | CP000425.1 |
| <i>Lactovum miscens</i>          | 1456 | NR_04214<br>0   |     |                |      |                |      |            |
| <i>Pilibacter termitis</i>       | 1432 | NR_04294<br>9   |     |                |      |                |      |            |

## Análisis Filogenético-Molecular

Las secuencias fueron alineadas usando el programa Bioedit V. 7.0.9.0. Dichos alineamientos fueron revisados y re-editados manualmente. Posteriormente, se generó una matriz concatenada de todos los genes, con el programa Concatenator 1.0 (S. F, Com pers.). Los datos faltantes fueron codificados como *missing data* e incorporados a los análisis subsecuentes. Este enfoque de “super-matriz” ha demostrado que usar *missing data* superan los costos, especialmente cuando se usan métodos bayesianos de estimación filogenética (Wiens y Moen, 2008).

Los modelos de evolución molecular para secuencias nucleotídicas fueron seleccionados usando el *Akaike information criterion test* (AIC) del programa Modeltest (Posada & Crandall, 1998) and MrModeltest (Nylander, 2004). Para secuencias aminoacídicas, se utilizó el *software* PROTTEST v. 3.0.

Un primer análisis filogenético, sobre la súper matriz nucleotídica, se llevó a cabo usando el programa Mr. Bayes v. 3.0b4, especificando 4,000,000 de generaciones en 4 cadenas independientes. El árbol resultante arrojó 7 subclados que actuaron como base para análisis subsecuentes (Fig.10, Tabla 3).

Tabla3. Division de grupos.

|                  |  |
|------------------|--|
| Grupo1(mutans)   | <i>S. rattii</i> , <i>S. ursoris</i> , <i>S. devriesei</i> , <i>S. mutans</i> , <i>S. macacae</i> , <i>S. ferus</i> , <i>S. dentapri</i> , <i>S. downei</i> , <i>S. dentirousetti</i> , <i>S. sobrinus</i> , <i>S. dentirousetti</i> , <i>S. sobrinus</i> , <i>S. criceti</i> , <i>S. orisuis</i> , <i>S. merionis</i> , <i>S. caballi</i> , <i>S. henryi</i> , <i>S. orisratti</i> , <i>S. pluranimalium</i> , <i>S. thoralensis</i> , <i>S. hyovaginalis</i> |
| Grupo2(pyogenic) | <i>S. dysgalactiae</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>S. canis</i> , <i>S. castoreus</i> , <i>S. equi subsp. equi</i> , <i>S. halichoeri</i> , <i>S. phocae</i> , <i>S. porcinus</i> , <i>S. pseudoporcinus</i> , <i>S. didelphis</i> , <i>S. uberis</i> , <i>S. seminale</i> , <i>S. iniae</i> , <i>S. ictaluri</i> , <i>S. urinalis</i> , <i>S. parauberis</i> , <i>S. marimammalium</i> , <i>S. agalactiae</i>   |
| Grupo3(bovis)    | <i>S. equinus</i> , <i>S. lutetiensis</i> , <i>S. luteciae</i> , <i>S. infantarius</i> , <i>S. gallolyticus</i> <i>S. pasteurianus</i> , <i>S. macedonicus</i> , <i>S. alactolyticus</i>   |

|                    |   |
|--------------------|---|
| Grupo4(suis)       | <i>S. entericus</i> , <i>S. plurextorum</i> , <i>S. suis</i> , <i>S. acidominimus</i> , <i>S. minor</i> , <i>S. ovis</i> , <i>S. gallinaceus</i>  |
| Grupo5(gordonii)   | <i>S. constellatus</i> , <i>S. intermedius</i> , <i>S. anginosus</i> , <i>S. massiliensis</i> , <i>S. cristatus</i> , <i>S. sinensis</i> , <i>S. gordonii</i> , <i>S. sanguinis</i>                         |
| Grupo6(mitis)      | <i>S. pneumoniae</i> , <i>S. pseudopneumoniae</i> , <i>S. mitis</i> , <i>S. oligofermentans</i> , <i>S. infantis</i> , <i>S. peroris</i> , <i>S. oralis</i> , <i>S. australis</i> , <i>S. parasanguinis</i> |
| Grupo7(salivarius) | <i>S. vestibularis</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S. thermophilus</i>  |
| Outgroup           | <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Lactococcus cremoris</i>   |

Con el fin de resolver las relaciones filogenéticas entre grupos, se construyó una matriz con dos especies representantes de cada uno de esos grupos (Tabla 4). Esta matriz, denominada “mini-matrix” se utilizó para inferencia bayesiana utilizando los mismos estándares descritos anteriormente para la matriz completa. El modelo de sustitución utilizado aquí fue también el mismo que se utilizó para la matriz completa.

Tabla 4. Árbol resumen. Selección de un par de especies por cada grupo.

|                    |  |
|--------------------|--|
| Grupo1(mutans)     | <i>S. mutans</i> , <i>S. ratti</i>                                     |
| Grupo2(pyogenic)   | <i>S. dysgalactiae subsp. equisimilis</i> , <i>S. pyogenes</i>         |
| Grupo3(bovis)      | <i>S. infantarius</i> , <i>S. macedonicus</i>                          |
| Grupo4(suis)       | <i>S. acidominimus</i> , <i>S. suis</i>                                |
| Grupo5(gordonii)   | <i>S. gordonii str. challis. substr.ch</i> , <i>S. sanguinis</i>       |
| Grupo6(mitis)      | <i>S. mitis</i> , <i>S. pneumoniae</i>                                 |
| Grupo7(salivarius) | <i>S. thermophilus</i> , <i>S. vestibularis</i> , <i>S. salivarius</i> |
| Outgroup           | <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Lactococcus cremoris</i>                |

Por otro lado, las relaciones filogenéticas dentro de cada grupo fueron evaluadas en análisis separados intragrupal, usando *outgroups* ad-hoc que cumplieran con dos criterios; primero, pertenecer a un grupo hermano respecto al *ingroup*; además, contar con la mayor cantidad de datos disponible dentro de las especies de ese grupo.

Se realizó, además, un análisis bayesiano con *constraint* en subclados donde se tenía certeza sobre su posición filogenética.

La concordancia filogenética entre los diferentes fragmentos génicos fue evaluada mediante el test de homogeneidad (Farris *et al*, 1994; 1995) del programa Paup 4.0b10, con el fin de conocer los riesgos de utilizar un enfoque de súpermatriz, debido a las señales filogenéticas divergentes que frecuentemente reportan estudios con bacterias. (Table 5). Buscando evitar el efecto de la saturación de la señal filogenética, especialmente en sustituciones sinónimas, las secuencias aminoacídicas fueron utilizadas para los 6 genes que codifican proteínas (sodA, tuf, rpoB, dnaJ, gyrB, recN). Los genes que no codifican (16s r RNA y rnpB) fueron igualmente incluidos en el análisis como secuencias nucleotídicas. Ambas matrices de nucleótidos y aminoácidos fueron concatenadas en la misma súpermatriz usando el programa Concatenator 1.0 (no publicado). De igual modo que la matriz nucleotídica, el enfoque de súpermatriz se utilizó en este caso. Los modelos de evolución molecular de aminoácidos se evaluaron utilizando el programa PROTTEST v. 3.0. Posteriormente, se repitió el análisis de grupos, el resumido y con *constraint* con la matriz de nucleótidos concatenados con aminoácidos.

Se realizaron, a su vez, comparaciones de árboles-hipótesis filogenéticas, como los árboles resúmenes y sus distintas opciones con *au-test*, sin resultados favorables.

En base a los resultados del análisis de homogeneidad de paup se fueron quitando genes 'conflictivos', y agrupando quienes mostraban valores positivos. Para resolver grupos conflictivos se realizaron análisis con 2 especies de cada grupo junto al grupo 'conflictivo' completo.

Se realizó un análisis final con mrbayes, con *constraint* y con modelos nucleotídicos y proteicos.

### Hábitats.

Se realizó una exhaustiva búsqueda bibliográfica de cada bacteria de *Streptococcus* y su respectivo hábitat, de modo de realizar un mapeo de hábitats de cada especie para agrupar por nicho ecológico (Tabla10). Posteriormente, se transcribió dicha información en el árbol filogenético final. Para la edición de árboles filogenéticos se utilizó el visor Treeview y el programa Illustrator.

### Hipótesis dietaria y relación bacteria-hábitat.

Luego del diseño filogenético, se procedió a la selección de la bacteria candidata para el partidador especie-específico (en base a la topología de los árboles) y del gen utilizado para confeccionar el mismo. Para esto último, se realizó una comparación de variabilidad de genes con MEGA 5 (para la identificación especie-específica). Además, se realizó un análisis con PAUP *apolist* en los genes más grandes (*rpoB*=3105 pb), para conocer la región más variable del gen.

Para el diseño de partidores se escogió, dentro de los 8 genes utilizados para el estudio filogenético, al gen *recN*. Este gen presenta una gran variabilidad (315/419 proteína, 937/1258 nucleótido) propicia tanto para identificar especies, como para el diseño de partidores específicos de una bacteria que tan sólo había sido identificada una vez, y no en la cavidad oral. Las secuencias de los *primers* corresponden a F (5'-CGACTTGGACGCGATTAGCG-3'), Tm 56,27; R (5'-TACCTGCTCATTGCCCTCGCGGTT-3') Tm 62,53. De este modo, se creó el *primer* para el gen *recN*, con Primer Blast y primer3 input para *S. massiliensis*. Además, *primers* universales (16sr RNA) para el género *Streptococcus* y para sub-clados (*intermedius-constellatus*, *vestibularis-salivarius*) con primer 3 input y primer blast, además de búsqueda visual de región conservada.

### Muestras de saliva.

Se tomaron muestras de saliva de individuos de localidades rurales cercanas a Temuco y del regimiento de la misma ciudad (Proyecto Vicerrectoría de

Investigación y Desarrollo, Universidad de Chile<sup>4</sup>) y, además, con distintos hábitos alimentarios (Proyecto Fondecyt N° 1110461<sup>5</sup>) en este caso, omnívoros (n=17), vegetarianos (n=11) y veganos (n=1).

Para la extracción de las muestras de saliva se hicieron 2 o 3 copias de cada muestra, separándolas en tubos de 1ml. Se siguió el protocolo Quinque y colaboradores (2006) para extracción de DNA en saliva. Luego, fueron incubadas en agua y con parafilm (para evitar que se evapore la solución) girando toda la noche (con ayuda de un “pez”) a 52,2°C; la T° fue medida con un termómetro electrónico y medida nuevamente 10 minutos más tarde para determinar que ésta fuese constante. Posteriormente, se agregó 200ul de NaCl 6M (molar), en vez de 5M como estipula el protocolo, esto debido a que son equivalentes ya que al alcanzar 5M se alcanza el punto de saturación de la solución.

Terminada la extracción, los tubos fueron dejados 3 horas a 50°C en baño termoregulado.

### PCR

Para comprobar la correcta extracción de DNA en saliva se hizo un PCR con 1 Maxter Mix común para todos los tubos con los *primers* correspondientes a la región regulatoria relacionados con la persistencia de la lactasa (C/T (F) y C/T (R)).

---

<sup>4</sup>*Genetic variation of Streptococcus mutans loci in two Chilean populations*

<sup>5</sup>“Evolución de la paleodieta en poblaciones del norte de Chile: evidencias bioantropológicas y microbioma oral”

Tabla 5, Protocolo PCR Laboratorio Genética FACSO Universidad de Chile (Protocolo Go\_Taq).

|                   |        |
|-------------------|--------|
| Mix               | 1x     |
| H2O <sub>dd</sub> | 11,3ul |
| Buffer 5x         | 5ul    |
| MgCl <sub>2</sub> | 2,5ul  |
| dNTPs             | 2ul    |
| Part F            | 1ul    |
| Part R            | 1ul    |
| Taq               | 0,2ul  |
| TOTAL             | 23ul   |
| Master Mix        |        |
| DNA               | 2ul    |
| TOTAL             | 25ul   |

Con el fin de determinar las temperaturas más apropiadas para la amplificación, se generó un programa de gradiente en un termociclador *Apollo ATC401 thermal cycler*, denominado CONI\_MASS desde 55°C a 65°C (12 gradientes o columnas), y 35 ciclos, con una copia extra y un control negativo por columna (Tablas 6 y 7). Previamente, se utilizaron muestras al azar para comprobar la presencia de dicha bacteria en algún individuo, seleccionándose de este modo una muestra (ANEXO) para determinar la temperatura óptima para el partidor. En todas las temperaturas se obtuvo una amplificación nítida. Para los posteriores análisis se escogió la mayor temperatura, es decir, de 64,7°C.

Los resultados de la amplificación fueron analizados con un test estadístico de Fisher, para comprobar si el hábito alimentario del individuo muestreado explica la presencia de la bacteria.

Posteriormente, las reacciones para la secuenciación realizadas por MacroGen fueron desarrolladas en un Termociclador MJ *Research PTC-225 Peltier*,



utilizando un *ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kits* con *AmpliTaq®* DNA polimerasa (enzima FS), siguiendo los protocolos de manufactura.

Los resultados de la secuenciación fueron analizados en BLAST, comparando mediante un alineamiento la secuencia obtenida y las de GENBANK, bajo condiciones estándar.

Tabla6. Especificaciones del Programa de gradiente utilizado

| Programa Gradiente<br><i>Streptococcus massiliensis</i> 55°C a 65°C (CONI_MASS) |      |                  |        |
|---|------|------------------|--------|
| Ciclo   | Paso | Temperatura      | Tiempo |
| 1   | 1    | 94.0°C           | 5:00   |
| 35  | 1    | 94.0°C           | 0:30   |
|   | 2    | <b>55°C-65°C</b> | 0:30   |
|   | 3    | 72.0°C           | 0:30   |
| 1   | 1    | 72.0°C           | 5:00   |
|   | 2    | 4°C              | HOLD   |

Tabla7. Gradiente de temperaturas utilizadas en el PCR.

| Columna | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11    | 12    |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| T°      | 55,3° | 55,7° | 56,4° | 57,4° | 58,6° | 59,5° | 60,5° | 61,4° | 62,6° | 63,6° | 64,3° | 64,7° |
|         | C     | C     | C     | C     | C     | C     | C     | C     | C     | C     | C     | C     |

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Análisis filogenético.

Siete grandes clados fueron detectados en los análisis filogenéticos realizados, los que en un principio hemos denominado del 1 al 7. Estos grupos son bastante similares a propuestas previas. Por ejemplo, el linaje formado por los clados 5 y 6 se asemeja al grupo mitis. El grupo 5 contiene al grupo anginosus. El grupo 2 tiene bastantes similitudes con el grupo pyogenes. El grupo 3 es equivalente a bovis, y el grupo 1 vendría a entenderse como el grupo mutans. El grupo salivarius es el que denominamos grupo 7 (Figura10). Análisis separados de los fragmentos protéicos de los genes arrojaron resultados relativamente similares (véase Anexo, Figuras A1, A2, A3, A4, A5, A6), a excepción del gen *tuf*. En general, las filogenias inferidas de secuencias nucleotídicas o de aminoácidos no difirieron en las relaciones entre los grandes clados, ni en relación a la confianza estadística (probabilidad *a posteriori*).

Al observar las relaciones filogenéticas dentro de los grupos, es notable el caso del grupo mitis (Kawamura et al, 1995) que se presenta como un grupo monofilético pero que de acuerdo a los resultados de este estudio y los obtenidos por Boggs *et al* (2012), se subdivide en 2 clados y el grupo suis es basal a ambos (Figuras 11, 12, 13, 14). Aquí se propone una revisión taxonómica, pues nuestros resultados indican que la divergencia entre los dos grandes clados subdividiendo al grupo mitis está en el rango de divergencia entre grupos (within-mean group distance: *gordonii*=0,039, *mitis*= 0,044; between group mean distance: 0,073 – realizado con el programa MEGA). Por lo que un nuevo grupo se propone, el grupo “*gordonii*”, que incluye a *S. constellatus*, *S. intermedius*, *S. anginosus* (grupo anginosus), junto a *S. massiliensis*, *S. cristatus*, *S. sinensis*, *S. gordonii* y *S. sanguinis*. El grupo mitis debe ser mantenido, agrupando a *S. australis*, *S. parasanguinis*, *S. oralis*, *S. peroris*, *S. infantis*, *S. oligofermentans*, *S. mitis*, *S. pseudopneumoniae* y *S. pneumoniae*.

A través de los distintos análisis ha quedado claro que la mayoría de los grupos considerados tienen una topología constante de árboles. Al cambiar los

parámetros, como genes considerados, el uso de matrices aminoacídicas o nucleotídicas, o forzando clados, la mayoría de los grupos no cambian su composición, por ejemplo, los grupos pyogenes, mitis, gordonii, suis, salivarius y bovis. No obstante, podemos igualmente observar algunos problemas. Por ejemplo, los miembros del grupo 1 (Fig.13) suelen subdividirse, por lo que probablemente dicho grupo no es monofilético.

Filogenias relativamente bien sustentadas fueron obtenidas de cada minimatriz. De este modo, las hipótesis filogenéticas para cada grupo son resumidas en la Figura 12. No obstante, ciertas incertezas de relaciones intragrupalas no pudieron ser totalmente resueltas, como es el caso del grupo mutans (véase Anexo, Figuras A1, A2, A3, A4, A5, A6; Fig. 13), convirtiendo a este grupo, según nuestro enfoque, al más complejo del género.

Por otro lado, los resultados del test de homogeneidad revelan incompatibilidades entre algunos fragmentos génicos, los que pueden deberse a la transferencia horizontal de genes. Las incompatibilidades más críticas, detectadas en análisis de parejas, nos permitieron identificar a las discordancias genéticas más grandes entre los diferentes *loci*. (Tabla 8). Por consiguiente, consideramos estos resultados para subsecuentes análisis, evitando de este modo estas incompatibilidades y generando diferentes estrategias con el objetivo de resolver cada esquema (micro, a nivel grupal, o macro, el ordenamiento general) dentro del género.

Por ejemplo, al poner énfasis en el grupo mutans, y a la luz de los resultados del test de homogeneidad, tan sólo cuatro genes pueden arrojar resultados favorables para resolver este grupo, porque tan sólo estos cuatro genes (*sodA*, *tuf*, *rpoB* y *gyrB*) comparten altos índices juntos (Tabla 8). Como se mencionó anteriormente, este grupo es particularmente complejo.

De este modo, los análisis siguientes consideraron a la matriz completa de las secuencias concatenadas de los genes *sodA*, *rpoB* y *gyrB*. Esto, pues según los análisis de homogeneidad, estos genes conjuntamente pueden ayudar a resolver tanto la matriz resumida como al grupo mutans, por lo que nos puede

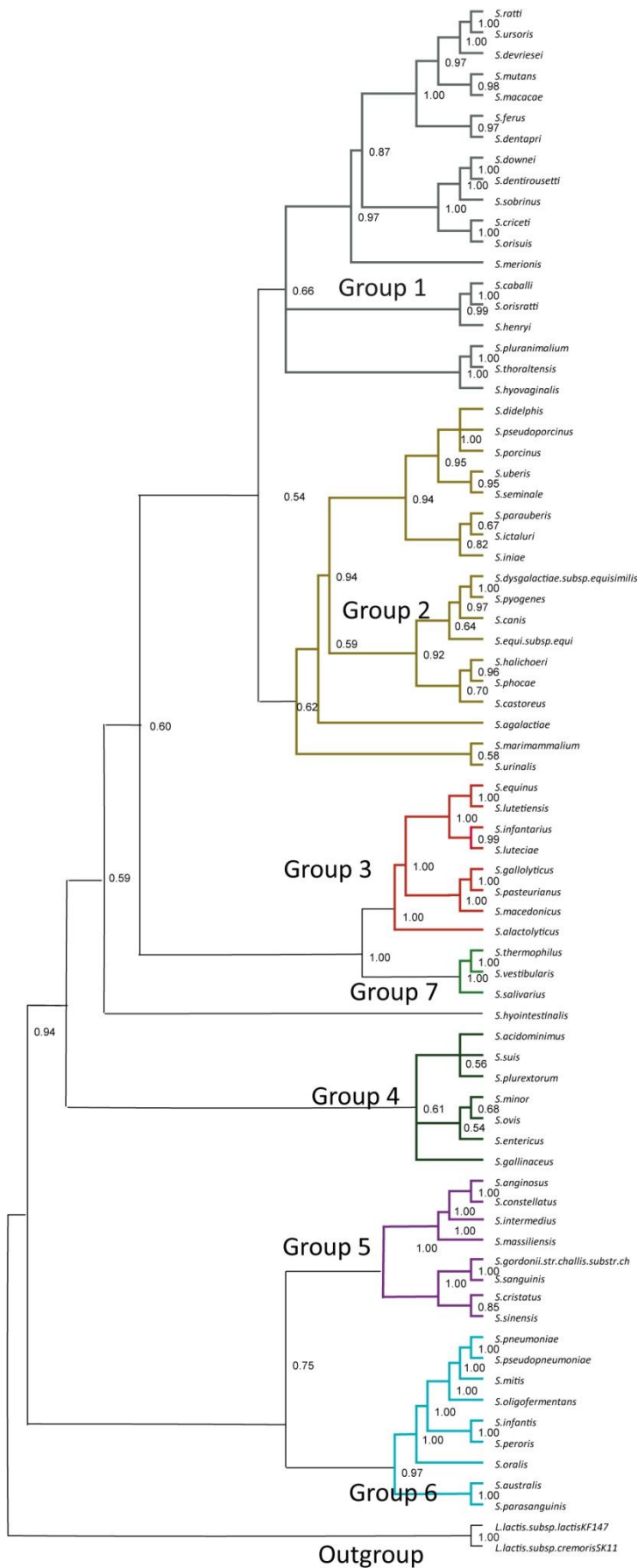
brindar una visión general de la distribución de dicho grupo a lo largo de la filogenia.

La figura 14 muestra que los grupos *gordonii*, *mitis* y *suis* son basales al resto de los grupos. Por otro lado, *salivarius* y *bovis* son grupos más derivados. El grupo piogénico también es más derivado. Todos los grupos, a excepción de *mutans*, son monofiléticos. Sólo unas pocas especies no aparecen según nuestro esquema *a priori*). *S. ferus* aparece como basal a todo el género; *S. entericus* y *S. plurextorum* (grupo *suis*), *S. marimammalium* y *S. agalactiae* (grupo piogénico) aparecen fuera de lo que habíamos estimado previamente. No obstante, en general, todas las especies agrupan con sus clados correspondientes.

Entonces, nos enfocamos en resolver la parte inconclusa del árbol previo, es decir, las particiones del grupo *mutans* y su relación con los grupos *salivarius*, *bovis* y piogénico, usando los mismos genes y parámetros. El resultado de este análisis reforzó la idea de que el grupo de *S. mutans* no es monofilético. En cambio, está constituido por, al menos, tres diferentes minigrupos: *mutans*, *sobrinus* y *pluranimalium*. Dicho análisis bayesiano (Fig.15) casi resolvió las relaciones entre estas especies, pero algunos puntos en la topología permanecen sin resolver. Es el caso de la posición de *S. macaccae*, cercano al grupo piogénico o al grupo *mutans*; y, a su vez la relación entre los dos grupos *pluranimalium* y *sobrinus*, si es que son clados hermanos o uno de estos divergió con anterioridad.

El test de homogeneidad nos permitió seleccionar los genes que podrían ayudarnos a dilucidar estos puntos conflictivos. Sendos análisis bayesianos considerando las parejas de genes *tuf-recN* y *rpoB-recN* [0,94 y 0,95 de valor de *p* respectivamente entre el grupo piogénico y *mutans*] sitúan a *S. macaccae* dentro del grupo *mutans*, junto a *S. ferus*, *S. mutans*, *S. devriesei* y *S. rattii* (Fig 16), resolviendo de este modo el primer punto de la anterior filogenia. Por otro lado, tres análisis bayesianos tomando en cuenta las parejas de genes *sodA-rpoB*, *16sr RNA-rnpB* y *sodA-recN* [0,98 de valor de *P* en cada uno de los análisis de parejas de genes realizados para los grupos *sobrinus* y

pluranimalium] posicionan a estos dos grupos como clados hermanos (Fig 17). No obstante, *S. caballii* y *S. orisratti* permanecen sin resolver su posición filogenética, esto pues existen pocas secuencias que puedan ayudarnos a resolver su posición (tan sólo de los genes *sodA* y 16sr RNA, y éstas no son compatibles), por lo que su posición en relación a otros grupos no quedaría resuelta. Lo mismo pasa para las especies que tan solo se cuenta con las secuencias del gen 16sr RNA, en su mayoría miembros del grupo 1 originalmente propuesto. No obstante aquello, la gran mayoría de la filogenia está relativamente resuelta.



**FIG 10.**

Análisis filogenético ejecutado con Mr. Bayes v. 3.0b4.

*Clustering* inicial.

Se consideraron 73 especies y subespecies, con 2 *outgroups*; se utilizaron las secuencias nucleotídicas de 5 genes, a saber: *sodA*, *tuf*, *rpoB*, 16Sr RNA, *rnpB*. Los resultados muestran algunos grupos concordantes con los de Kawamura *et al.* (1995). Por ejemplo, los grupos 5 y 6 son los miembros del grupo *mitis*. El grupo 4 tiene cierta similitud con el grupo pyogénico. El aquí nombrado grupo 3 es similar al grupo *bovis*, y el grupo 1 es concordante con *mutans*. El grupo *salivarius* corresponde al mismo grupo 7 aquí descrito.

Tabla 8. Análisis de Homogeneidad con PAUP. Se realizó un análisis para evaluar la homogeneidad entre parejas de genes, y separado por grupos.

|              | GRUPO 1 | GRUPO 2 | GRUPO 3 | GRUPO 4 | GRUPO 5 | GRUPO 6 | RESUMEN |
|--------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
|              | aá      | aá      | aá      | aá      | aá      | aá      | aá      |
| Todos        | 0,01    | 0,01    | 0,27    | 0,88    | 0,01    | 0,01    | 0,01    |
| sodA x tuf   | 0,26    | 0,12    | 0,56    | 0,99    | 0,14    | 0,01    | 0,04    |
| sodA x rpoB  | 0,8     | 0,42    | 0,94    | 0,96    | 0,71    | 0,01    | 0,23    |
| sodA x 16sr  | 0,02    | 0,01    | 0,3     | 0,53    | 0,17    | 0,01    | 0,03    |
| sodA x rnpB  | 0,01    | 0,58    | 0,05    | 0,97    | 0,42    | 0,01    | 0,16    |
| sodA x dnaJ  | 0,01    | 0,61    | 0,93    | 0,99    | 0,68    | 0,39    | 0,01    |
| sodA x gyrB  | 0,27    | 0,04    | 0,88    | 0,38    | 0,62    | 0,03    | 0,93    |
| sodA x recN* | 0,01    | 0,43    | 1       | 0,06    | 0,31    | 0,01    | 0,31    |
| tuf x rpoB   | 0,41    | 0,37    | 1       | 1       | 0,51    | 0,01    | 0,02    |
| tuf x 16sr   | 0,28    | 0,45    | 0,38    | 0,98    | 0,07    | 0,02    | 0,04    |
| tuf x rnpB   | 0,01    | 0,99    | 0,56    | 1       | 0,72    | 0,01    | 0,01    |
| tuf x dnaJ   | 0,01    | 0,83    | 1       | 1       | 0,77    | 0,5     | 0,01    |
| tuf x gyrB   | 0,87    | 0,4     | 0,98    | 1       | 0,03    | 0,05    | 0,5     |
| tuf x recN*  | 0,01    | 0,83    | 0,89    | 0,97    | 0,26    | 0,01    | 0,23    |
| rpoB x 16sr  | 0,41    | 0,08    | 0,74    | 0,66    | 0,51    | 0,07    | 0,01    |
| rpoB x rnpB  | 0,17    | 0,91    | 1       | 1       | 0,35    | 0,31    | 0,01    |
| rpoB x dnaJ  | 0,03    | 0,78    | 1       | 1       | 0,21    | 0,28    | 0,03    |
| rpoB x gyrB  | 0,99    | 0,6     | 1       | 0,72    | 0,49    | 0,65    | 0,47    |
| rpoB x recN* | 0,22    | 0,9     | 0,06    | 0,12    | 0,19    | 0,79    | 0,07    |
| 16sr x rnpB  | 0,05    | 0,16    | 0,49    | 0,98    | 0,01    | 0,05    | 0,09    |
| 16sr x dnaJ  | 0,1     | 0,29    | 0,92    | 1       | 0,69    | 0,14    | 0,01    |
| 16sr x gyrB  | 0,04    | 0,01    | 0,76    | 0,85    | 0,54    | 0,24    | 0,59    |
| 16sr x recN* | 0,01    | 0,01    | 0,88    | 0,41    | 0,68    | 0,01    | 0,33    |
| rnpB x dnaJ  | 0,29    | 1       | 1       | 1       | 0,01    | 0,94    | 0,01    |
| rnpB x gyrB  | 0,02    | 0,42    | 0,87    | 1       | 0,35    | 0,39    | 0,07    |
| rnpB x recN* | 0,01    | 0,85    | 0,03    | 0,95    | 0,06    | 1       | 0,01    |
| dnaJ x gyrB  | 0,01    | 0,67    | 1       | 1       | 0,09    | 0,31    | 0,02    |
| dnaJ x recN* | 0,01    | 0,8     | 1       | 0,99    | 0,01    | 0,56    | 0,01    |
| gyrB x recN* | 0,01    | 0,77    | 0,98    | 1       | 0,25    | 0,59    | 0,87    |

TABLA 9. Resultados de test de homogeneidad. Se muestran los valores de P para todas las combinaciones de parejas de fragmentos de genes y proteínas de cada uno de los dos minigrupos derivados del grupo mutans.

|           | 1    | 2    |  |
|-----------|------|------|--|
| sodaXtuf  | 0,56 | 0,14 | 1= pluranimalium+thoraltensis+hyovaginalis+henryi (+) criceti+sobrinus+downei<br>2=devriesei+ratti+mutans+ferus (+) macacae (+) canis, pyogenes, dysgalactiae, didelphis, porcinus, uberis |
| sodaXrpoB | 0,98 | 0,87 |  |
| sodaX16s  | 0,72 | 0,01 |  |
| sodaXrnpb | 0,94 | 0,01 |  |
| sodaXdnaj | 0,97 | 0,13 |  |
| sodaXgyrb | 0,54 | 0,31 |  |
| sodaXrecn | 0,98 | 0,56 |  |
| tufXrpob  | 0,92 | 0,68 |  |
| tufX16s   | 0,75 | 0,63 |  |
| tufXrnpb  | 1    | 0,14 |  |
| tufXdnaj  | 1    | 0,55 |  |
| tufXgyrb  | 0,9  | 0,33 |  |
| tufXrecn  | 1    | 0,95 |  |
| rpobX16s  | 0,95 | 0,02 |  |
| rpobXrnpb | 1    | 0,04 |  |
| rpobXdnaj | 1    | 0,57 |  |
| rpobXgyrb | 1    | 0,56 |  |
| rpobXrecn | 0,85 | 0,94 |  |
| 16sXrnpb  | 0,98 | 0,08 |  |
| 16sXdnaj  | 0,96 | 0,06 |  |
| 16sXgyrb  | 0,54 | 0,01 |  |
| 16sXrecn  | 0,92 | 0,01 |  |
| rnpbXdnaj | 1    | 0,08 |  |
| rnpbXgyrb | 0,87 | 0,01 |  |
| rnpbXrecn | 1    | 0,57 |  |
| dnajXgyrb | 1    | 0,06 |  |
| dnajXrecn | 1    | 0,78 |  |
| gyrbXrecn | 0,94 | 0,79 |  |



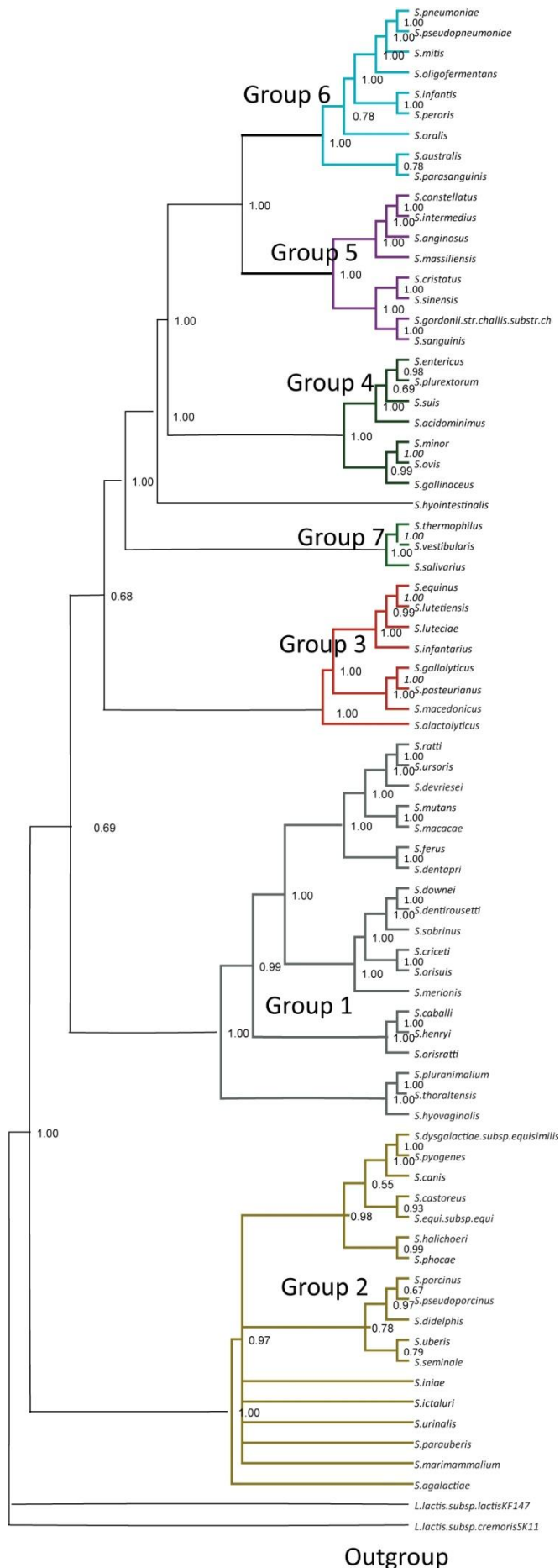


FIG 11.

Análisis Filogenético con *Constraint*.

Con el fin de resolver relaciones interespecíficas a nivel intragrupal (*clusters*) se realizó un análisis filogenético con restricción de los mismos grupos. El análisis se llevó a cabo a partir de las mismas secuencias nucleotídicas de los genes ya nombrados (*sodA*, *tuf*, *rpoB*, *16s r RNA* y *rnpB*). Se pueden deducir los ‘problemas’, a saber, los miembros del grupo 2 presentan un colapso en sus ramas y el grupo 1 parece tener 4 claras subdivisiones. Probablemente no es un grupo compacto.

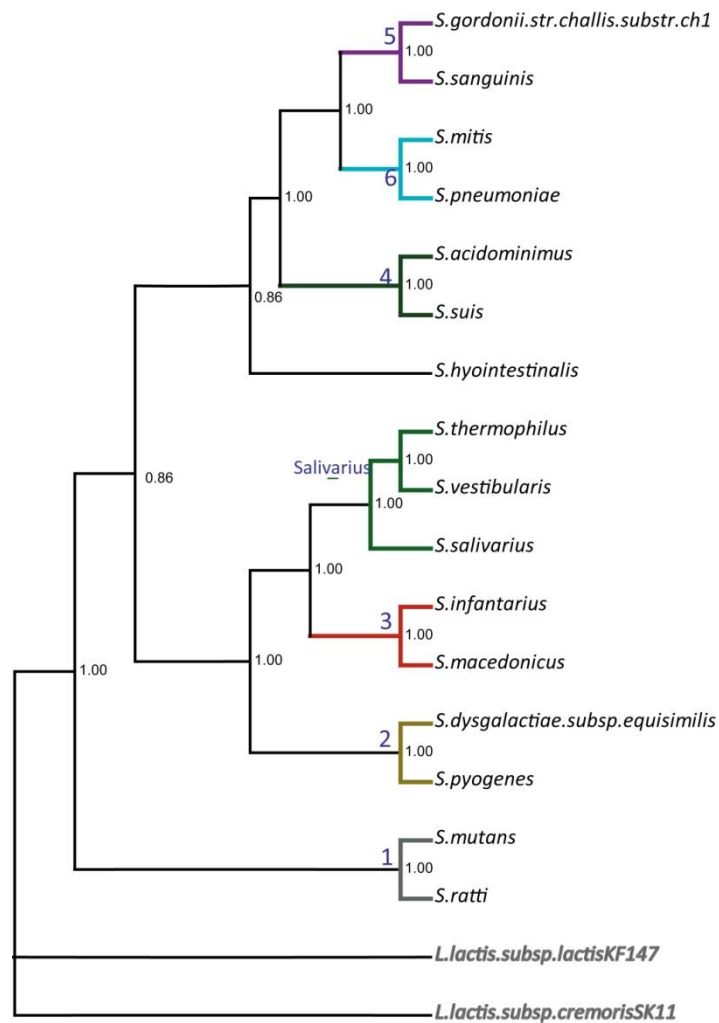


FIG. 12. Árbol resumido.

Análisis filogenético de las secuencias proteicas (sodA, tuf, rpoB, dnaJ, gyrB, recN) y nucleotídicas (16sr RNA, rnpB) de 2 representantes de cada grupo, más el grupo salivarius y los 2 *outgroups* (un total de 17 especies). Se puede apreciar la distribución general de los grupos.

Fig.13. Árbol de consenso obtenido de un análisis filogenético bayesiano de toda la matriz concatenada, tanto del fragmento proteico (sodA, tuf, rpoB, dnaJ, gyrB) como nucleotídico (16s rRNA, rnpB).

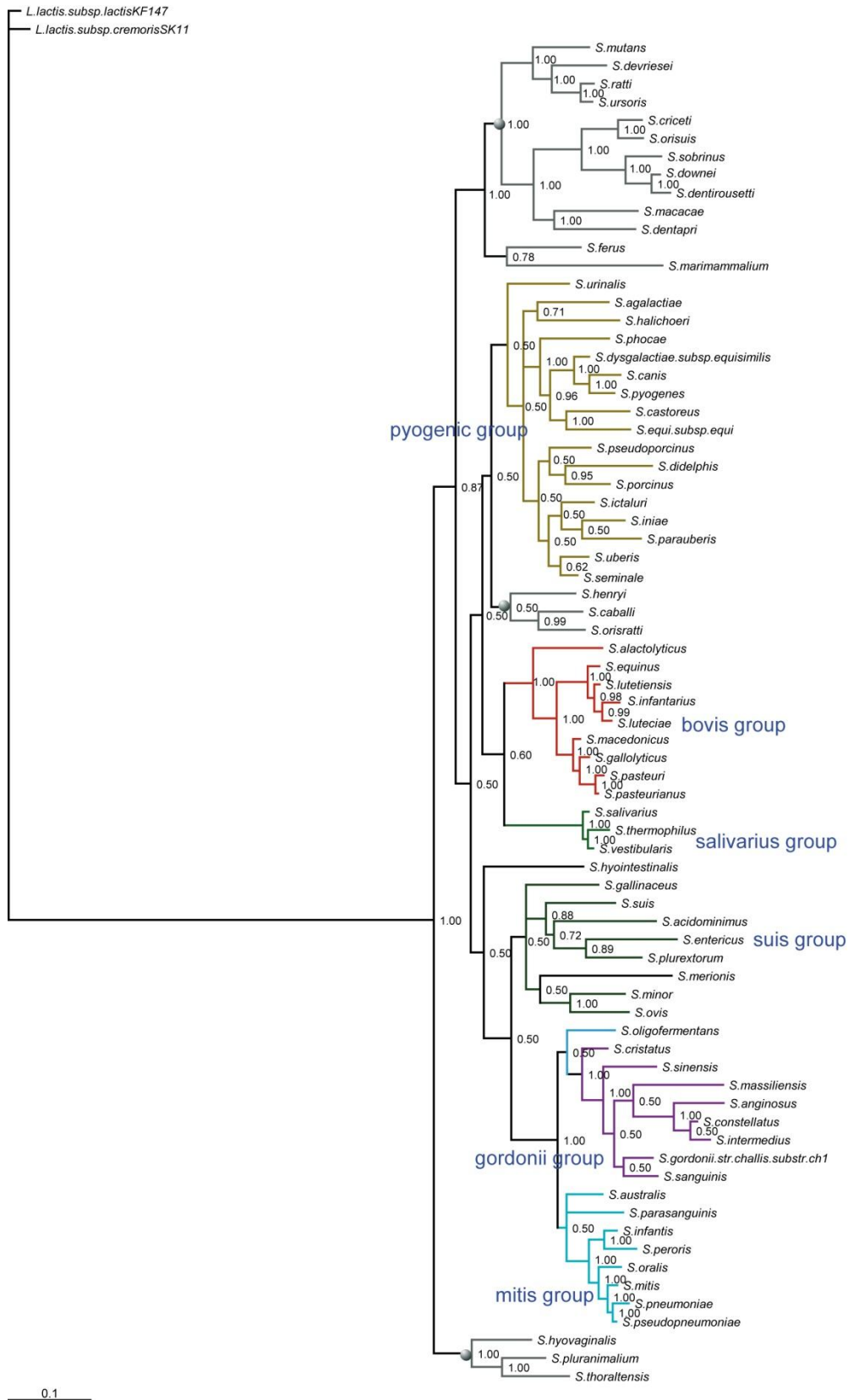


Fig. 14. Árbol de consenso obtenido de un análisis filogenético bayesiano, utilizando todas las especies bacterianas disponibles para tres fragmentos proteicos (sodA, rpoB, gyrB), y construyendo el interior de los grupos ya conocidos.

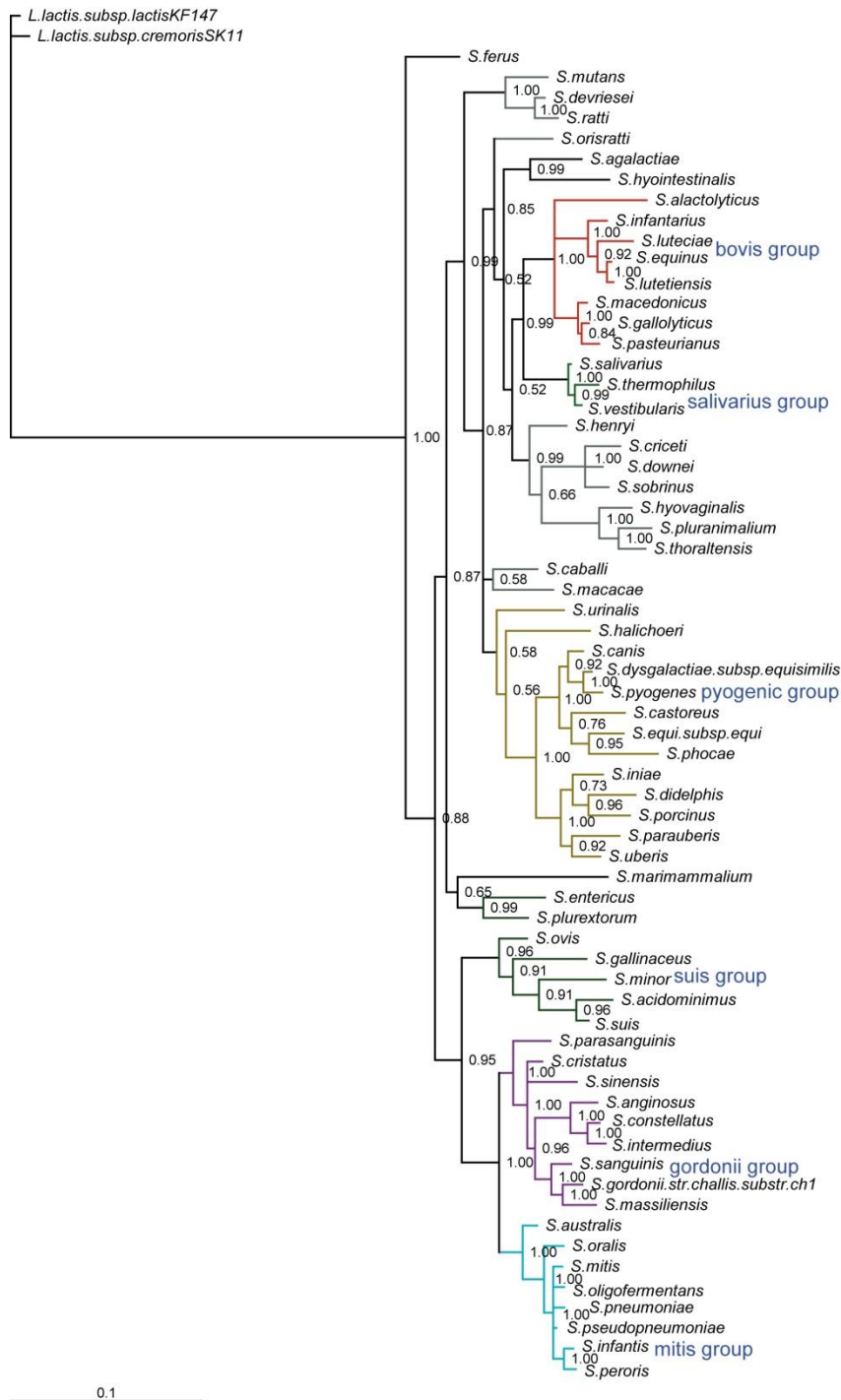
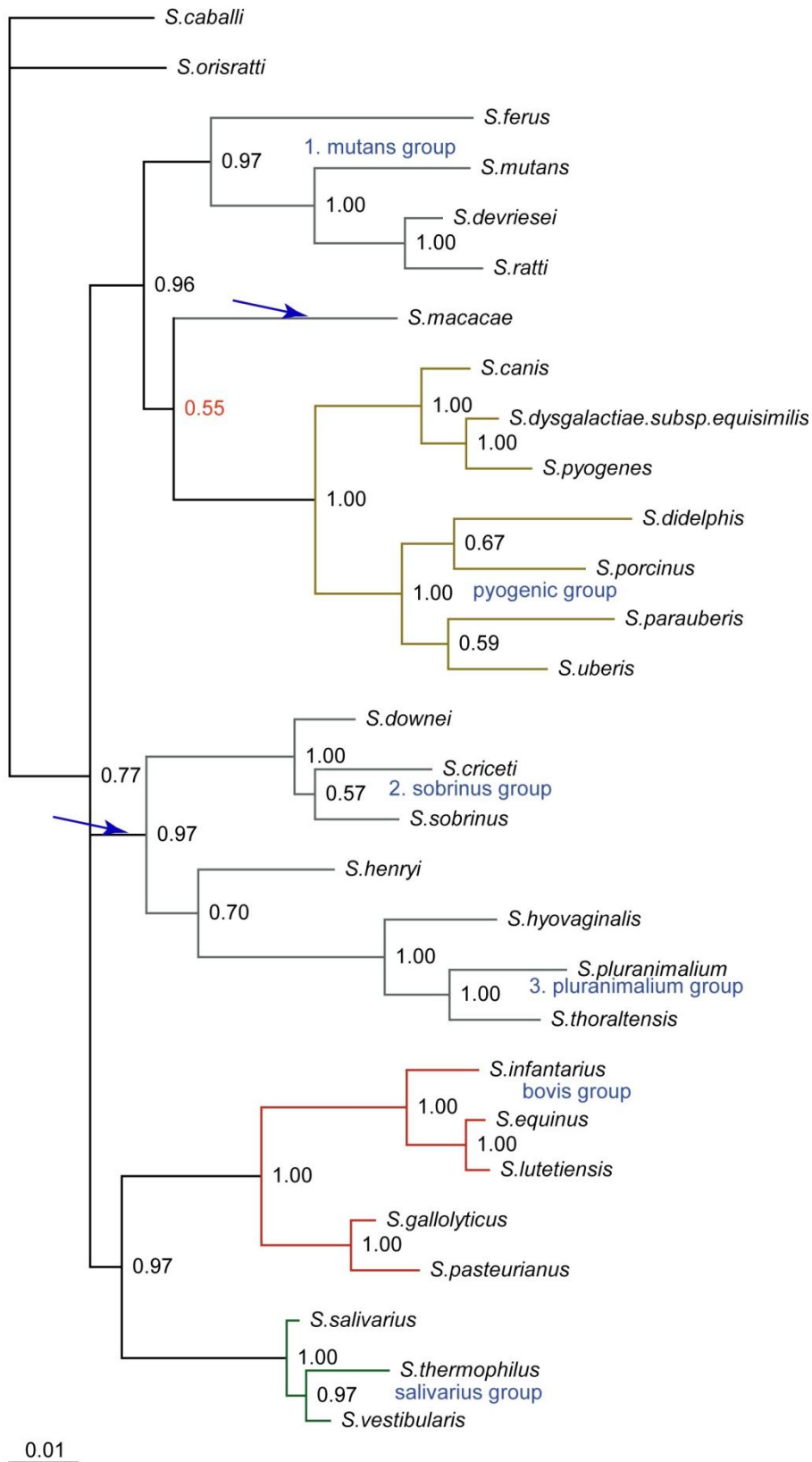


Fig. 15. Árbol de consenso obtenido a partir de un análisis filogenético bayesiano de la parte no resuelta del árbol anterior, utilizando tres fragmentos proteicos (sodA, rpoB, gyrB). Las flechas indican los puntos no resueltos de la topología.



0.01

Fig.16. Árbol de consenso obtenido a partir de un análisis filogenético bayesiano de los puntos sin resolver del diagrama anterior, utilizando dos fragmentos proteicos (rpoB, recN). La posición de *S. macacae* está resaltada.

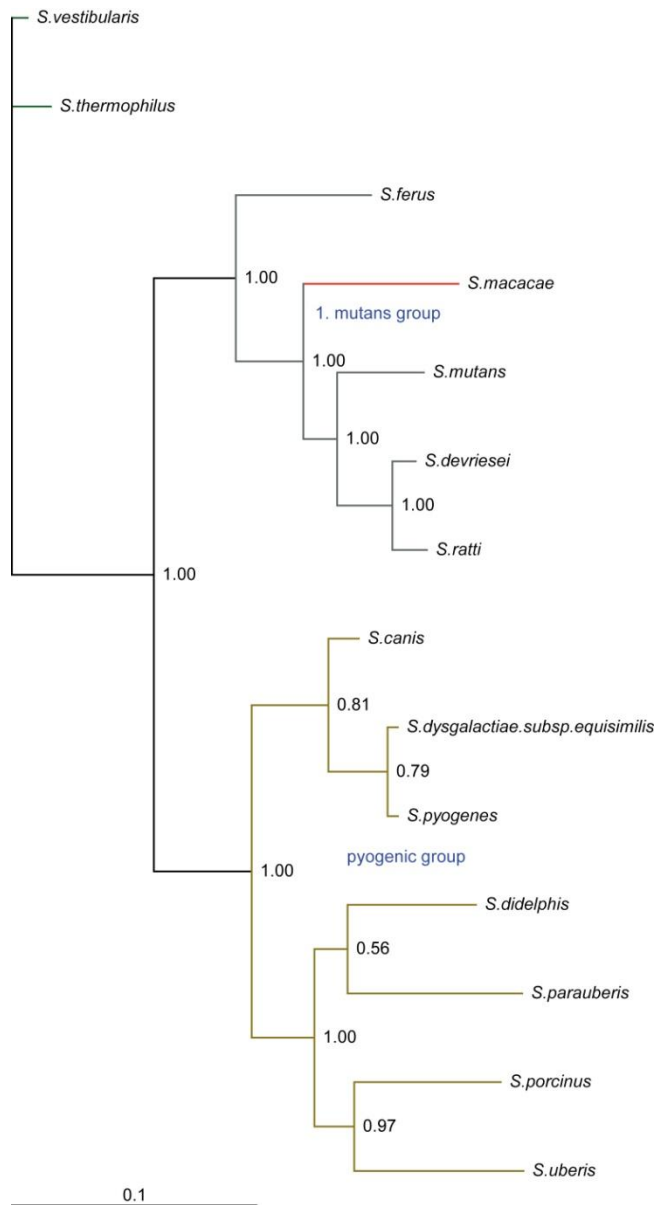
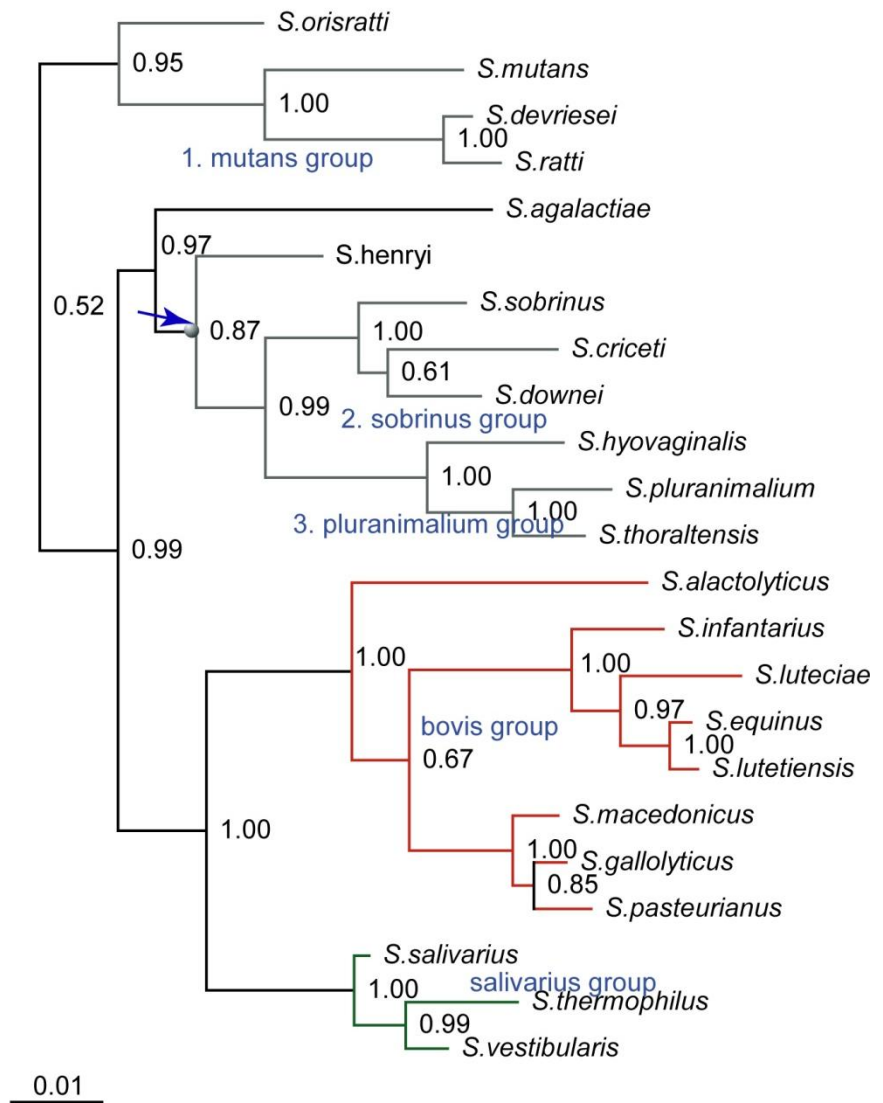


Fig.17. Árbol de consenso obtenido a partir de un análisis filogenético bayesiano de la parte sin resolver de un árbol anterior, utilizando dos fragmentos proteicos(sodA, recN). Las flechas indican los puntos resueltos.



### Hábitats.

Al analizar el mapeo filogenético se puede ver una ligera relación filogenia-hábitat (Fig. 18 a,18b). Al observar el grupo gordonii, todos sus miembros tienen presencia en la boca de pacientes humanos, a excepción de *S. massiliensis*, quién no tiene descrita su procedencia. Esta observación sirve de guía para un análisis que posteriormente se revisará. De igual forma, podemos ver el grupo mitis, donde hay una gran cantidad de especies que habitan la flora oral humana (*S. mitis*, *S. oligofermentans*, *S. infantis*, *S. peroris*, *S. oralis*, *S. australis*, *S. parasanguinis*), además del tracto respiratorio superior (*S. pneumoniae*, *S. pseudopneumoniae*). Lo mismo pasa para parte del grupo salivarius (*S. vestibularis*, *S. salivarius*). A su vez, una gran cantidad de 'miembros' de los grupos gordonii y mitis, además de su presencia en la cavidad oral, han estado relacionados con episodios de endocarditis en humanos.

Los miembros del grupo 4 guardan relación con animales domésticos, junto a algunos casos de zoonosis. El grupo piogénico también tiene estas características, pero cuyos miembros provienen de una cantidad de hábitats mucho más diversa, incluyendo animales marinos. También se observa infecciones a humanos.

Los miembros de los grupos mutans y sobrinus (otrora grupo 1, grupo mutans) tienen en común su procedencia del microbioma oral de varios animales, en general mamíferos, abarcando desde monos, ratones, caballos, murciélagos, osos, cerdos e incluso jabalíes. Los miembros del grupo pluranimalium, además de *S. caballus*, *S. henryi* y *S. orisratti* (otrora grupo 1, mutans) a su vez, también están relacionados con animales domésticos (caballos, ratas), e infecciones en estos. No existen casos de zoonosis documentada.

Finalmente, el grupo bovis también tiene relación con animales domésticos como camellos, caballos, ganso, cerdos, pollos, perros, pero también con alimentos como arvejas e incluso queso. La gran mayoría de estas especies, a su vez, ha documentado episodios de endocarditis en humanos.



Como se puede ver, en general, existe una ligera relación de especies-hábitat. Sin embargo, puede haber ciertas excepciones. Por ejemplo, Pombert *et al.* (2009) (y el presente estudio) demuestran que especies habitando el mismo nicho ecológico (*S. salivarius* y *S. vestibularis*) no necesariamente son más cercanas en la filogenia. Aquí, *S. salivarius* es más basal, y *S. thermophilus* junto a *S. vestibularis* son especies hermanas (Fig. 18). No obstante esta excepción, que puede ser explicada como una autapomorfía (así como algunos casos de la Fig. 18), en los clados más numerosos los agrupamientos sí guardan cercanía filogenia-nicho.

Entonces, en general en la filogenia se agrupan especies que comparten el nicho donde habitan. Dicho asunto podría estudiarse más detalladamente utilizando el método comparativo filogenético, como lo señalan Rezende y Garland (2003), al ser estos rasgos caracteres ecológicos, y de este modo evaluar de mejor manera, inicialmente para este género, la evolución de los caracteres ecológicos. En definitiva, esto además de interesantes implicancias evolutivas aplicables incluso más allá del estudio de las bacterias, nos habilita para aventurar un esquema predictivo, lo que se intentará probar con el diseño de primers y PCR que más adelante se detalla.

Teniendo en cuenta que hay muchos vacíos en cuanto a la información que se tiene de cada especie, además de las especies no secuenciadas que faltarían para complementar la filogenia, este árbol de hábitats se debe tomar con precaución. El fin es únicamente ilustrativo, para comprobar y analizar si es que el agrupamiento como resultado de los distintos análisis de las secuencias génicas se condice con un agrupamiento que dé cuenta del nicho ecológico de cada especie. Esto, más allá de dar luces sobre la evolución de los organismos unicelulares y, en general, la microbiología, es un esfuerzo por descifrar, a nivel más amplio, la aplicabilidad del uso de herramientas derivadas de la genética para entender cuestiones relativas al ambiente. En este caso en particular, la motivación fue comprender la dieta de poblaciones antiguas. De este modo, éste método permitiría 'rastrear' especies bacterianas específicas de la cavidad oral y testear la presencia-ausencia de grupos bacterianos que guarden relación con ciertas costumbres alimentarias.

Tabla10. Referencia con el origen de cada estreptococo encontrado.

| ESPECIE  | HÁBITAT (CITAS EN NEGRITA)   |
|--|--|
| <i>S. agalactiae</i>                                     | Endocarditis humano. Aparato digestivo, urinario y genital (vagina) adultos/meningitis humanos, mastitis bovinos, peces, delfines, cocodrilos ( <b>Roca, B. &amp; Ardasmal, L. H.,2000</b> ); <b>Marri et al., 2006; Brimil, 2006</b> )  |
| <i>S. acidominimus</i>                                   | Descrito en Bovinos, raro en humanos –descrito en infecciones y en cav. Oral. Endocarditis ( <b>Dalal &amp; Urban, 2008</b> )  |
| <i>S. anginosus</i>                                      | Flora bacteriana, descrito en saliva humana, gastrointestinal, urogenital, endocarditis ( <b>Morita et al, 2005</b> )  |
| <i>S. alactolyticus</i>                                  | Perro (yeyuno), pollos y cerdos ( <b>Rinkinen et al., 2004</b> )   |
| <i>S. australis</i>                                      | oral human, meningitis ( <b>Willcox et al., 2001;Héry-Arnaud et al., 2011</b> )  |
| <i>S. caballi</i>  | Horses ( <b>Milínovich et al., 2008</b> )  |
| <i>S. canis</i>  | perros, septicemia en humano (2), bacteremia ( <b>Bik et al., 2010; Devriese et al., 1986; Whatmore et al., 2001</b> )   |
| <i>S. castoreus</i>                                      | Castor ( <b>Lawson et al., 2005</b> )  |
| <i>S. criceti</i>  | Ratas, hámster ( <b>Takada &amp; Hirasawa, 2007</b> )  |
| <i>S. cristatus</i>                                      | Oral human, sangre corazón ( <b>Handley et al., 1991; Matthys et al., 2006</b> )   |
| <i>S. dentapri</i>                                       | Jabalí (oral) ( <b>Takada et al., 2009</b> )   |
| <i>S. dentirosetti</i>                                   | Murciélago (oral) ( <b>Takada &amp; Hirasawa, 2008</b> )   |
| <i>S. devriesei</i>                                      | diente equinos ( <b>Collins et al., 2004</b> )   |
| <i>S. didelphis</i>                                      | zarigüeya (endocarditis marsupiales) ( <b>Rurangirwa et al., 2000</b> )  |
| <i>S. downei</i>   | oral human, primates oral ( <b>Yoo et al., 2005; Whiley et al., 1988</b> )   |
| <i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>Equisimilis</i>         | Flora normal garganta, piel, tracto genitourinario / faringitis / endocarditis (infrecuente), Bacteremia/nasofaringe equinos ( <b>Rantala et al., 2010; Preziuso et al., 2010; Menon et al., 2008; Yin et al., 2012</b> )                |
| <i>S. constellatus</i>                                   | flora orofaríngea, tracto respiratorio (Pleural empyema), absceso cerebral, infección torácica /endocarditis/ pyoderma en perro (raro) ( <b>Whiley et al., 1990; Senses et al., 2008; De Martino et al., 2012; Whiley et al., 1992</b> ) |
| <i>S. intermedius</i>                                    | boca, tracto respiratorio / abscesos cerebrales /endocarditis ( <b>Whiley et al., 1992; Tranet al., 2008</b> )   |
| <i>S. entericus</i>                                      | bovinos (intestino) ( <b>Vela et al., 2002</b> )   |
| <i>S. equi</i> subsp. <i>Equi</i>                        | Upper respiratory tract – strangles horses, infecciones-endocarditis in humans (rare) ( <b>Boschwitz &amp; Timoney, 1994;Breiman &amp; Silverblatt,1986</b> )  |
| <i>S. equinus</i>  | Tractodigestivo caballos, endocarditis humano (caso) ( <b>Sechi &amp; Ciani, 2000</b> )  |
| <i>S. ferus</i>  | Ratas (oral) ( <b>Baele et al., 2003</b> )   |
| <i>S. gallinaceus</i>                                    | pollos (endocarditis- septicemia) ( <b>Chadfield et al., 2005</b> ), Septicemia humano ( <b>Balm et al., 2006</b> )  |
| <i>S. gallolyticus</i>                                   | Rumiantes, palomas, endocarditis humano ( <b>Satué-Bartolomé &amp; Alonso-Sanz, 2009</b> )   |
| <i>S. gordonii</i> str. <i>challis</i> subst. <i>Ch1</i> | oral humano, endocarditis humano ( <b>Sommer et al., 1992</b> )  |
| <i>S. halichoeri</i>                                     | Focas ( <b>Lawson et al., 2004</b> )   |
| <i>S. henryi</i>   | Caballos (ciego) ( <b>Milínovich et al., 2008</b> )  |
| <i>S. hyointestinalis</i>                                | Intestino cerdos ( <b>Devriese et al., 1988</b> )  |
| <i>S. hyovaginalis</i>                                   | Tracto genital cerdas ( <b>Devriese et al., 1988</b> )   |
| <i>S. ictaluri</i>                                       | Pez gato ( <b>Lynn et al., 2007</b> )  |
| <i>S. infantarius</i>                                    | leche camellos, además heces, sangre, endocarditis, comida (like garbanzos) ( <b>Abdelgadir et al., 2008; Schlegel et al., 2000</b> )  |
| <i>S. infantis</i>                                       | dientes, faringe. (tracto respiratorio superior) ( <b>Kawamura et al., 1998</b> )  |
| <i>S. iniae</i>  | delfines, peces, infección humanos endocarditis, sepsis, piel (contacto peces) ( <b>Lau et al., 2003</b> )   |
| <i>S. luteciae</i>                                       | pocas referencias  |
| <i>S. lutetiensis</i>                                    | fecas, tracto urinario, endocarditis <b>Schlegel et al, 2000</b>   |

|                                  |  |
|----------------------------------|--|
| <i>S. macacae</i>                | Oral monos ( <b>Beighton et al., 1984</b> )  |
| <i>S. macedonicus</i>            | Greek Kasserli cheese // Only in a single case of a patient with endocarditis has a <i>S. macedonicus</i> strain been isolated from a cecal polyp, as revealed by 16S rRNA gene sequencing ( <b>Manachini et al., 2002</b> ) |
| <i>S. marimammalium</i>          | Focas <b>Lawson et al., 2005</b>   |
| <i>S. massiliensis</i>           | Sangre <b>Glazunova et al., 2006</b>   |
| <i>S. merionis</i>               | Gerbil Roedor (orofaringe), infección dedo por mordida de hamster ( <b>Tappe et al., 2009, Mills et al., 2010</b> )  |
| <i>S. minor</i>                  | Amígdalas y feca de perros, gatos y terneros <b>Vancanneyt et al., 2004</b>  |
| <i>S. mitis</i>                  | Human mouth, caries, endocarditis (endocarditis experimental ratas) <b>Denapaite et al., 2010</b>  |
| <i>S. mutans</i>                 | Oral human, endocarditis, dental calculus, septicemia  |
| <i>S. oligofermentans</i>        | Human mouth, endocarditis <b>Matta et al., 2009, Tong et al., 2003</b>   |
| <i>S. oralis</i>                 | Human mouth, caries, endocarditis (endocarditis experimental ratas) ( <b>Whatmore et al., 2000, Nagata et al., 2005</b> )  |
| <i>S. orisratti</i>              | Ratas oral ( <b>Zhu et al., 2000</b> )   |
| <i>S. orisuis</i>                | Cerdos oral ( <b>Takada &amp; Hirasawa, 2007</b> )   |
| <i>S. ovis</i>                   | Ovejas (muchos orígenes) ( <b>Collins et al., 2001</b> )   |
| <i>S. parasanguinis</i>          | Human mouth (CARIES), mastitis oveja, endocarditis oveja (artificial) y rata ( <b>Becker et al., 2002, Fernández-Garayzábal et al., 1998, Viscount et al., 1997</b> )  |
| <i>S. parauberis</i>             | bovinos (secreciones mamarias), peces ( <b>Fernández-No et al., 2012</b> )   |
| <i>S. pasteurianus</i>           | meningitis humano, peritonitis humano, septicemia en gansos ( <b>Barnett et al., 2008, Akahanr et al., 2009, Turt et al., 2010</b> )   |
| <i>S. peroris</i>                | Oral human ( <b>Kawamura et al., 1998</b> )  |
| <i>S. phocae</i>                 | Focas (pulmón), cetáceos, salmón ( <b>Lawson et al., 2004, Gibello et al., 2005</b> )  |
| <i>S. pluranimalium</i>          | Bovinos (mastitis,vagina), endocarditis pollos, tonsilas cabras, gato, pulmón canario ( <b>Hedegaard et al., 2009, Devriese et al., 1999</b> )   |
| <i>S. plurextorum</i>            | Cerdos (pulmón-riñón) infección ( <b>Vela et al., 2009</b> )   |
| <i>S. pneumoniae</i>             | nasofaringe, neumonia, endocarditis (nasofaringe cerdos, gatos, caballos, perros) ( <b>Hardie &amp; Whiley, 1997, Branger et al., 2003, van der Linden et al., 2009</b> )  |
| <i>S. porcinus</i>               | Cerdos linfadenopatía , infecciones tracto genitourinario humano <b>Vela et al., 2010</b>  |
| <i>S. pseudopneumoniae</i>       | Flema <b>Keith et al., 2006</b>  |
| <i>S. pseudoporcinus</i>         | tracto genitourinario mujer, infección dedo pulgar ( <b>Bekal et al., 2006, Mahlen et al., 2009</b> )  |
| <i>S. pyogenes</i>               | Tracto respiratorio superior/ Faringitis, infección piel, boca ratón, infección piel ratón ( <b>Ji et al., 1998, Musser et al., 1992</b> )   |
| <i>S. ratti</i>                  | oral human, oral animal (ratas) ( <b>Nishio et al., 2012</b> )   |
| <i>S. salivarius</i>             | Endocarditis, septicemia, boca y tracto respiratorio superior normal humano ( <b>Wilson et al., 2012</b> )   |
| <i>S. sanguinis</i>              | Boca humano (normal), endocarditis ( <b>Caufield et al., 2000</b> )  |
| <i>S. seminale</i>               | Semen toro ( <b>Ueda et al., 2007</b> )  |
| <i>S. sinensis</i>               | Endocarditis, oral cavity ( <b>Woo et al., 2002, Woo et al., 2008</b> )  |
| <i>S. sobrinus</i>               | human oral cavity, caries, endocarditis //caries ratas <b>Koo et al., 2002, Yoshida et al., 2003</b>   |
| <i>S. suis</i>                   | cerdos (enfermedades respiratorias, fiebre, meningitis), infecciones humanas, endocarditis <b>Staats, 1997</b>   |
| <i>S. thermophilus</i>           | (mucosa mamaria bovinos)-lácteos ( <b>Bolotin et al., 2004</b> )   |
| <i>S. thoralensis</i>            | cerda (tracto genital), feca conejos ( <b>Borø et al., 2010, Devriese, 1997</b> )  |
| <i>S. uberis</i>                 | mastitis en bovinos, endocarditis en un infante ( <b>Leigh, 1999, Bouskraoui et al., 1999</b> )  |
| <i>S. urinalis</i>               | Orina humana ( <b>Collins et al., 2000</b> )   |
| <i>S. ursoris</i>                | Oral oso ( <b>Shinozaki-Kuwahara et al., 2011</b> )  |
| <i>S. vestibularis</i>           | oral human –bacteremia, endocarditis, ( <b>Doyuk et al., 2002</b> )  |
| <i>L. lactis subsp. lactis</i>   | lácteos // endocarditis ( <b>Tsakalidou et al., 1992</b> )   |
| <i>L. lactis subsp. cremoris</i> | lácteos // endocarditis ( <b>Pellizzer et al., 1996</b> )  |

FIG 18a. Mapeo filogenético de los hábitats de cada bacteria. Es posible hacer *clusters* según el origen de algunos *Streptococcus*.

## PHYLOGENETIC-HABITAT MAPPING

ORAL human

ENDOCARDITIS human

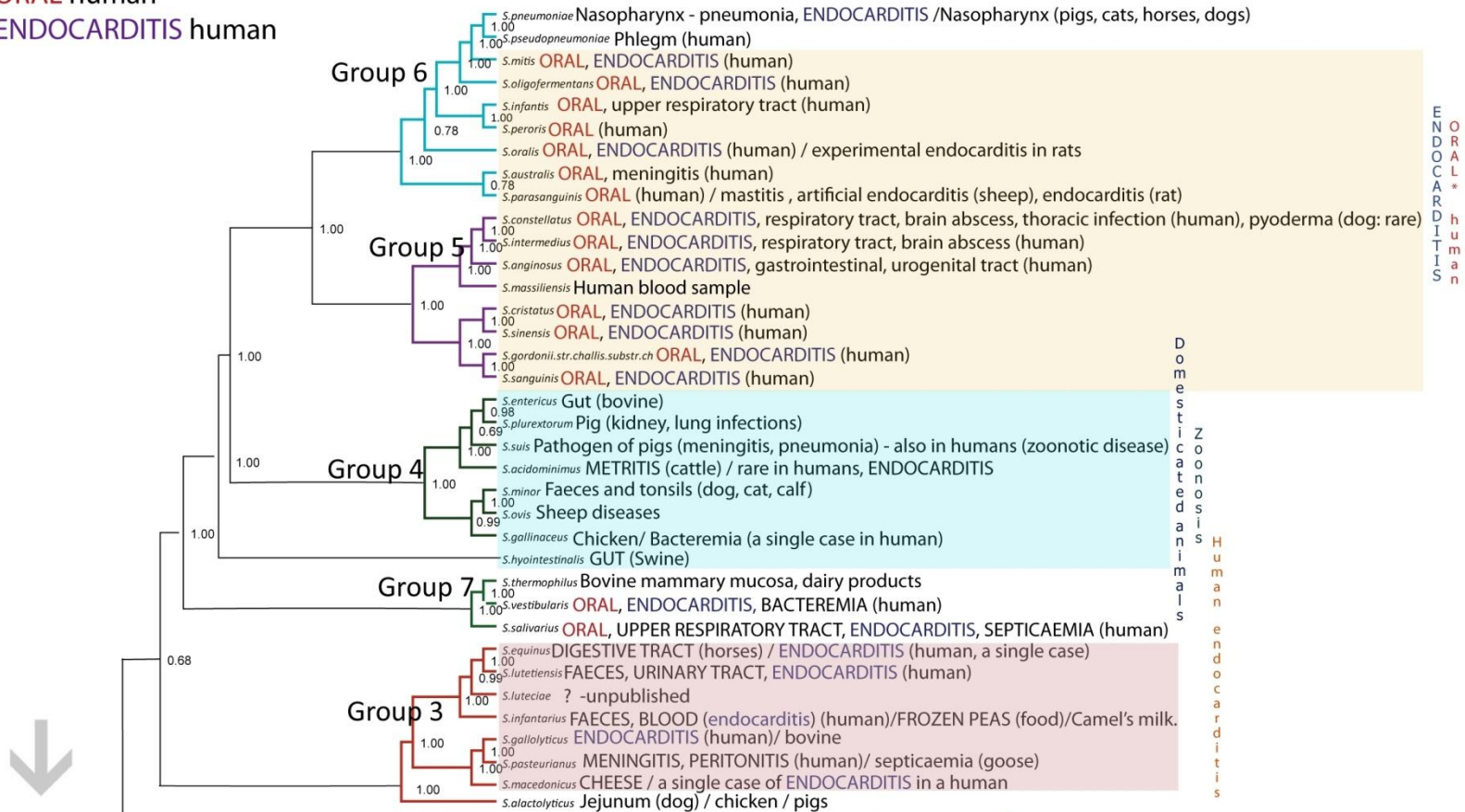
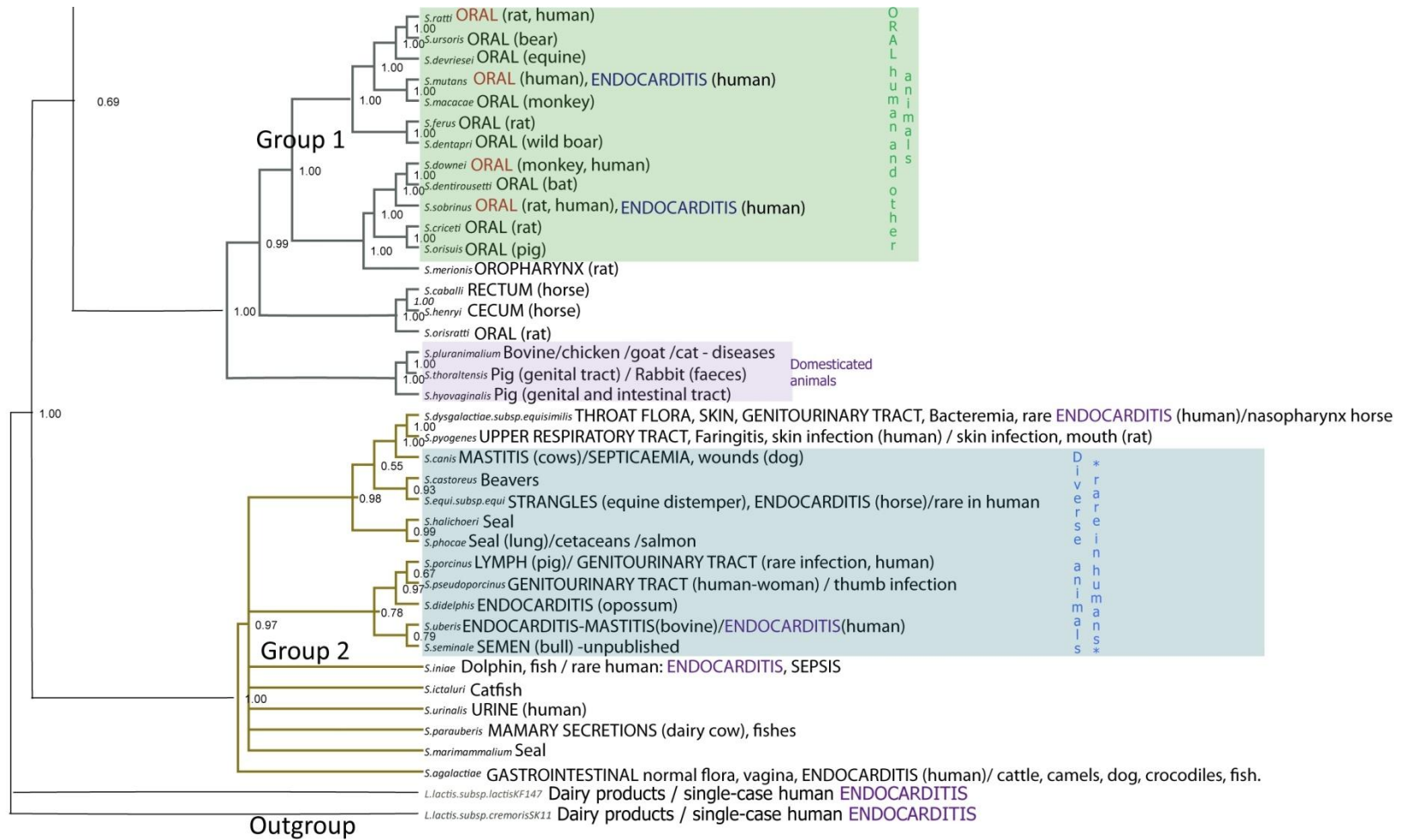


FIG 18b. Mapeo filogenético de los hábitats de cada bacteria. Es posible hacer *clusters* según el origen de algunos *Streptococcus*. (Continuación)



## Diseño hipótesis filogenia-bacteria-hábitat

Respecto a los grupos mitis- gordonii, como se planteó anteriormente, la gran mayoría de las especies aquí consideradas son habitantes normales de la cavidad oral humana. Se observa que *S. massiliensis*, cuya descripción de hábitat corresponde a una muestra de sangre de un paciente con una herida grave, es basal al subclado compuesto por *S. constellatus*, *S. intermedius* y *S. anginosus* (Fig. 19).

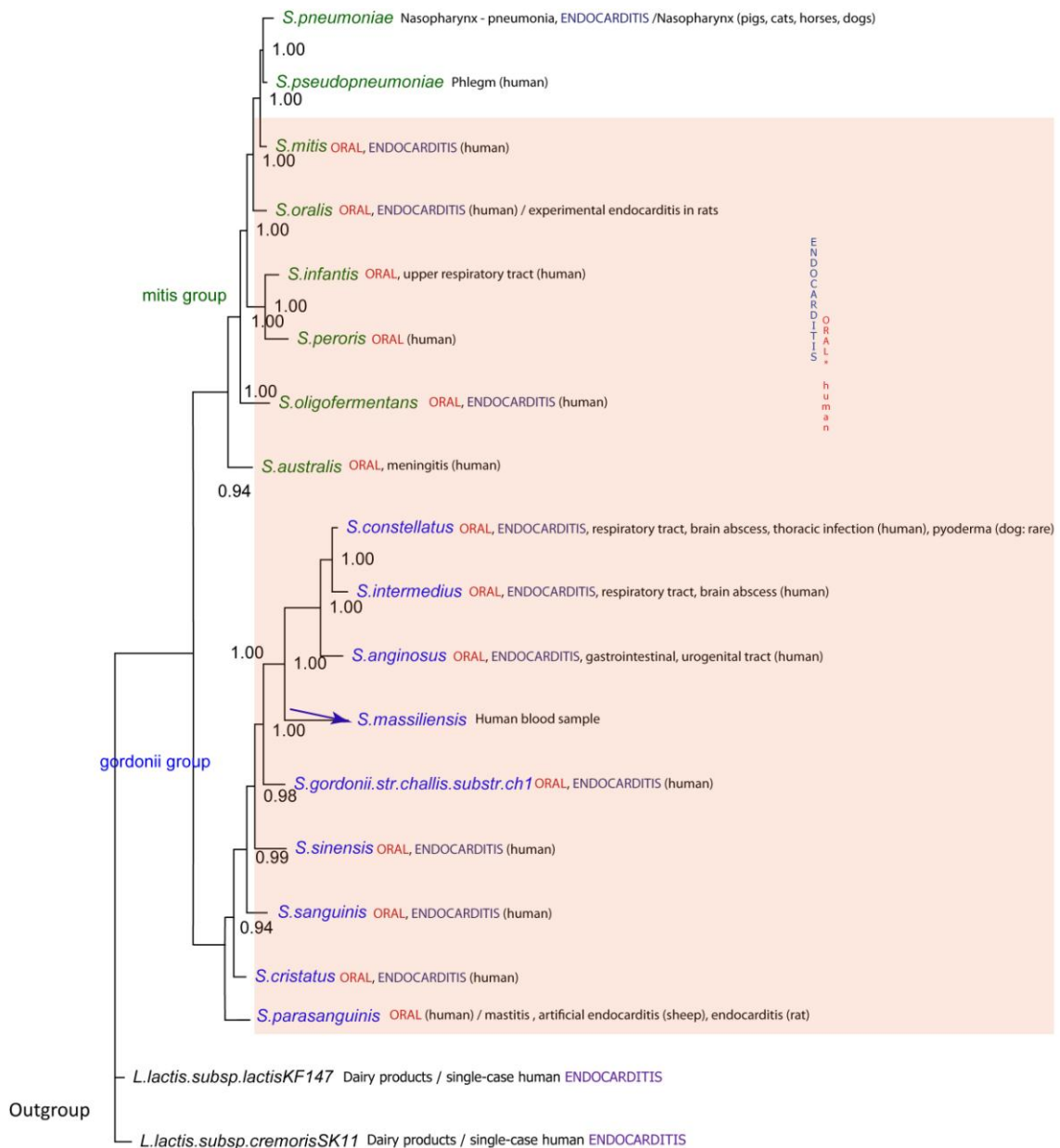


Fig 19. Acercamiento a Filogenia de grupo mitis –y cercanos-. Incluye hábitat de especies. Resultado de bayesiano sobre una matriz concatenada de genes [16sr RNA, rnpB, rpoB, dnaJ, gyrB, sodA y recN]. Incluye 19 especies, 2 de ellas *outgroups*. Cada especie lleva la descripción del hábitat -dónde ha sido hallada la bacteria. Con una flecha se señala la posición de *S. massiliensis* dentro del subgrupo *gordonii*. Todas las especies de dicho grupo, junto a la mayoría del subgrupo *mitis*, se han obtenido desde la cavidad oral.

Esto motiva a investigar, mediante el uso de PCR, su presencia en la cavidad oral humana.

### PCR

Se hizo un PCR para las primeras 10 muestras de omnívoros (MB\*1 a MB\*7 y MB8 a MB10) con el programa CONI\_MASS64 (35 ciclos, 64,7°C) y la electroforesis a 75V en 75', obteniéndose una amplificación nítida en la muestra MB\*7 (carriles 13 y 14); además de amplificaciones con bandas más tenues en las muestras MB\*1, MB\*2 y MB\*3 (Fig 20).

---

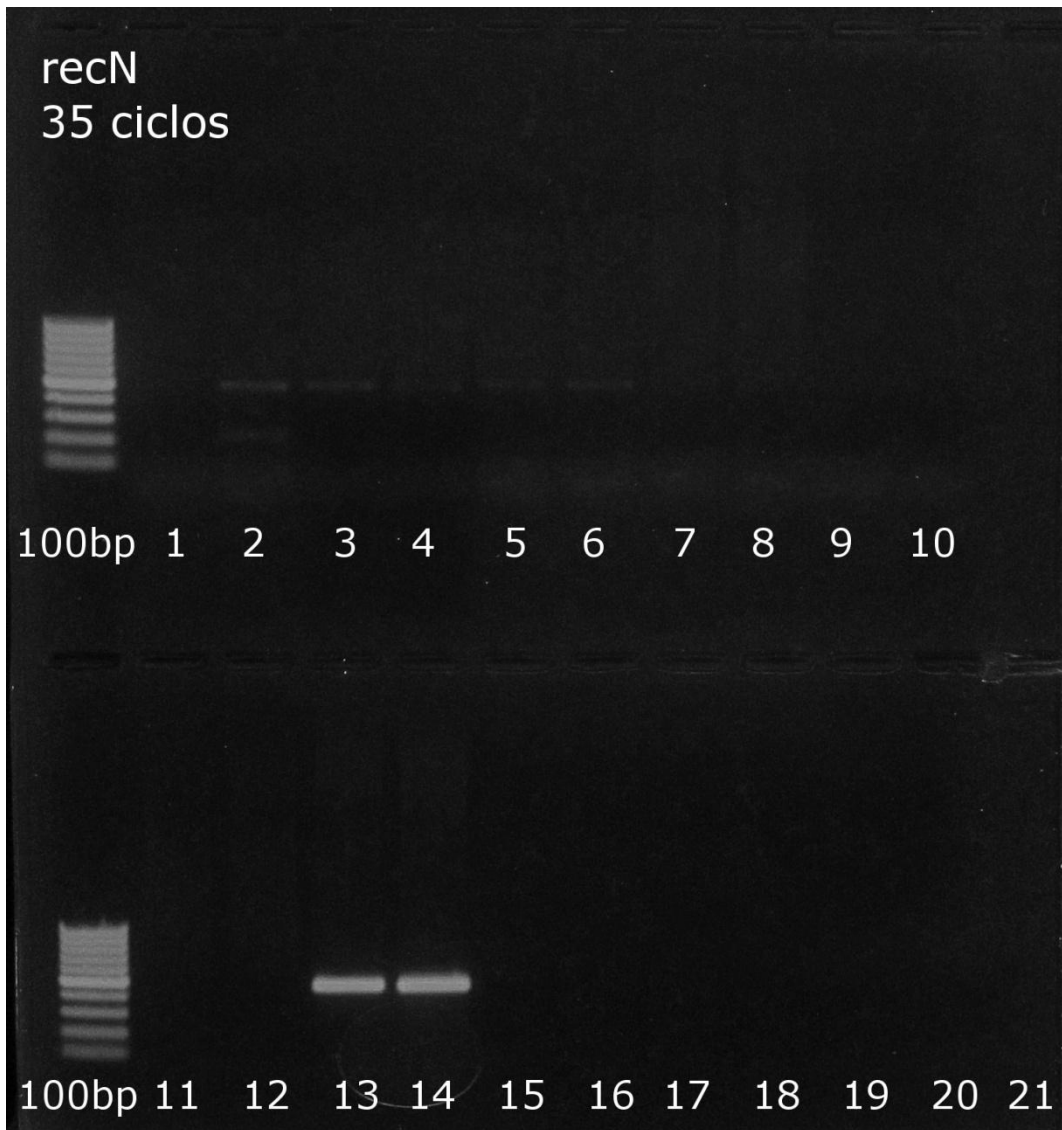


Fig 20. Electroforesis de productos de PCR de *Streptococcus massiliensis*. Carriles 1 y 2:muestra MB\*1 ; 3 y 4: MB\*2; 5 y 6: MB\*3; 7 y 8: MB\*4; 9 y 10: MB\*5; 11 y 12: MB\*6; 13 y 14: MB\*7; 15 y 16: MB8; 17 y 18: MB9; 19 y 20: MB10; 21: Control negativo. Con 35 ciclos a 75V por 75 minutos. IMG\_0505.18.06.12.

Posteriormente, se hizo un PCR para las mismas 10 muestras con el programa CONI\_MASS40c (a 40 ciclos, 64,7°C) con el fin de comprobar la existencia de *Streptococcus massiliensis* en las muestras que amplificaron de manera más tenue, debido a la probable baja frecuencia de ésta bacteria en dichas muestras. La electroforesis fue de 75V en 75 minutos. Se obtuvo una mayor cantidad de muestras amplificadas en relación a los 35 ciclos (50% de las muestras amplificaron para este partidor). En este caso podemos ver 3



amplificaciones marcadas (MB\*2, MB\*3 y MB\*7) y algunas más leves (MB\*1 y MB8) (Fig 21).

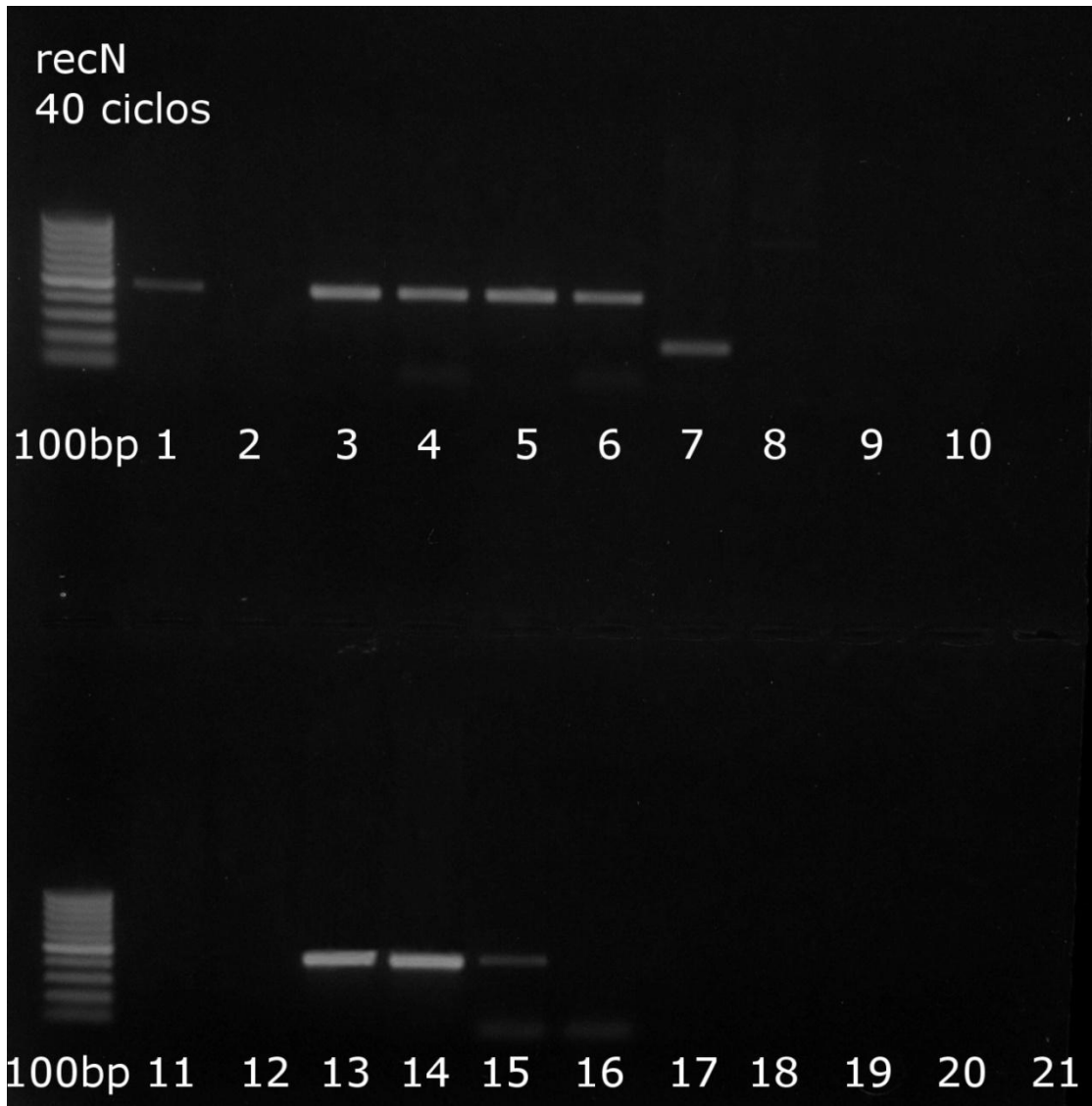


Fig 21. Electroforesis de productos de PCR de *Streptococcus massiliensis*. Carriles 1 y 2:muestra MB\*1 ; 3 y 4: MB\*2; 5 y 6: MB\*3; 7 y 8: MB\*4; 9 y 10: MB\*5; 11 y 12: MB\*6; 13 y 14: MB\*7; 15 y 16: MB8; 17 y 18: MB9; 19 y 20: MB10; 21: Control negativo; con 40 ciclos a 75V por 75 minutos. IMG\_0515.19.06.12.

Se procedió a realizar un PCR con las mismas muestras pero a 45 ciclos, con el fin de comprobar la existencia de la bacteria en otras muestras, algunas de las cuales en los 40 ciclos mostraron amplificaciones leves. La electroforesis fue de 75V en 90 minutos, obteniéndose una menor cantidad de amplificaciones en las muestras (40% de las muestras amplificaron con este

primer) y además un aumento de amplificaciones inespecíficas al aumentar los ciclos de 40 a 45 (data non-shown).

Finalmente, se ejecutó un PCR para las mismas muestras con 50 ciclos, con el fin de comprobar la existencia de la bacteria en otras muestras, algunas de las cuales mantenían amplificaciones leves, además que intentar buscar los ciclos “óptimos” necesarios para observar la mayor cantidad de amplificaciones. La electroforesis fue de 75V en 90 minutos, obteniéndose una menor cantidad de amplificaciones del segmento buscado y, por el contrario, un aumento progresivo de amplificaciones inespecíficas en las muestras

De este modo, se comprobó que a los 40 ciclos se obtiene una mejor resolución de la presencia de la bacteria cuando está en bajas concentraciones. Con estas condiciones, se hizo un PCR de para otras 10 muestras (MB11 a MB16) con el programa CONI\_MASS40c, con el fin de comprobar la existencia de *Streptococcus massiliensis* en otras muestras. La electroforesis fue de 75V en 90 minutos, obteniéndose 4 muestras con resultado positivo (data non shown).

Se realizó el mismo procedimiento de PCR de para muestras de vegetarianos (Veget1 a Veget8) con 40 ciclos, con el fin de comprobar la existencia de la bacteria en personas con distinto régimen dietario. La electroforesis se hizo a 75 V por 90 minutos (Fig 22).

---

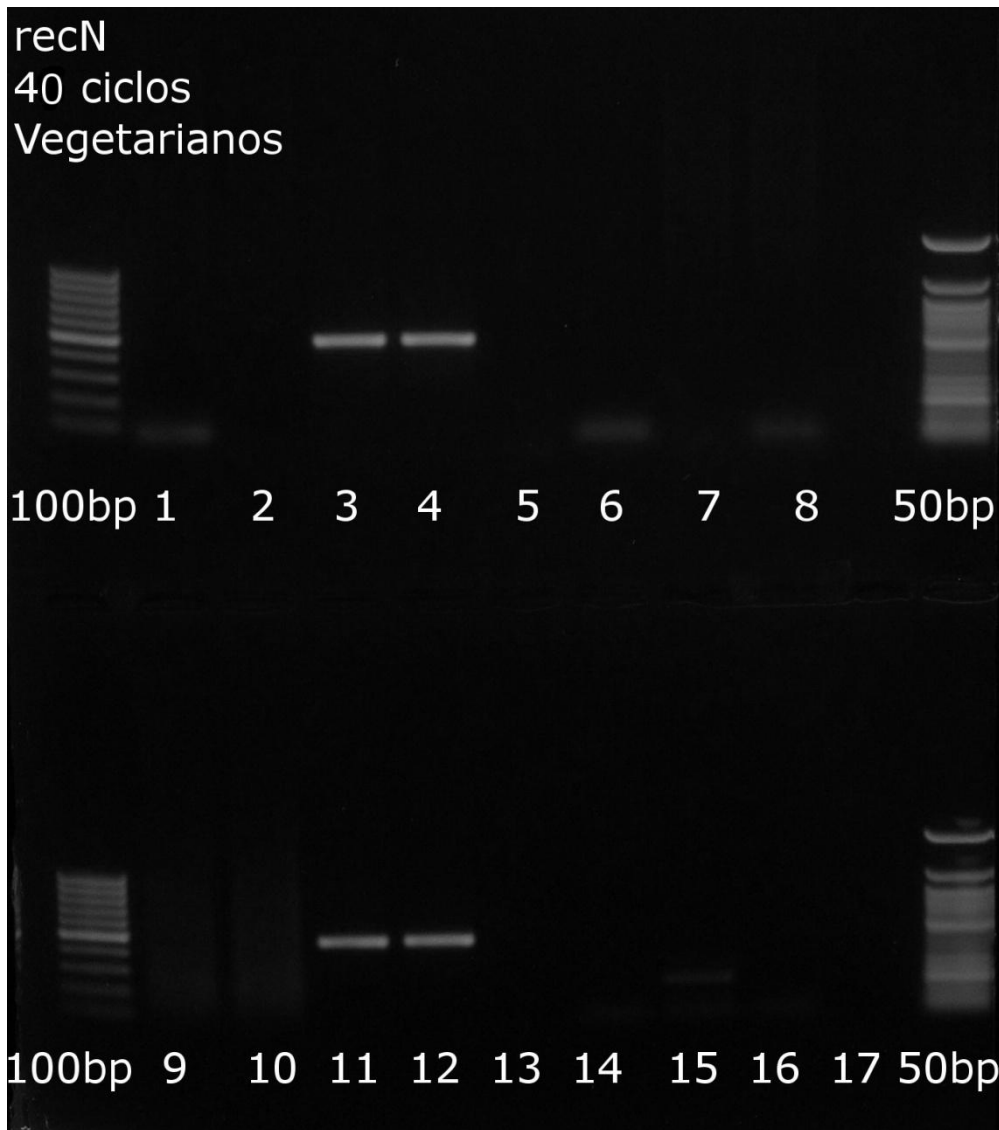


Fig 22. Electroforesis de productos de PCR de *Streptococcus massiliensis*. Carril 1 y 2: Muestra Veget1; 3 y 4: Veget2; 5 y 6: Veget3; 7 y 8: Veget4; 9 y 10: Veget5; 11 y 12: Veget6; 13 y 14: Veget7; 15 y 16: Veget8; 17: Control negativo. Durante 40 ciclos a 75V por 90 minutos. IMG\_0546. 26.06.12.

La amplificación del *primer* especie-específico de *S. massiliensis*, para el caso de los individuos vegetarianos fue menor (n=2 de 8; 25%) a la de los omnívoros (n= 10 de 16; 62% aprox.). No obstante las diferencias no fueron significativas (prueba exacta de Fisher,  $p=0,2$ ), este estudio se podría complementar aumentando el número de muestras, además de ampliar el registro dietario (consumo de mariscos, de cerdo; diferenciando veganos y vegetarianos), e incluso considerar en la encuesta previa las enfermedades que pudieron afectar al individuo y predisponerlo a tener la bacteria.

## Secuenciación y análisis.

Las 7 muestras secuenciadas no muestran ninguna diferencia respecto de la secuencia modelo de GENBANK. La Fig. 23 muestra el alineamiento de la muestra MB7 (omnívoro).

FIG 23. Alineamiento con BLAST de la muestra MB7

```
>lcl|64169
Length=455

Score = 821 bits (910), Expect = 0.0
Identities = 455/455 (100%), Gaps = 0/455 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 4   GATTAGCGACTACGACCCGCACTACAAGGACTTGTGCGACCAATCTGTGCGGAAGGCTACTA 63
          |||
Sbjct 1   GATTAGCGACTACGACCCGCACTACAAGGACTTGTGCGACCAATCTGTGCGGAAGGCTACTA 60

Query 64  TGTGCTGGAAGACGTCAGCAAGCGTTTAGAGGATATTTGGACGGGCTGGATTTTGACGG 123
          |||
Sbjct 61  TGTGCTGGAAGACGTCAGCAAGCGTTTAGAGGATATTTGGACGGGCTGGATTTTGACGG 120

Query 124 CAATCGTCTTATGCAGCTGGGAAGTCGGCTGGATTTGCTCAACAGCATCACGCGCAAATA 183
          |||
Sbjct 121 CAATCGTCTTATGCAGCTGGGAAGTCGGCTGGATTTGCTCAACAGCATCACGCGCAAATA 180

Query 184 CGGCGGGCAGGTGGACGATGTCCTGACCTACTATGAGCAAATCAGCAGAGAGTACAATCT 243
          |||
Sbjct 181 CGGCGGGCAGGTGGACGATGTCCTGACCTACTATGAGCAAATCAGCAGAGAGTACAATCT 240

Query 244 TTTGACGGGCAATCATCTGTCGTCAGAGGATTTGGAGAAGGAATTAAGAGAGAGAGCA 303
          |||
Sbjct 241 TTTGACGGGCAATCATCTGTCGTCAGAGGATTTGGAGAAGGAATTAAGAGAGAGAGCA 300

Query 304 AGAGTTGGTGGCACTGGCTCAGGAACTCAGCCAAGCGCGTCACAGTCTGGCTCAAAC TTT 363
          |||
Sbjct 301 AGAGTTGGTGGCACTGGCTCAGGAACTCAGCCAAGCGCGTCACAGTCTGGCTCAAAC TTT 360

Query 364 GGAAGCCGAAATCAAGCAGGAATTACAAGATTTGTATATGGAAGGCAATTTCCAAGT 423
          |||
Sbjct 361 GGAAGCCGAAATCAAGCAGGAATTACAAGATTTGTATATGGAAGGCAATTTCCAAGT 420

Query 424 CAAGTTTAGCAAGGGCAAGTTTAACCGCGAGGGCA 458
          |||
Sbjct 421 CAAGTTTAGCAAGGGCAAGTTTAACCGCGAGGGCA 455
```

Se presenta un árbol de distancias (NJ) sin raíz de las secuencias del gen recN (para el grupo mitis y especies cercanas) que agrupa a las 7 muestras secuenciadas (en azul) junto a la secuencia modelo de GENBANK de *S. massiliensis* (Fig 19). El mismo resultado se puede observar para un árbol enraizado, con distancias corregidas por *likelihood* (Fig 20).

Fig 24. Árbol sin raíz de distancias (NJ) para las especies del grupo mitis del gen recN, junto a las muestras secuenciadas en este estudio (en azul). Todas las muestras agrupan con *S. massiliensis*.

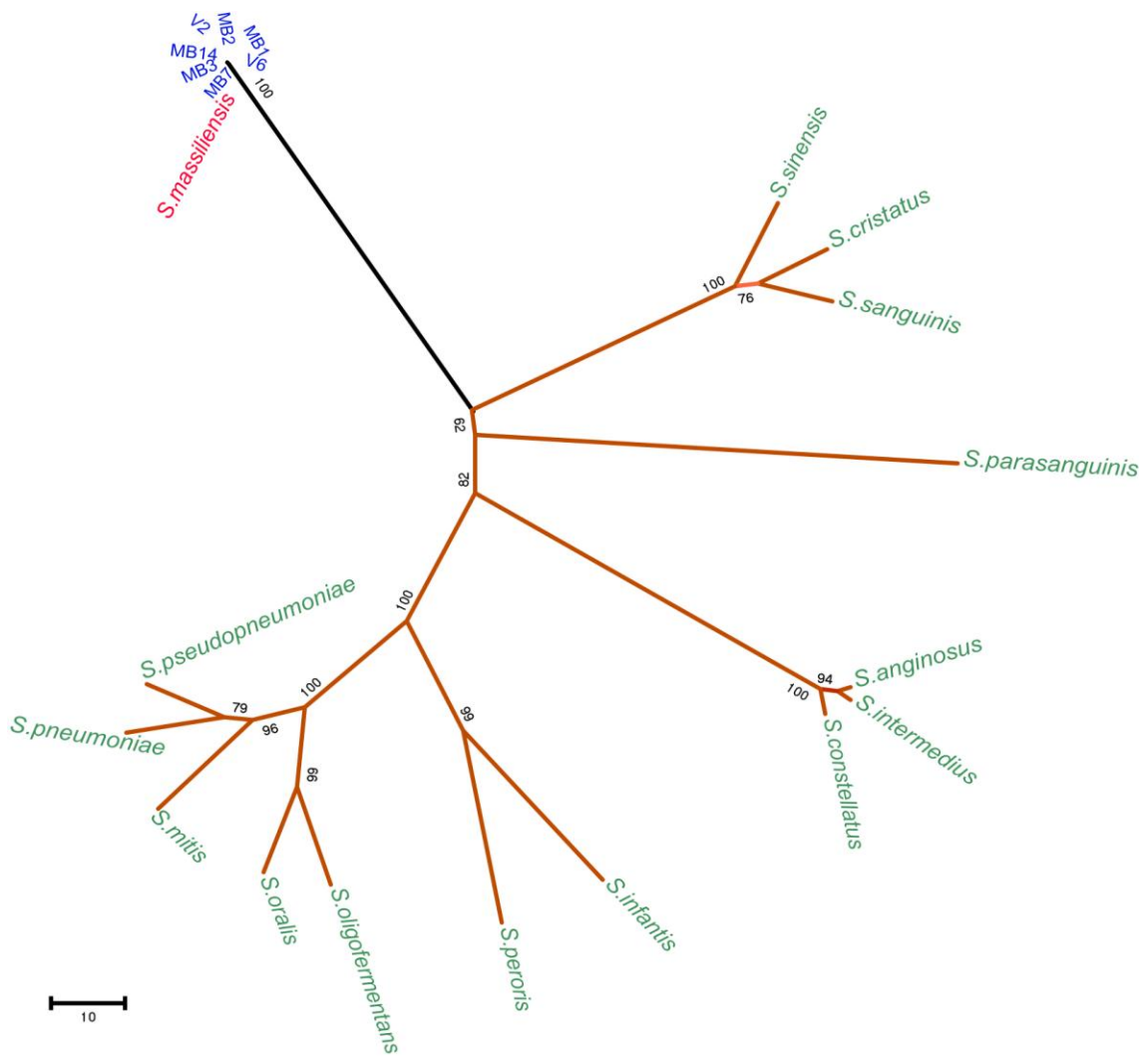
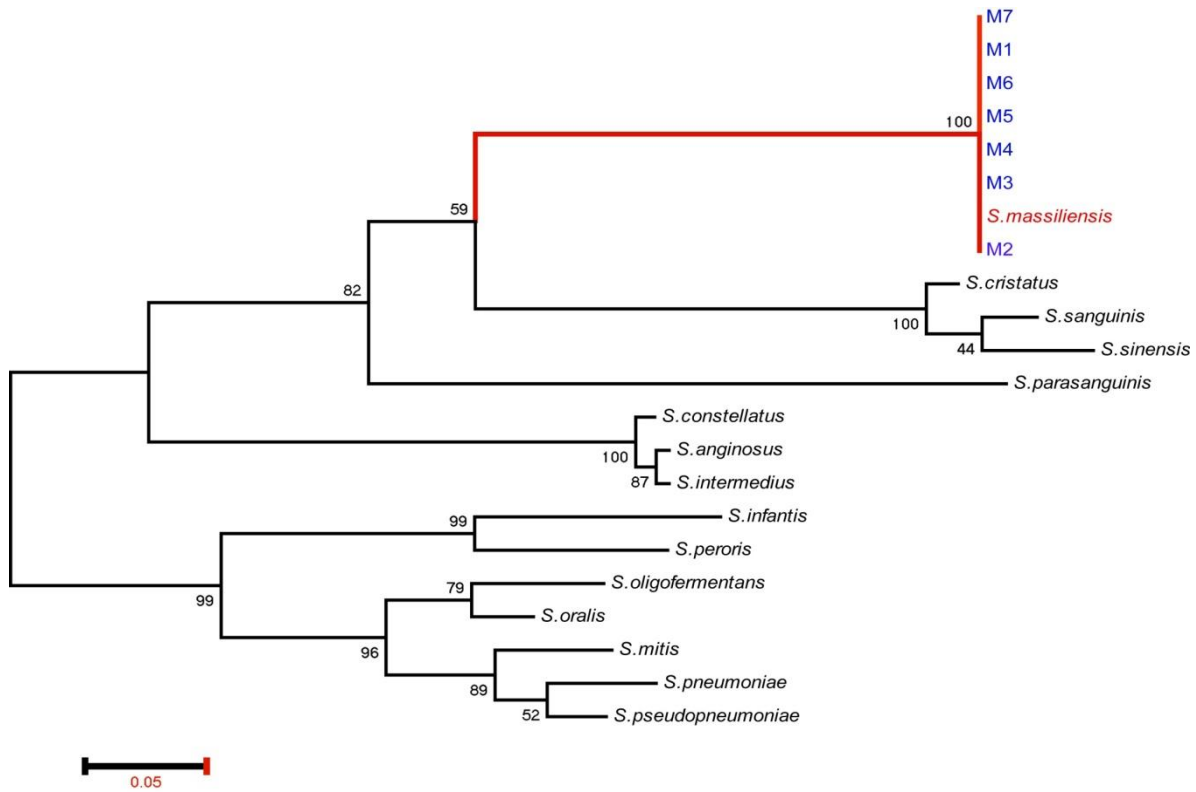


Fig 25. Árbol enraizado de distancias (nj) corregido por *likelihood*, del grupo mitis para el gen recN. Al igual que la figura anterior se ve un agrupamiento de las muestras con la referencia de *S. massiliensis*.



## CONCLUSIÓN

Este trabajo contribuye con un análisis filogenético exhaustivo del género *Streptococcus*. En primer lugar, la resolución de una extensa filogenia, como lo es en este caso la del género *Streptococcus*, puede verse beneficiada por el uso en conjunto de varios fragmentos génicos previamente ‘filtrados’ por los resultados de herramientas como el test de homogeneidad (concatenar fragmentos compatibles filogenéticamente). A su vez, el análisis de publicaciones previas y las hipótesis filogenéticas que éstas postulan, más el uso de *constraints*, puede ayudar a resolver las topologías internas de cada subclado o grupo de especies. De este modo, aquí enfocándose en problemas específicos de la filogenia pudimos ir resolviendo, si bien no en su completitud (por ausencia de herramientas génicas) parte por parte la filogenia a nivel macro.

En segundo término, que la topología del árbol filogenético guarde muchas veces relación con el hábitat, y que cada clado definido lo caracterice un set de ambientes definidos, sienta las bases para analizar el enfoque de inercia filogenética. A partir de aquí se podría ayudar a inferir hábitats desconocidos de ciertas especies, cuando el registro de hábitats está incompleto debido a que hay ambientes aún sin explorar, tanto en microbioma humano y animal. Así, este estudio filogenético ofrece un punto de inicio para la interacción entre evolución y modelos ecológicos en el linaje de las bacterias, teniendo siempre en cuenta que falta por realizar estudios que ahonden en este tema, como por ejemplo, utilizando el método comparativo filogenético.

En tercer lugar, y poniendo a prueba lo anteriormente expuesto, se demuestra que *S. massiliensis*, especie de estreptococo descubierta recientemente (Glazunova, 2006), es un habitante normal de la flora oral humana tal y como se predijo con el modelo de inercia filogenética. La concentración de dicha bacteria es variable entre distintos individuos, lo que puede ser motivo de interés para otras publicaciones, pero su presencia está bien representada en muestras tomadas al azar.

Finalmente, con los resultados obtenidos en este trabajo sería apresurado plantear una relación entre la presencia de *S massiliensis* y costumbres alimentarias, puesto que los resultados estadísticos no avalan esto. Aún así, y en vista de que hay cierta tendencia a que individuos con dieta omnívora presenten la bacteria, esta idea podría estudiarse más a fondo, por ejemplo, aumentando el número de individuos considerados y, además, ampliar el registro de los alimentos o sustancias consumidos por cada individuo (mariscos, tipos de carne, alcohol y tabaco, drogas, etc), e incluso considerar en la encuesta algunas enfermedades que puedan tener relación con ser portador de la bacteria, e incluso obtener datos de parientes del individuo muestreado.

Por consiguiente, el enfoque de inercia filogenética desde el diseño del método, el mapeo de ambientes, la puesta a prueba del diseño con partidores y PCR y las conclusiones respecto a la dieta de los individuos, resultó ser útil para llevar a lo genómico la hipótesis de diversidad morfológica bacteriana en relación a la dieta, planteada en estudios previos por Linossier y colaboradores.



## Referencias.

1. **Aas, J. A., Paster, B. J., Stokes, L. N., Olsen, I. & Dewhirst F. E. (2008).** Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral cavity *J Clin Microbiol***43**, 5721-5732.
2. **Abdelgadir W., Nielsen, D. S., Hamad, S., Jakobsen, M. (2008).** A traditional Sudanese fermented camel's milk product, *Gariss*, as a habitat of *Streptococcus infantarius* subsp. *Infantarius*. *Int J Food Microbiol* **127**, 215-219.
3. **Akahanr, T., Takahashi, K., Matsumoto, T. & Kawakami, Y. (2009).** A case of peritonitis due to *Streptococcus gallolyticus* subsp. *Pasteurianus*. *Kansenshogaku Zasshi***83**, 56-59.
4. **Alfonso-Durruty M, Calás, E., Morello, F. (2011).** Análisis bioantropológico de un enterratorio humano del Holoceno Tardío en Cabo Nose, Tierra del Fuego, Chile. *MAGALLANIA*, (Chile) **39**(1):147-162.
5. **Aufderheide, A., Kelley, M., Rivera, M., Gray, L., Tieszen, L., Iversen, E., Krouse, H. R., Carevic, A. (1994).** Contributions of Chemical Dietary Reconstruction to the Assessment of Adaptation by Ancient Highland Immigrants (Alto Ramirez) to Coastal Conditions at Pisagua, North Chile. *Journal of Archaeological Science* **21**(4) 515–524
6. **Aufderheide, A. y Santoro, C. (1999).** Chemical paleodietary reconstruction: Human populations at late prehistoric sites in the Lluta Valley of northern Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* **72**: 237-250.
7. **Aufderheide, A., Aturaliya, S., y Focacci, G. (2002).** Pulmonary disease in a sample of mummies from the Az-75 cemetery in Northern Chile's Azapa Valley. *Chungará (Arica)* **34**(2) 253-263.
8. **Baele, M., Devriese, L. A., Vancanneyt, M., Vanechoutte, M., Snauwaert, C., Swings, J. & Haesebrouck, F. (2003).** Emended description of *Streptococcus ferus* isolated from pigs and rats. *Int J Syst Evol Microbiol***53**, 143-146.
9. **Balm, M. N., Truong, H. T., Choudhary, A. S., Robinson, G. M. & Blackmore, T. (2006).** *Streptococcus gallinaceus* bacteraemia in an abattoir worker presenting with a febrile illness. *J Med Microbiol***55**: 957-959.
10. **Barberena, R. (2004).** Arqueología e Isótopos estables en Tierra del Fuego. En *Temas de Arqueología. Arqueología del norte de la Isla Grande Tierra del Fuego*. Borrero L.A. y Barberena R. 135-169. 2004.
11. **Barnett, J., Ainsworth, H., Boon, J. D. & Twomey, D. F. (2008).** *Streptococcus gallolyticus* subsp. *pasteurianus* septicaemia in goslings *Vet J* **176**, 251-253.
12. **Becker, M. R., Paster, B. J., Leys, E. J., Moeschberger, M. L., Kenyon, S. G., Galvin, J. L., Boches, S. K., Dewhirst, F. E. & Griffen, A. L. (2002).** Molecular Analysis of Bacterial Species Associated with Childhood Caries. *J Clin Microbiol***40**,1001–1009.
13. **Beighton, D., Hayday, H., Russell, R. R. B. & Whiley, R. A. (1984).** *Streptococcus macacae* sp. nov. from Dental Plaque of Monkeys (*Macaca fascicularis*) *Int J Syst Bacteriol***34**, 332-335.
14. **Bekal, S., Gaudreau, C., Laurence, R. A., Simoneau, E. & Raynal, L. (2006).** *Streptococcus pseudoporcinus* sp. nov., a Novel Species Isolated from the Genitourinary Tract of Women. *J Clin Microbiol***44**, 2584-2586.
15. **Bert, F. & Lambert-Zechovsky, N. (1997).** Septicemia Caused by *Streptococcus canis* in a Human. *J Clin Microbiol***35**, 777–779.
16. **Bik, E. B, Long, C. D., Armitage, G. C., Loomer, P., Emerson, J., Mongodin, E. F., Nelson, K. E., Grill, S. R., Fraser-Liggett, C. M. & Relman, D. A. (2010).** Bacterial diversity in the oral cavity of ten healthy individuals En: *ISME J***4**, 962-974.
17. **Boggs, J. M, South, A. H. & Hughes, A. L. (2012).** Phylogenetic analysis supports horizontal gene transfer of L-amino acid oxidase gene in *Streptococcus oligofermentans*. *Infect Genet Evol***12**, 1005-1009.

18. **Bolotin A., Quinquis, B., Renault, P., Sorokin, A., Ehrlich, S. D., Kulakauskas, S., Lapidus, A., Goltzman, E., Mazur, M., Pusch, G. D., Fonstein, M., Overbeek, R., Kyprides, N., Purnelle, B., Prozzi, D., Ngui, K., Masuy, D., Hancy, F., Burteau, S., Boutry, M., Delcour, J., Goffeau, A. & Hols, P. (2004).** Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Nat Biotechnol***22**, 1554 – 1558.
19. **Borø S., McCartney, C. A., Snelling, T. J., Worgan, H. J. & McEwan, N. R. (2010).** Isolation of *Streptococcus thoralensis* from Rabbit Faeces. *Curr Microbiol***61**, 357-360.
20. **Boschwitz J. S. & Timoney, J. F. (1994).** Inhibition of C3 Deposition on *Streptococcus equi subsp. equi* by M Protein: a Mechanism for Survival in Equine Blood. *Infect Immun***62**, 3515-3520.
21. **Bouskraoui M., Benbachir, M. & Abid, A. (1999).** *Streptococcus uberis* endocarditis in an infant with atrioventricular defect. *Arch Pediatr***6**, 481.
22. **Brachlow, A., Awadallah, S., Chatterjee, A. (2003).** Endocarditis due to *Streptococcus acidominimus*. *Pediatr Cardiol* **24**, 161-163.
23. **Branger, S., Casalta, J. P., Habib, G., Collard, F. & Raoult, D. (2003).** *Streptococcus pneumoniae* Endocarditis: Persistence of DNA on Heart Valve Material 7 Years after Infectious Episode. *J Clin Microbiol* **41**, 4435–4437.
24. **Breiman, R. F & Silverblatt, F. J. (1986).** Systemic *Streptococcus equi* infection in a horse handler: A Case of Human Strangles *West J Med***145**, 385-386.
25. **Brimil, N., Barthell, E., Heindrichs, U., Kuhn, M., Lütticken, R. & Spellerberg, B. (2006).** Epidemiology of *Streptococcus agalactiae* colonization in Germany *Int J Med Microbiol***296**, 39–44.
26. **Brown, J.R. (2003).** Ancient horizontal gene transfer. *Nature Reviews Genetics* **4**, 121-4132.
27. **Caufield, P. W., Dasanayake, A. P., Li, Y., Pan, Y., Hsu, J. & Hardin, J. M. (2000).** Natural History of *Streptococcus sanguinis* in the Oral Cavity of Infants: Evidence for a Discrete Window of Infectivity. *Infect Immun***68**, 4018-4023.
28. **Chadfield, M. S., Bojesen, A. M., Christensen, J. P., Juul-Hansen, J., Saxmose Nielsen, S. & Bisgaard, M. (2005).** Reproduction of sepsis and endocarditis by experimental infection of chickens with *Streptococcus gallinaceus* and *Enterococcus hirae*. *Avian Pathol***34**, 238-247.
29. **Collins, M. D., Hutson, R. A., Falsen, E., Nikolaitchouk, N., LaClaire, L. & Facklam, R. R. (2000).** An unusual *Streptococcus* from human urine, *Streptococcus urinalis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol***50**, 1173-1178.
30. **Collins, M. D., Hutson, R. A., Hoyles, L., Falsen, E., Nikolaitchouk, N. & Foster, G. (2001).** *Streptococcus ovis* sp. nov., isolated from sheep *Int J Syst Evol Microbiol***51**, 1147–1150.
31. **Collins, M. D., Lundström, T., Welinder-Olsson, C., Hansson, I., Wattle, O., Hudson, R. A. & Falsen, E. (2004).** *Streptococcus devriesei* sp. nov., from Equine Teeth. *Syst Appl Microbiol***27**, 146–150.
32. **Costa, M. A., Neves, W. A. y Hubbe, M. (2004).** Influencia de Tiwanaku en la calidad de vida biológica de la población prehistórica de San Pedro de Atacama. *Estudios Atacamenos* **27**: 103-116.
- 33.
34. **Dalal, A. & Urban, C. (2008).** Human Infections Due to *Streptococcus acidominimus*. *Infect Dis Clin Pract* **16**, 283-284.
35. **De la Fuente, C., Flores, S. & Moraga, M. (2012).** DNA from human ancient bacteria: A novel source of genetic evidence from archaeological dental calculus. *Archaeometry*.

36. De Martino, L., Nizza, S., de Martinis, C., Manzillo, V. F., Iovane, V., Paciello, O. & Pagnini, U. (2012). *Streptococcus constellatus*-associated pyoderma in a dog. *J Med Microbiol* **61**:438-442.
37. Denapate, D., Brückner, R., Nuhn, M., Reichmann, P., Henrich, B., Maurer, P., Schähle, Y., Selbmann, P., Zimmermann, W., Wambutt, R. & Hakenbeck, R. (2010). The Genome of *Streptococcus mitis* B6 - What Is a Commensal? *PLoS One* **5**, e9426.
38. Devriese, L. A., Hommez, J., Kilpper-Bälz, R. & Schleifer, K.H. (1986). "*Streptococcus canis* sp. nov.: A Species of Group G Streptococci from Animals" *Int J Syst Evol Microbiol* **36**, 422-425.
39. Devriese, L. A., Kilpper-Bälz, R. & Schleifer, K. H. (1988). *Streptococcus hyointestinalis* sp.nov. from the Gut of Swine. *Int J Syst Bacteriol* **38**, 440-441.
40. Devriese, L. A., Pot, B., Vandamme, P., Kersters, K., Collins, M. D., Alvarez, N., Haesebrouck, F. & Hommez, J. (1997). *Streptococcus hyovaginalis* sp.nov. and *Streptococcus thoralensis* sp.nov., from the Genital Tract of Sows. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 1073-1077.
41. Devriese, L. A., Vandamme, P., Collins, M. D., Alvarez, N., Pot, B., Hommez, J., Butaye, P. & Haesebrouck, F. (1999). *Streptococcus pluranimalium* sp. nov., from cattle and other animals. *Int J Syst Bacteriol* **49**, 1221-1226.
42. Doyuk, E., Ormerod, O. J. & Bowler, I. C. (2002). Native valve endocarditis due to *Streptococcus vestibularis* and *Streptococcus oralis*. *J Infect* **45**, 39-41.
43. Facklam, R. (2002). What happened to Streptococci: Overview of Taxonomic and Nomenclature changes. *Clin Microbiol Rev* **15**, 613-630.
44. Falabella, F., Planella, M., Aspillaga, E., Sanhueza, L. y Tykot, R. (2007). Dieta en sociedades alfareras de Chile Central: Aporte de análisis de isótopos estables. *Chungará (Arica)* **39(1)**, 5-27.
45. Fernández-Garayzábal, J. F., Fernández, E., Las Heras, A., Pascual, C., Collins, M. D. & Domínguez, L. (1998). *Streptococcus parasanguinis*: new pathogen associated with asymptomatic mastitis in sheep. *Emerg Infect Dis* **4**, 645-647.
46. Fernández-No, I. C., Böhme, K., Calo-Mata, P., Cañas, B., Gallardo, J. M. & Barros-Velázquez, J. (2012). Isolation and characterization of *Streptococcus parauberis* from vacuum-packaging refrigerated seafood products. *Food Microbiol* **30**, 91-97.
47. Focaccia, R., Cais, D. P., Carrasco, R., Varejão, T. M. (2010). Acute *Streptococcus agalactiae* endocarditis: Outcomes of early surgical treatment. *Heart Lung* **39**, 331-334.
48. Gibello, A., Mata, A. I., Blanco, M. M., Casamayor, A., Domínguez, L. & Fernández-Garayzábal, J. F. (2005). First Identification of *Streptococcus phocae* Isolated from Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *J Clin Microbiol* **43**, 526-527.
49. Glazunova, O., Raoult, D. & Roux, V. (2006). *Streptococcus massiliensis* sp. nov., isolated from a patient blood culture. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 1127-1131.
50. Glazunova, O., Raoult, D. & Roux, V. (2010). Partial recN gene sequencing: a new tool for identification and phylogeny within the genus *Streptococcus*. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 2140-2148.
51. Haak, W., Brandt, G., de Jong, H. N., Meyer, C., Ganslmeier, R., Heyd, V., Hawkesworth, C., Pike, A. W. G., Meller, H. & Alt, K. W. (2008). Ancient DNA, Strontium, and osteological analyses shed light on social and kinship organization of the Later Stone Age. *PNAS*, **105(47)**, 18226-18231.
52. Handley, P. A., Coykendall, D., Beighton, J., Hardie, M. & Whiley, R. A. (1991). *Streptococcus crista* sp. nov. a Viridans *Streptococcus* with Tufted Fibrils, Isolated from the Human Oral Cavity and Throat. *Int J Syst Bacteriol* **41**, 543-547.

53. **Hardie, J.M & Whiley, R.A. (1997).** Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* **83**, 1S–11S.
54. **Hedegaard, L., Christensen, H., Chadfield, M. S., Christensen, J. P. & Bisgaard, M. (2009).** Association of *Streptococcus pluranimalium* with valvular endocarditis and septicaemia in adult broiler parents. *Avian Pathol***38**, 155-160.
55. **Héry-Arnaud, G., Rouzic, N., Doloy, A., Le Lay, G., Garré, M., Payan, C., & Poyart, C. (2011).** *Streptococcus australis* meningitis. *J Med Microbiol***60**, 1701–1704.
56. **Holden, T. (1991).** Evidence of prehistoric diet from Northern Chile: Coprolites, gut contents and flotation samples from Tulan Quebrada. *World Archaeology* **22 (3)**: 321-331.
57. **Hoskins, J., Alborn Jr., W. E., Arnold, J., Blaszczyk, L. C., Burgett, S., DeHoff, B. S., Estrem, S. T., Fritz, L., Fu, D. J., Fuller, W., Geringer, C., Gilmour, R., Glass, J. S., Khoja, H., Kraft, A. R., Lagace, R. E., LeBlanc, D. J., Lee, L. N., Lefkowitz, E. J., Lu, J., Matsushima, P., McAhren, S. M., McHenney, M., McLeaster, K., Mundy, C. W., Nicas, T. I., Norris, F. H., O'Gara, M. J., Peery, R. B., Robertson, G. T., Rockey, P., Ming Sun, P., Winkler, M. E., Yang, Y., Young-Bellido, M., Zhao, G., Zook, C. A., Baltz, R. H., Jaskunas, S. R., Rosteck Jr., P. R., Skatrud, P. L. & Glass, J. I. (2001).** Genome of the Bacterium *Streptococcus pneumoniae* Strain R6. *J Bacteriol* **183**, 5709-5717.
58. **Itoh, Y., Kawamura, Y., Kasai, H., Monir Shah, M., Nhung, P. H., Yamada, M., Sun, X., Koyana, T., Hakashi, M., Oskusu, K. & Ezaki, T. (2006).** dnaJ and gyrB gene sequence relationship among species and strains of genus *Streptococcus*. *Syst Appl Microbiol***29**, 368-374.
59. **Ji Y., Schnitzler, N., Demaster, E. & Cleary, P. (1998).** Impact of M49, Mrp, Enn, and C5a Peptidase Proteins on Colonization of the Mouse Oral Mucosa by *Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun***66**, 5399–5405.
60. **Kawamura, Y., Hou, X., Sultana, F., Miura, H. & Ezaki, T. (1995).** Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and Phylogenetic relationships among members of the Genus *Streptococcus*. *Int J Syst Bacteriol***45**, 406-408.
61. **Kawamura, Y., Hou, X., Todome, Y., Sultana, F., Hirose, K., Shu, S. E., Ezaki, T. & Ohkuni, H. (1998).** *Streptococcus peroris* sp. nov. and *Streptococcus infantis* sp. nov., new members of the *Streptococcus mitis* group, isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol***48**, 921-927.
62. **Keith, E. R., Podmore, R. G., Anderson, T. P. & Murdoch, D. R. (2006).** Characteristics of *Streptococcus pseudopneumoniae* Isolated from Purulent Sputum Samples. *J Clin Microbiol* **44**, 3923-3927.
63. **Knudson, K. (2007).** La influencia de Tiwanaku en San Pedro de Atacama: Una investigación utilizando el análisis de isótopos del estroncio. *Estudios Atacamenos: Arqueología y Antropología Surandinas***33**,7-24.
64. **Knudson, K. & Price, D. (2007).** Utility of multiple chemical techniques in Archaeological Residential mobility studies: Case studies from Tiwanaku- and Chiribaya-Affiliated sites in the Andes. *American Journal of Physical Anthropology* **132**, 25-39.
65. **Koo, H., Pearson, S. K., Scott-Anne, K., Abranches, J., Cury, J. A., Rosalen, P. L., Park, Y. K., Marquis, R. E. & Bowen, W. H. (2002).** Effects of apigenin and *tt*-farnesol on glucosyltransferase activity, biofilm viability and caries development in rats. *Oral Microbiol Immunol***17**, 337-343.
66. **Lal, D., Verma, M. & Lal, R. (2011).** Exploring internal features of 16S rRNA gene for identification of clinically relevant species of the genus *Streptococcus*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob***10**:28.

67. Lambert, B., Simpson, S., Szpunar, C., Buikstra, J. E. (1984). Ancient human diet from inorganic analysis of bone. *Acc. Chem. Res*, **17**, 298-305.
68. Lau, S., Woo, P. C. Y., Tse, H., Leung, K. W., Wong, S. & Yuen, K. Y. (2003). Invasive *Streptococcus iniae* Infections Outside North America. *J Clin Microbiol***41**, 1004-1009.
69. Lawson, P. A., Foster, G., Falsen, E., Davison, N. & Collins, M. D. (2004). *Streptococcus halichoeri* sp. nov., isolated from grey seals (*Halichoerus grypus*). *Int J Syst Evol Microbiol***54**, 1753-1756.
70. Lawson, P.A., Foster, G., Falsen, E., Collins, M. D. (2005). *Streptococcus marimammalium* sp. nov., isolated from seals. *Int J Syst Evol Microbiol***55**, 271-274.
71. Lawson, P. A., Foster, G., Falsen, E., Markopoulos, S. J. & Collins, M. D. (2005). *Streptococcus castoreus* sp. nov., isolated from a beaver (*Castor fiber*). *Int J Syst Evol Microbiol***55**, 843–846.
72. Lee-Thorp, J. A. (2008). On Isotopes and Old Bones. *Archaeometry*, **50**: 925–950.
73. Leigh, J.A. (1999). *Streptococcus uberis*: A Permanent Barrier to the Control of Bovine Mastitis?. *Vet J* **157**, 225–238.
74. Liébana Ureña, J. (1995). Microbiología Oral. Interamericana-McGraw-Hill. Madrid.
75. Lieveerse, A. R. (1999). Diet and the aetiology of dental calculus. *Int J Osteoarchaeol* **9** 219-232.
76. Linossier, A., Aspillaga, E., & Gajardo, M. (1988). Hallazgo de bacterias comensales de la cavidad oral en tártaro dental de restos óseos de indígenas Chonos. *Revista Chilena de Antropología*. **7**, 123-128.
77. Linossier, A., Gajardo, M., & Olavarria, J. (1996). Paleomicrobiological study in dental calculus: *Streptococcus mutans*. *Scanning Microscopy*, **10(4)**, 1005–13.
78. Lynn, P., Camus, A. C., Bailiff, T., Steigerwalt, A. G., Morey, R. E. & da Glória S. Carvalho, M. (2007). *Streptococcus ictaluri* sp. nov., isolated from Channel Catfish *Ictalurus punctatus* broodstock. *Int J Syst Evol Microbiol***57**, 1603-1606.
79. Mahlen, S., Mahlen, D. & Clarridge, J. E. (2009). Thumb Infection Caused by *Streptococcus pseudoporcinus*. *J Clin Microbiol***47**, 3041–3042.
80. Manachini, P. L., Flint, S. H., Ward, L. J. H., Kelly, W., Fortina, M. G., Parini, C. & Mora, D. (2002). Comparison between *Streptococcus macedonicus* and *Streptococcus waius* strains and reclassification of *Streptococcus waius* (Flint et al. 1999) as *Streptococcus macedonicus* (Tsakalidou et al. 1998). *Int J Syst Evol Microbiol***52**:945-951.
81. Marri, P. R., Hao, W. & Golding, G. B. (2006). Gene gain and gene loss in *Streptococcus*: Is it driven by habitat?. *Molecular Biology and Evolution***23**, 2379-2391.
82. Matta, M., Gousseff, M., Monsel, F., Poyart, C., Diebold, B., Podglajen, I. & Mainardi, J. L. (2009). First Case of *Streptococcus oligofermentans* Endocarditis Determined Based on *sodA* Gene Sequences after Amplification Directly from Valvular Samples. *J Clin Microbiol***47**, 855-856.
83. Matthys, C., Clays, G., Verschraegen, G., Wauters, G., Vogelaers, D., de Baere, T., Verhelst, R., van Nooten, G., van Coster, R. & Vanechoutte, M. (2006). *Streptococcus cristatus* isolated from a resected heart valve and blood cultures: case reports and application of phenotypic and genotypic techniques for identification. *Acta Clin Belg***61**, 196-200.
84. Menon, T., Nandhakumar, B., Jaganathan, V., Shanmugasundaram, S., Malathy, B. & Nisha, B. (2008). Bacterial endocarditis due to Group C streptococcus. *J Postgrad Med* **54**, 64-65.
85. Milinovich, G. J., Burrell, P. C., Pollitt, C. C., Bouvet, A. & Trott, D. J. (2008). *Streptococcus henryi* sp. nov. and *Streptococcus caballi* sp. nov., isolated from the

- hindgut of horses with oligofructose-induced laminitis. *Int J Syst Evol Microbiol* 58, 262-266.
86. Mills, J., Bryce, D. & Williamson, E. (2010). Wound Infection by *Streptococcus merionis* following a Hamster Bite. *Clin Microbiol News* 32, 116-117.
87. [Name], M. & García-Arenzana, J. (2007). Género *Streptococcus*: una revisión práctica para el laboratorio de microbiología. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 25, 14-20.
88. Morano, S., y Bucarey, S. (2009). Estudio de las piezas dentales del individuo N°1 del Alero "Ernesto Marfilo-1", Región de los Ríos, Chile. *Magallania* [online]. 37(1)37-45.
89. Morita, E., Narikiyo, M., Yokoyama, A., Yano, A., Kamoi, K., Yoshikawa, E., Yamaguchi, T., Igaki, H., Tachimori, Y., Kato, H., Saito, D., Hanada, N. & Sasaki, H. (2005). Predominant presence of *Streptococcus anginosus* in the saliva of alcoholics. *Oral Microbiol Immunol* 20, 362-365.
90. Musser, J. M., Gray, B. M., Schlievert, P. M. & Pichichero, M. E. (1992). *Streptococcus pyogenes* pharyngitis: characterization of strains by multilocus enzyme genotype, M and T protein serotype, and pyrogenic exotoxin gene probing. *J Clin Microbiol* 30, 600-603.
91. Nagata, E., Okayama, H., Ito, H.-O., Semba, I., Inoue, M. & Oho, T. (2005). Experimental infective endocarditis induced by human supragingival dental plaque in rats. *Eur J Oral Sci* 113, 499-504.
92. Nishio, J., Taniguchi, M., Higashi, J., Takahashi, M., Ando, T., Hasegawa, T. & Igarashi, T. (2012). Rapid detection and identification of *Streptococcus rattii* by a species-specific PCR method. *Anaerobe* 18, 44-47.
93. Núñez, L. y Hall, J. (1982). Análisis de dieta y movilidad en un campamento arcaico en el norte de Chile. *Bulletin de l'Institut Français d'Etudes Andines* 11 (3-4): 90-113.
94. Núñez, L. y Moragas, C. (1977). Una ocupación con cerámica temprana en la secuencia del distrito de Cádiz (costa desértica del norte de Chile). *Estudios Atacameños* 5:21-49.
95. Nylander, J. A. (2004). MrModeltest v2. Program distributed by the Author. *Evolutionary Biology Centre*. Uppsala University.
96. Panarello, H., Zangrando A.F., Tessone A., Kozameh L.F., Testa N. (2006). Análisis comparativo de paleodietas humanas entre la región del canal Beagle y Península Mitre: perspectivas desde los isótopos estables. *Magallania* 34(2): 37-46.
97. Pellizzer, G., Benedetti, P., Biavasco, F., Manfrin, V., Franzetti, M., Scagnelli, M., Scarparo, C. & de Lalla, F. (1996). Bacterial endocarditis due to *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: case report. *Clin Microbiol Infect* 2, 230-232.
98. Philippe, H & C. J. Douady (2003). Horizontal gene transfer and phylogenetics. *Curr Opin Microbiol* 6,498-505.
99. Pombert, J. F, Sistek, V., Boissinot, M. & Frenette, M. (2009). Evolutionary relationships among salivarius streptococci as inferred from multilocus phylogenies based on 16S rRNA-encoding, recA, secA, and secY gene sequences. *BMC Microbiol* 9: 232.
100. Posada, D. & Crandall K. A. (1998). Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14, 817-818.
101. Preziuso, S., Laus, F., Romero, A., Valente, C. & Cuteri, V. (2010). Detection of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* in equine nasopharyngeal swabs by PCR. *J Vet Sci* 11, 67-72.
102. Rantala, S., Vähäkuopus, S., Vuopio-Varkila, J., Vuento, R. & Syrjänen, J. (2010). *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *Equisimilis* Bacteremia, Finland, 1995-2004. *Emerg Infect Dis* 16, 843-846.

103. **Rautray, T., Das, S., Rautray, A. C. (2010).** In situ analysis of human teeth by external PIXE". *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* **268**, 2371–2374.
104. **Reyes, O. & Méndez, C. (2010).** Precisando la cronología para la inhumación tipo chenque, valle del río Cisnes (Aisén, Chile), Patagonia Central. *Magallania*, 38(2):97-102.
105. **Reyes, O., San Román & M., Moraga, M. (2011).** Archipiélago de los Chonos: nuevos registros arqueológicos y bioantropológicos en los canales septentrionales. Isla Traiguén, Región de Aisén. *MAGALLANIA* (Chile) **39**(2):293-301
106. **Rezende, E. & Garland, T. (2003).** Comparaciones interespecíficas y métodos estadísticos filogenéticos. En: *Fisiología Ecológica y Evolutiva*, Francisco Bozinovis (Ed.). Ediciones Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. Pp 79-98.
107. **Rinkinen, M. L., Koort, J. M., Ouweland, A. C., Westmarck, E. & Björkroth, K. J. (2004).** *Streptococcus alactolyticus* is the dominating culturable lactic acid bacterium species in canine jejunum and feces of four fistulated dogs. *FEMS Microbiol Lett* **230**, 35–39.
108. **Roca, B. & Ardasnal, L. H. (2000).** Endocarditis por *Streptococcus agalactiae*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **20**, 77-78.
109. **Rodicio, M. & Mendoza, M. C. (2004).** Identificación Bacteriana mediante Secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en Microbiología Clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **22**, 238-245.
110. **Rodríguez, A., González, C. y Henríquez, M. (2004).** AAarqueología Histórica en la Parroquia de la Purísima Concepción de Colina: Región Metropolitana. *Chungará (Arica)*, **36**, 117-129.
111. **Rurangirwa, F. R., Teitzel, C. A., Cui, J., French, D. M., McDonough, P. L. & Besser, T. (2000).** *Streptococcus didelphis* sp. nov., a streptococcus with marked catalase activity isolated from opossums (*Didelphis virginiana*) with suppurative dermatitis and liver fibrosis. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**, 759–765.
112. **Ruvalcaba-Sil. (2001).** Aplicaciones de PIXE al estudio de muestras de interés biológico. *TIP Revista especializada en Ciencias Químico-Biológicas* **4** (2), 93-99.
113. **Safont, S., Malgosa A., Subirà M.E. y Gibert J. (1998)** Can trace elements in fossils provide information about palaeodiet?. *International Journal of Osteoarchaeology* **8**, 23–27.
114. **Sandford, M.A. (1992).** A reconsideration of trace element analysis in prehistoric bone. En: *Saunders and Katzenberg (eds.): Skeletal Biology of Past Peoples: Research Methods*. Wiley-Liss, New York:79-103.
115. **Santana, F. (2011 Ms)** Multiculturalidad en el Cementerio Oriente de Quillagua ¿Co-existencia de grupos culturales? Una aproximación desde la bioantropología mediante análisis isotópicos de dieta y movilidad en el curso inferior del río Loa, Período Intermedio Tardío. **Memoria para optar al Título de Antropóloga Física, Universidad de Chile.**
116. **Satué-Bartolomé, J. A. & Alonso-Sanz, M. (2009).** *Streptococcus gallolyticus*: un nuevo nombre para un viejo conocido. *Archivos de Medicina* **5**, 1.
117. **Schlegel, L., Grimont, F., Collins, M. D., Régnault, B., Grimont, P. A. D. & Bouvet, A. (2000).** *Streptococcus infantarius* sp. nov., *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* subsp. nov. and *Streptococcus infantarius* subsp. *coli* subsp. nov., isolated from humans and food. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**, 1425–1434.
118. **Sechi, L. A & Ciani, R. (2000).** *Streptococcus equinus* Endocarditis in a Woman With Pulmonary Histiocytosis. *JAMA* **283**, 1005.

119. **Senses, Z., Yokusoglu, M., Savas Oz, B., Uskudar, A., Erdem, H., Baysan, O., & Baysallar, M. (2008).** A rare pathogen causing endocarditis: *Streptococcus constellatus*/Endokardite neden olan ender hir patojen: *Streptococcus constellatus*" *Anadolu Kardiyol Derg.*
120. **Shinozaki-Kuwahara, N., Takada, K. & Hirasawa, M. (2011).** *Streptococcus ursoris* sp. nov., isolated from the oral cavities of bears. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**, 40-44.
121. **Simmon, K. E., Hall, L., Woods, C. W., Marco, F., Miro, J. M., Cabell, C., Hoen, B., Marin, M., Utili, R., Giannitsioti, E., Doco-Lecompte, T., Bradley, S., Mirrett, S., Tambic, A., Ryan, S., Gordon, D., Jones, P., Korman, T., Wray, D., Reller, L. B., Tripodi, M. F., Plesiat, P., Morris, A. J., Lang, S., Murdoch, D. R., Petti C. A. & The International Collaboration on Endocarditis Microbiology (ICE-Micro) Investigators. (2008).** Phylogenetic Analysis of Viridans Group Streptococci Causing Endocarditis. *J Clin Microbiol* **46**, 3087-3090.
122. **Sommer, P., Gleyzal, C., Guerret, S., Etienne, J. & Grimaud, J. A. (1992).** Induction of a Putative Laminin-Binding Protein of *Streptococcus gordonii* in Human Infective Endocarditis. *Infect Immun* **60**, 360-365.
123. **Staats, J. J., Feder, I., Okwumabua, O. & Chengappa, M.M. (1997).** *Streptococcus suis*: Past and Present. *Vet Res Commun* **21**, 381-407.
124. **Standen, V. y Sanhueza, J. (1984).** Análisis antropológico físico del cementerio Mocha 2 (norte de Chile, I Región). *Estudios Atacameños* **7**: 237-242
125. **Szostek, K., Glab, H., Szczepanek, A. y Kaczanowski, K. (2003).** Trace element analysis of Bronze Age skeletal and crematory graves from Southern Poland for diet reconstruction. *HOMO - Journal of Comparative Human Biology* **53(3)** 235-246-.
126. **Takada, K. & Hirasawa, M. (2007).** *Streptococcus orisuis* sp. nov., isolated from the pig oral cavity. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 1272-1275.
127. **Takada, K., & Hirasawa, M. (2008).** *Streptococcus dentirousetti* sp. nov., isolated from the oral cavities of bats. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 160-163.
128. **Takada, K., Hayashi, K., Sato, Y. & Hirasawa, M. (2009).** *Streptococcus dentapri* sp. nov., isolated from the wild boar oral cavity. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 820-823.
129. **Täpp, J., Thollesson, M. & Herrmann, B. (2003).** Phylogenetic relationships and genotyping of the genus *Streptococcus* by sequence determination of the RNase P RNA gene, rnpB. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 1861-1871.
130. **Tappe, D., Pukall, R., Schumann, P., Gronow, S., Spiliotis, M., Claus, H., Brehm K. & Vogel, U. (2009).** *Streptococcus merionis* sp. nov., isolated from Mongolian jirds (*Meriones unguiculatus*). *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 766-770.
131. **Tessone, A., Zangrando, A. F., Valencio, S. & Panarello, H. (2003).** Isótopos estables del carbono en restos óseos humanos de la región del Canal Beagle, Isla Grande de Tierra del Fuego. *Revista Argentina De Antropología Biológica* **5 (2)**: 33-43.
132. **Tieszen, L.L., Iversen, E. y Matzner, S. (1992).** Dietary reconstruction based on carbon, nitrogen and sulfur stable isotopes in the Atacama desert, Northern Chile. *Proceedings of the First World Congress on Mummy Studies. Museo Arqueológico y Etnográfico de Tenerife, Cabildo de Tenerife. Tomo I*: 427-441.
133. **Tong, H., Gao, X. & Dong, X. (2003).** *Streptococcus oligofermentans* sp. nov., a novel oral isolate from caries-free humans. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 1101-1104.
134. **Tran, M. A. P, Caldwell-McMillan, M., Khalife, W. & Young, V. B. (2008).** *Streptococcus intermedius* causing infective endocarditis and abscesses: a report of three cases and review of the literature. *BMC Infect Dis* **8**, 154.



135. **Tsakalidou, E., Zoidou, E. & Kalantzopoulos, G. (1992).** Esterase activities of cell-free extracts from strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolated from traditional Greek cheese. *J Dairy Res* **59**, 111-113.
136. **Turt, A. S., Yang, L., Sandhu, K., Pei, Z., Cassai, N. & Blaser, M. J. (2010).** *Streptococcus gallolyticus* Subspecies *pasteurianus* (Biotype II/2), a Newly Reported Cause of Adult Meningitis. *J Clin Microbiol* **48**, 2247-2249.
137. **Tykot, R., van der Merwe, N. & Hammond, N. (1996).** "Stable isotope analysis of bone collagen and apatite in the reconstruction of human diet: a case study from Cuello, Belize" [En: Archaeological Chemistry. Organic, Inorganic and Biochemical Analysis. Ed. by M.V. Orna, ACS Symposium Series 625, Washington, DC: American Chemical Society pp. 355-365.](#)
138. **Ueda, S., Honma, S., Kanno, A., Okinaka, M., Kikuchi, N. & Takahashi, T. (2007).** *Streptococcus seminale* sp. nov., isolated from bull semen. (as of 10 December 2007)" (UNPUBLISHED)
139. **van der Linden, M., Al-Lahham, A., Nicklas, W., René Reinert, R. (2009).** Molecular Characterization of Pneumococcal Isolates from Pets and Laboratory Animals. *PLoS One* **4**, e8286.
140. **Vancanneyt, M., Devriese, L. A., De Graef, E. M., Baele, M., Lefebvre, K., Snauwaert, C., Vandamme, P., Swings, J. & Haesebrouck, F. (2004).** *Streptococcus minor* sp. nov., from faecal samples and tonsils of domestic animals. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 449-452.
141. **Vela, A. I., Fernández, E., Lawson, P. A., Latre, M. V., Falsen, E., Domínguez, L., Collins, M. D. & Fernández-Garayzábal, J. F. (2002).** *Streptococcus entericus* sp. nov., isolated from cattle intestine. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 665-669.
142. **Vela, A. I., Casamayor, A., Sánchez del Rey, V., Domínguez, L. & Fernández-Garayzábal, J. F. (2009).** *Streptococcus plurextorum* sp. nov., isolated from pigs. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 504-508.
143. **Vela, A. I., Perez, M., Zamora, L., Palacios, L., Domínguez L. & Fernández-Garayzábal, J. F. (2010).** *Streptococcus porci* sp. nov., isolated from swine sources. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 104-108.
144. **Viscount, H. B., Munro, C. L., Burnette-Curley, D., Peterson, D. L. & Macrina, F. L. (1997).** Immunization with FimA protects against *Streptococcus parasanguis* endocarditis in rats. *Infect Immun* **65**, 994-1002.
145. **Whatmore, A. M., Efstratiou, A., Pickerill, A. P., Broughton, K., Woodard, G., Sturgeon, D., George R. & Dowson, C. G. (2000).** Genetic Relationships between Clinical Isolates of *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus oralis*, and *Streptococcus mitis*: Characterization of "Atypical" Pneumococci and Organisms Allied to *S. mitis* Harboring *S. pneumoniae* Virulence Factor-Encoding Genes. *Infect Immun* **68**, 1374-1382.
146. **Whatmore, A. M., Engler, K. H., Gudmundsdottir G. & Efstratiou, A. (2001).** Identification of Isolates of *Streptococcus canis* Infecting Humans. *J Clin Microbiol* **39**, 4196-4199.
147. **Whiley, R. A., Russel, R. R. B., Hardie, J. M. & Beighton, D. (1988).** *Streptococcus downei* sp. nov. for Strains Previously Described as *Streptococcus mutans* Serotype h. *Int J Syst Evol Microbiol* **38**, 25-29.
148. **Whiley, R. A., Fraser, H., Hardie, J. M., & Beighton, D. (1990).** Phenotypic Differentiation of *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus constellatus*, and *Streptococcus anginosus* Strains within the "Streptococcus milleri Group". *J Clin Microbiol* **28**, 1497-1501.

149. **Whiley, R. A., Beighton, D., Winstanley, T. G., Fraser, H. Y. & Hardie, J. M. (1992).** *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus constellatus*, and *Streptococcus anginosus* (the *Streptococcus milleri* group): association with different body sites and clinical infections. *J Clin Microbiol***30**, 243-244.
150. **White, C. D, Storey, R. , Longstaffe, F. J. y Spence, M. W. (2004).** Immigration, assimilation, and status in the Ancient City of Teotihuacan: Stable Isotopic evidence from Tlajinga 33. *Latin American Antiquity*.**15(2)**, 176-198.
151. **Wiens, J. & Moen, D. S. (2008).** Missing data and the accuracy of Bayesian phylogenetics. *J Syst Evol***46** , 307–314.
152. **Willcox, M. D. P, Zhu, H. & Knox, K. W. (2001).** *Streptococcus australis* sp. nov., a novel oral *Streptococcus*. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 1277–1281.
153. **Wilson, M., Martin, R., Walk, S. T., Young, C., Grossman, S., Lin McKean, E. & Aronoff, D. M. (2012).** Clinical and Laboratory Features of *Streptococcus salivarius* Meningitis: A Case Report and Literature Review. *Clin Med Res***10**, 15-25.
154. **Woo, P. C. Y., Tam, D. M. W., Leung, K. W., Lau, S. K. P., Teng, J. L. L., Wong, M. K. M. & Yuen, K.Y. (2002).** *Streptococcus sinensis* sp. nov., a Novel Species Isolated from a Patient with Infective Endocarditis. *J Clin Microbiol***40**, 805-810.
155. **Woo, P.C., Teng, J.L., Tsang, S.N., Tse, C.W., Lau, S.K. & Yuen, K.Y. (2008).** The oral cavity as a natural reservoir for *Streptococcus sinensis*. *Clin Microbiol Infect***14**, 1075-1079.
156. **Yesner, D., Figuerero Torres, M. J., Guichón, R. A. & Borrero, L. A. (2003).** Stable isotope analysis of human bone and ethnohistoric subsistence patterns in Tierra del Fuego. *Journal of Anthropological Archaeology* **22**: 279-291.
157. **Yin, J., Yu, S., Liu, X., Li, Y., Gao, W., Zhou, L., Ji, L., Shen, Z. & Yang, Y. (2012).** Molecular characterization of group G *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* recovered from patients and healthy people in China. *Diagn Microbiol Infect Dis* **72**, 41–46.
158. **Yoo, S. Y., Kim, K. J., Lim, S. H., Kim, K. W., Hwang, H. K., Min, B. M., Choe, S. J. & Kook, J. K. (2005).** First isolation of *Streptococcus downei* from human dental plaques. *FEMS Microbiol. Lett.* **249**, 323-326.
159. **Yoshida, A., Suzuki, N., Nakano, Y., Kawada, M., Oho, T. & Koga, T. (2003).** Development of a 5' Nuclease-Based Real-Time PCR Assay for Quantitative Detection of Cariogenic Dental Pathogens *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *J Clin Microbiol***41**, 4438–444.
160. **Zhu H., M. D. P. Willcox and K. W. Knox. (2000).** A new species of oral *Streptococcus* isolated from Sprague–Dawley rats, *Streptococcus orisratti* sp. Nov. *Int J Syst Evol Microbiol***50**:55–61.

ANEXOS. Fig. A1. Árbol de consenso obtenido de análisis bayesiano al fragment proteico del gen *sodA*, usando el modelo de evolución proteica WAG (según el programa ProtTest).

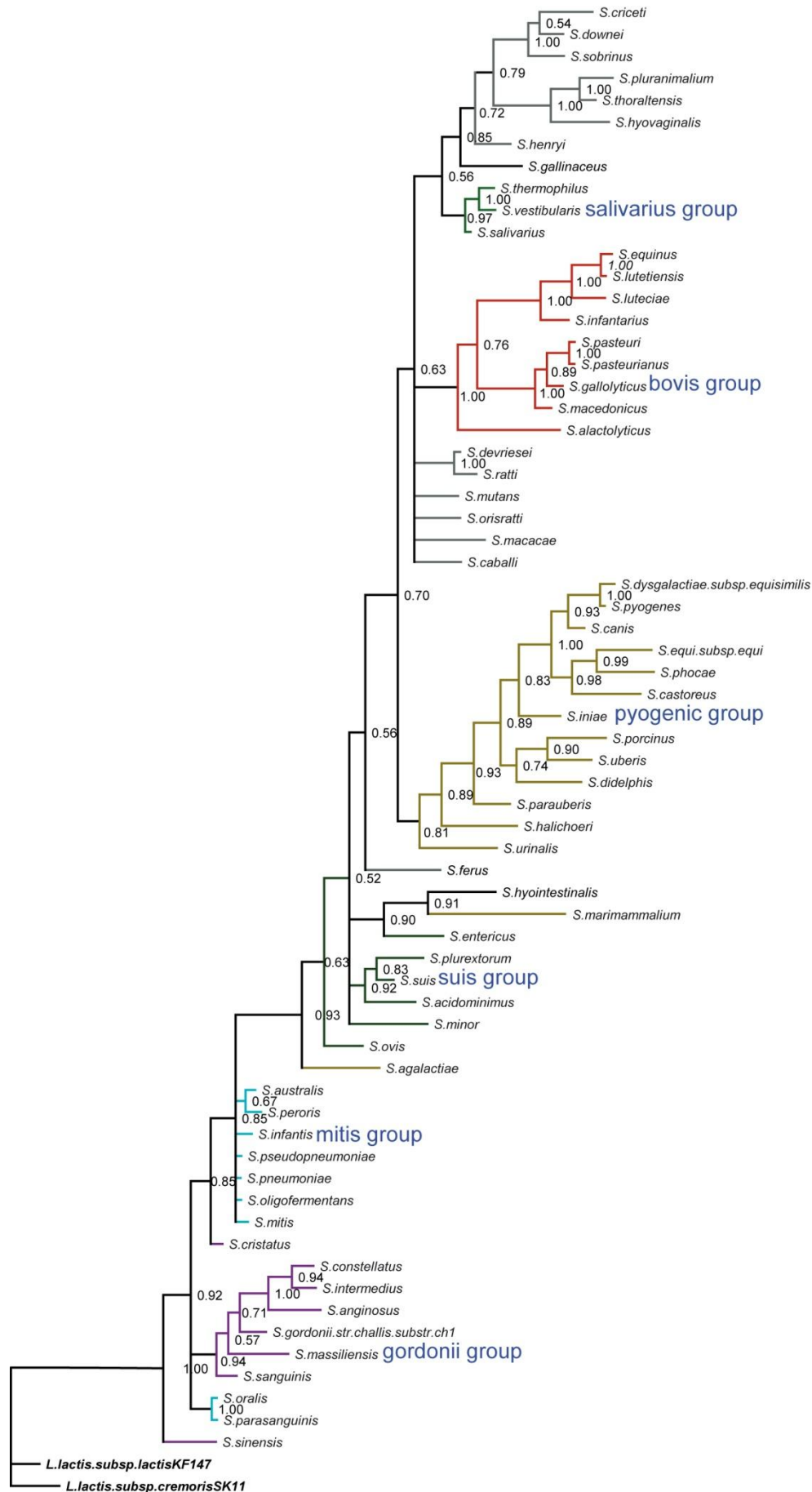


Fig. A2. . Árbol de consenso obtenido de análisis bayesiano al fragment proteico del gen tuf, usando el modelo de evolución proteica Rtrev (según el programa ProtTest).

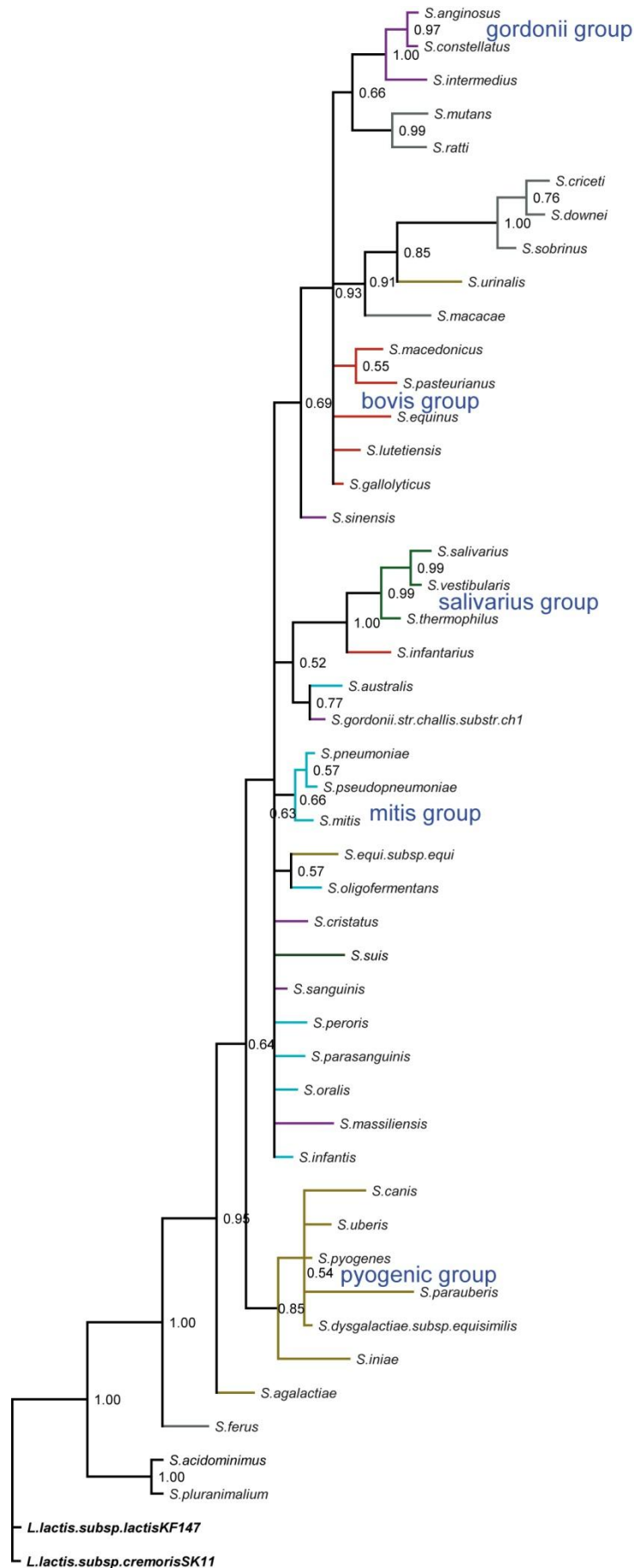


Fig. A3. Árbol de consenso obtenido de análisis bayesiano al fragment proteico del gen *rpoB*, usando el modelo de evolución proteica Rtrev (según el programa ProtTest).

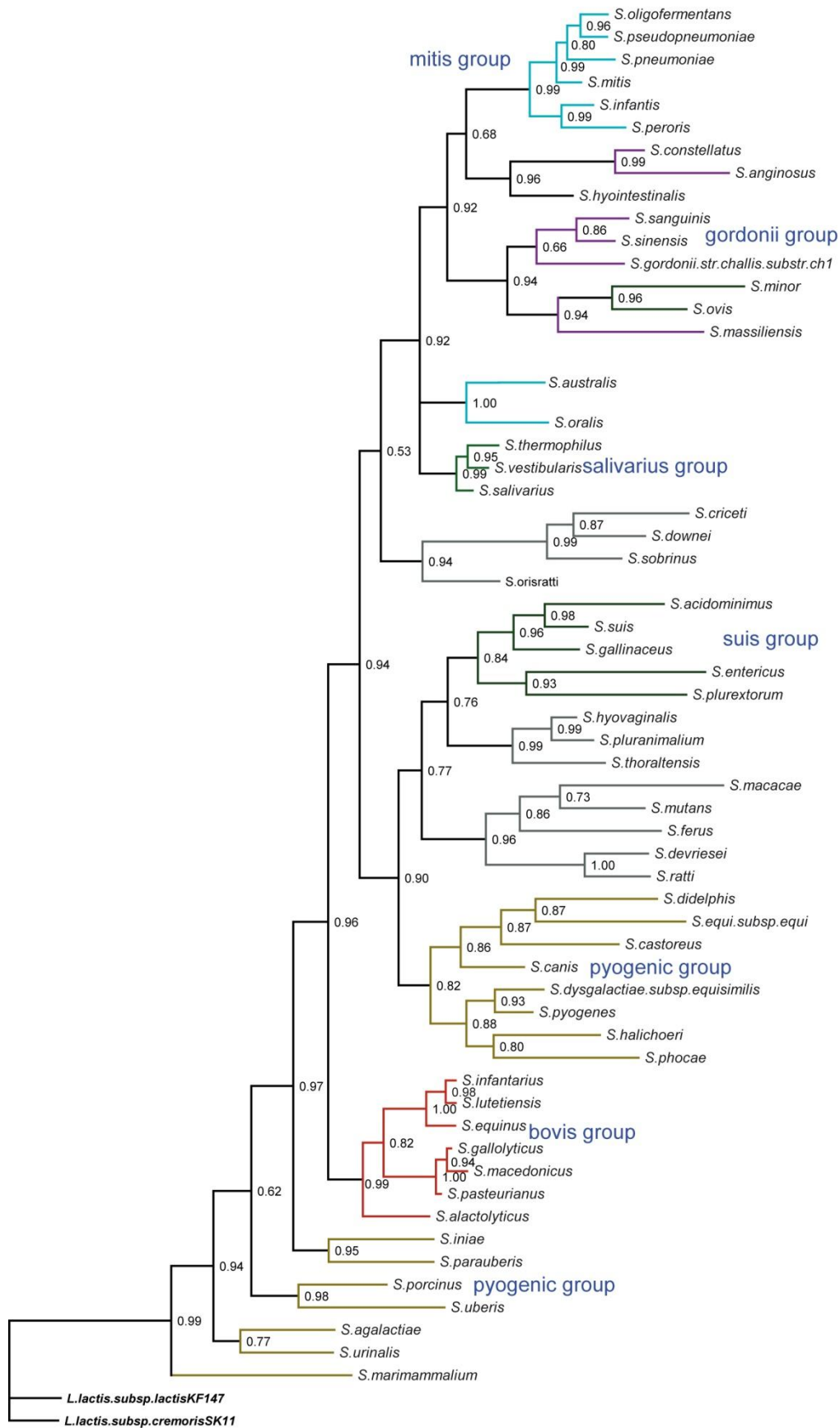


Fig. A4. Árbol de consenso obtenido de análisis bayesiano al fragment proteico del gen dnaJ, usando el modelo de evolución proteica WAG (según el programa ProtTest).

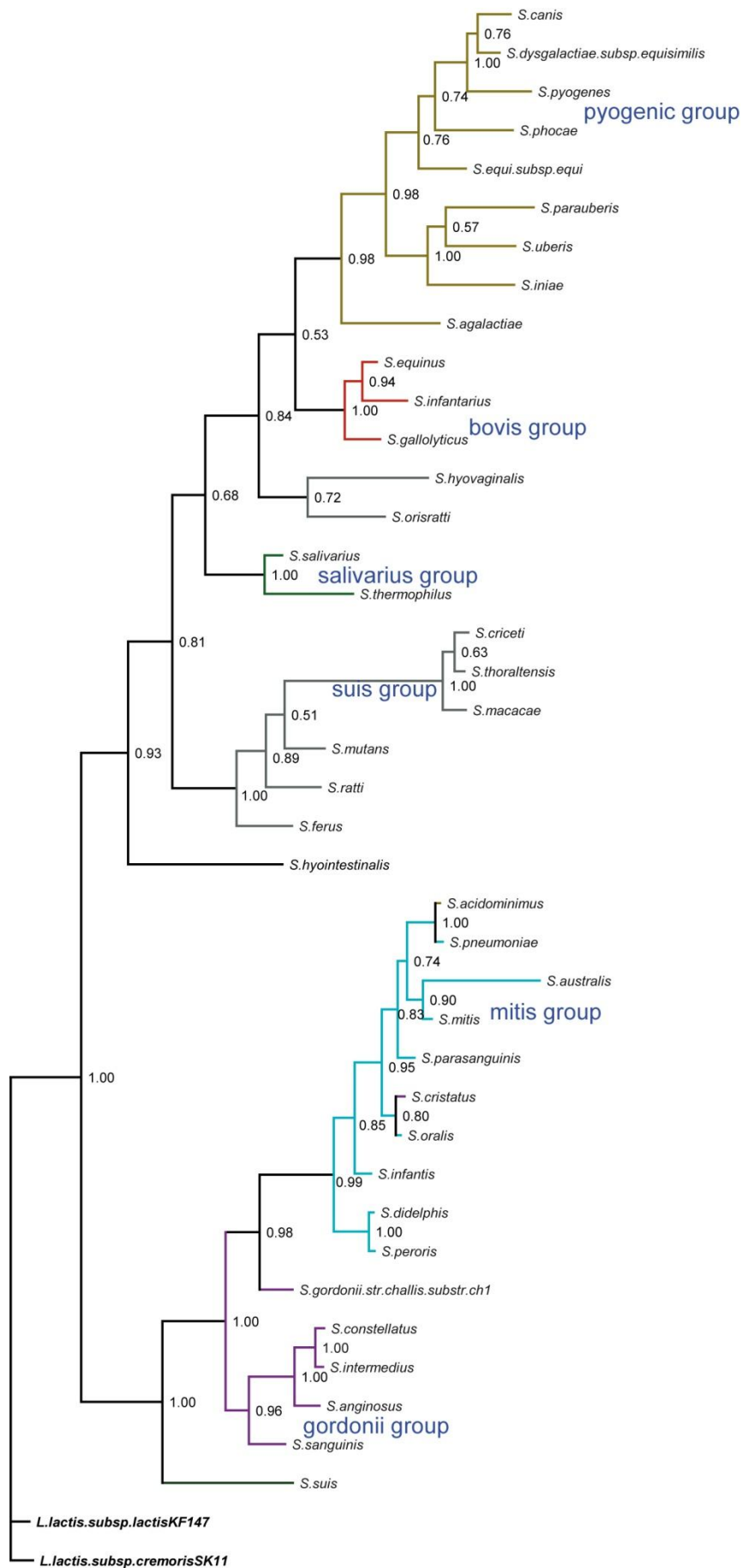


Fig. A5. Árbol de consenso obtenido de análisis bayesiano al fragment proteico del gen *gyrB*, usando el modelo de evolución proteica Rtrev (según el programa ProtTest ).

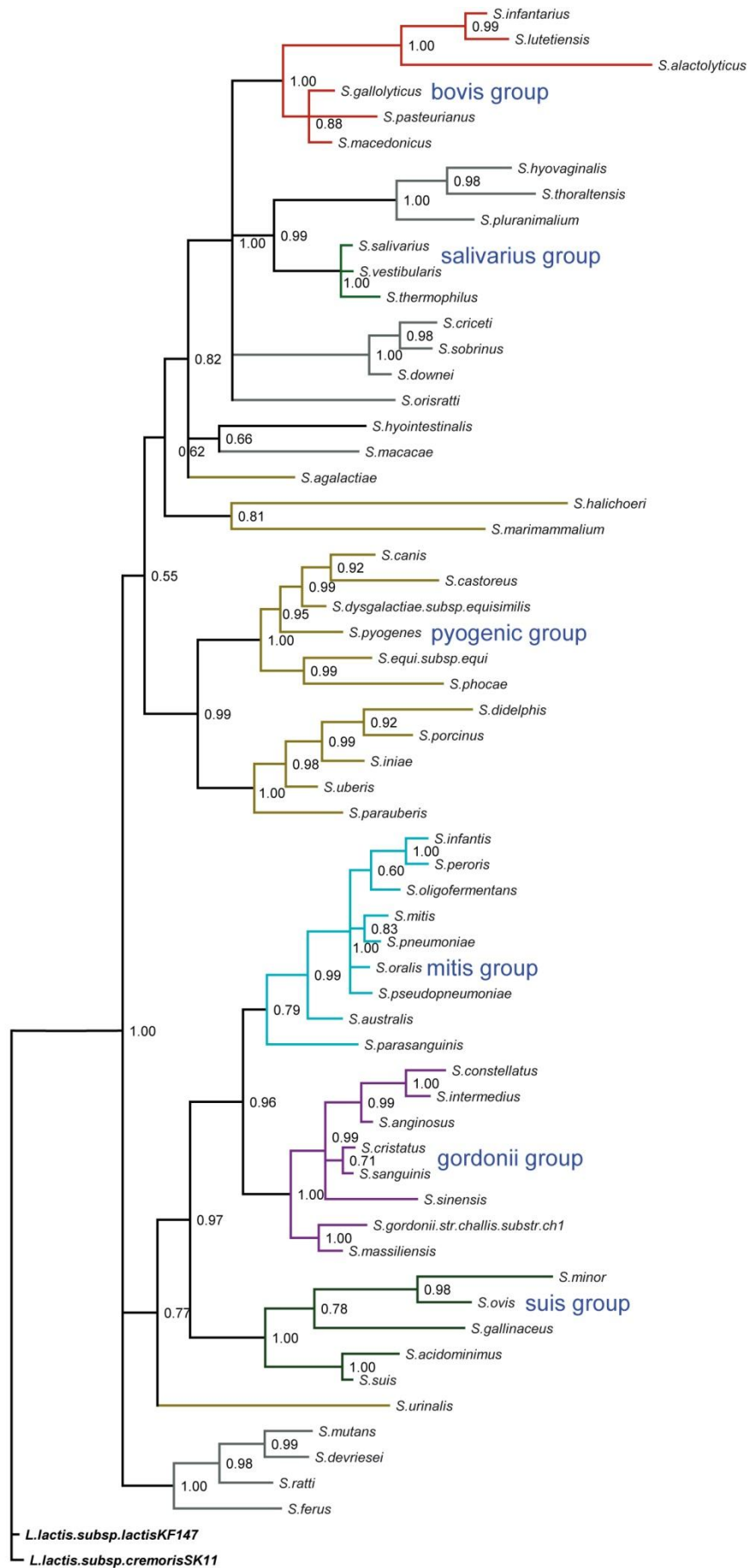
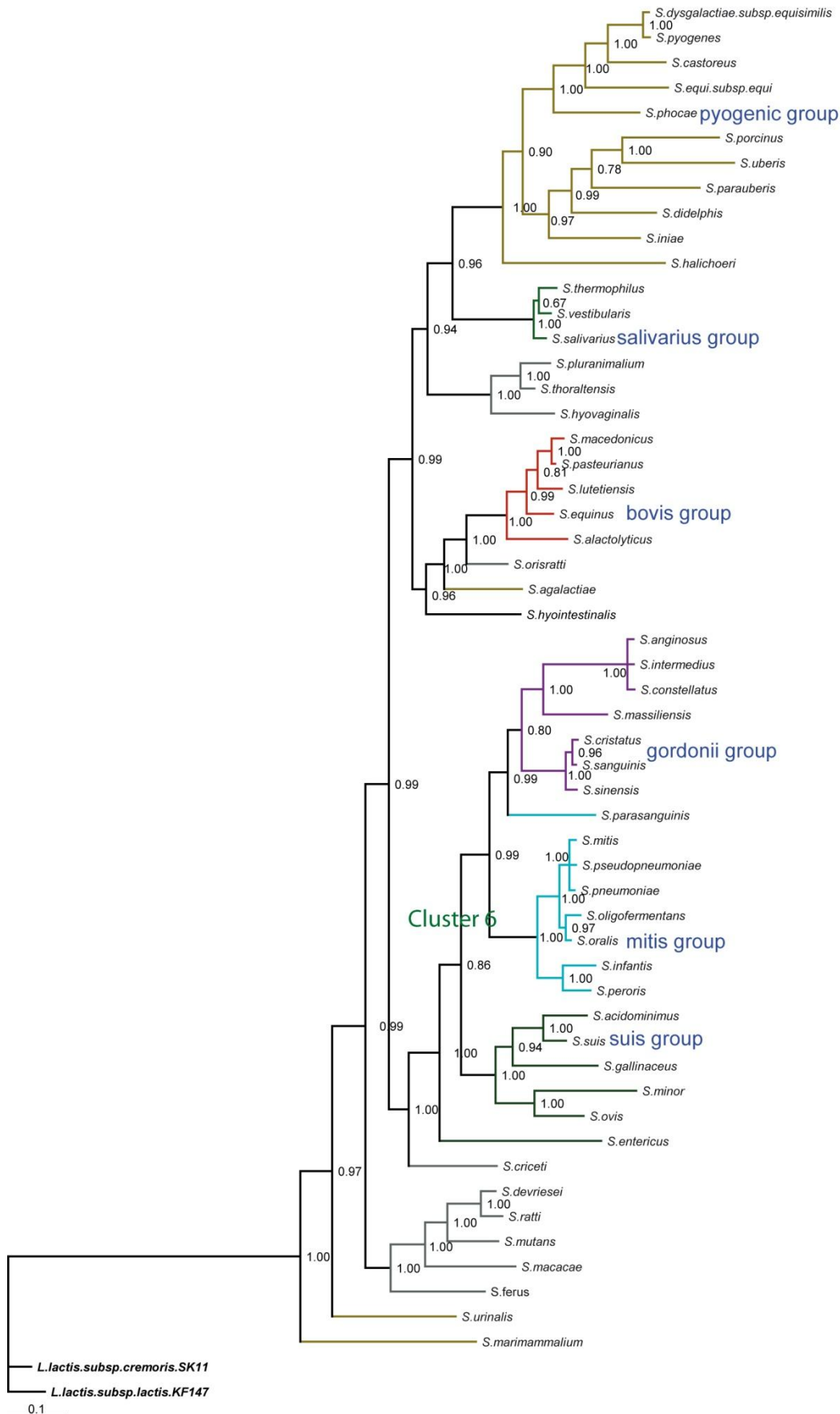


Fig. A6. Árbol de consenso obtenido de un análisis bayesiano al fragmento proteico del gen recN, usando el modelo de evolución proteico Jones (según el programa ProtTest)





Resultado de concentraciones. DIENTES

Tabla A1. Resultados irradiación muestra J1 (individuo 24 años de edad, masculino). A=arriba, C=centro, U=abajo.

| Julio,2009    |        |        |        |        |        |        |         |         |         |
|---------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|---------|
| Muestra J1    | A1     | A2     | A3     | C1     | C2     | C3     | U1      | U2      | U3      |
| P [ppm]       | 2591,2 | 2497,3 | 1117,8 | 392,5  | 458,9  | 1120,7 | 53316,9 | 38687,4 | 42651,5 |
| Incerteza [%] | 6      | 6      | 12     | 35     | 31     | 15     | 1       | 1       | 1       |
| Incerteza_P   | 153    | 149    | 134    | 138    | 142    | 168    | 379     | 329     | 341     |
| CaKA [ppm]    | 274022 | 257201 | 225602 | 209478 | 227770 | 317813 | 939610  | 739385  | 791748  |
| Incerteza [%] | 0,2    | 0,2    | 0,3    | 0,3    | 0,2    | 0,2    | 0,1     | 0,1     | 0,1     |
| Incerteza_Ca  | 603    | 566    | 587    | 524    | 547    | 667    | 1128    | 961     | 1029    |
| FeKA [ppm]    | 1534,4 | 1439,3 | 1362,9 | 682    | 832,3  | 1153,5 | 3090,7  | 2732,3  | 2682,2  |
| Incerteza [%] | 3      | 3      | 4      | 6      | 5      | 5      | 2       | 3       | 3       |
| Incerteza_Fe  | 53     | 48     | 49     | 41     | 43     | 53     | 74      | 69      | 69      |
| CuK [ppm]     | 231,3  | 150,9  | 146,5  | 66     | 42,4   | 128,1  | 268,7   | 168,6   | 208,3   |
| Incerteza [%] | 12     | 16     | 18     | 34     | 57     | 24     | 14      | 20      | 16      |
| Incerteza_Cu  | 28     | 24     | 26     | 23     | 24     | 30     | 37      | 33      | 34      |
| ZnKA [ppm]    | 1016,9 | 769,8  | 823,3  | 626,1  | 685,5  | 984,5  | 1520,7  | 1315,9  | 1409,6  |
| Incerteza [%] | 4      | 4      | 4      | 5      | 5      | 4      | 3       | 3       | 3       |
| Incerteza_Zn  | 39     | 34     | 37     | 32     | 35     | 42     | 48      | 46      | 46      |
| SrK [ppm]     | 29,5   | 29,7   | 15,1   | 13     | 7,8    | 16,5   | 19,5    | 26,5    | 39,5    |
| Incerteza [%] | 27     | 24     | 46     | 52     | 91     | 56     | 56      | 43      | 28      |
| Incerteza_Sr  | 8      | 7      | 7      | 7      | 7      | 9      | 11      | 11      | 11      |
| PbL [ppm]     | 30,7   | 53,9   | 60,8   | 12,3   | 25,9   | 41     | 108,6   | 74,3    | 70,1    |
| Incerteza [%] | 40     | 22     | 22     | 93     | 55     | 43     | 16      | 24      | 24      |
| Incerteza_Pb  | 12     | 12     | 13     | 11     | 14     | 18     | 17      | 18      | 17      |

Tabla A2. Resultado de concentraciones. Muestras I1 e I2, valores promedio.

|           |          | Promedios e Incertezas |         | Promedios e Incertezas |         | Análisis Elemental |           |
|-----------|----------|------------------------|---------|------------------------|---------|--------------------|-----------|
|           |          | Muestra                | I1      | Muestra                | I1      | Relativo a Calcio  |           |
| Compuesto | Elemento | Compuesto              |         | Elemental              |         | Compuesto          | Elemental |
|           |          | Concent                | DesvStd | Concent                | DesvStd |                    |           |
| Al2O3     | Al       | 43618                  | 12906   | 26984                  | 1448    | 0,0575             | 0,0513    |
| SiO2      | Si       | 57393                  | 20931   | 31030                  | 9246    | 0,0756             | 0,059     |
| PO4       | P        | 98189                  | 7910    | 32187                  | 3627    | 0,1294             | 0,0612    |
| S         | S        | 6695                   | 2586    | 7231                   | 3413    | 0,0088             | 0,0138    |
| Cl        | Cl       | 2577                   | 709     | 2709                   | 950     | 0,0034             | 0,0052    |
| K2O       | K        | 7813                   | 4466    | 7407                   | 4733    | 0,0103             | 0,0141    |
| CaO       | Ca       | 758712                 | 44888   | 525704                 | 20378   | 1                  | 1         |
| Fe2O3     | Fe       | 9935                   | 8656    | 9156                   | 6640    | 0,0131             | 0,0174    |
| Cu2O      | Cu       | 142                    | 103     | 146                    | 120     | 0,0002             | 0,0003    |
| ZnO       | Zn       | 3474                   | 265     | 2892                   | 173     | 0,0046             | 0,0055    |
| Sr        | Sr       | 938                    | 256     | 1085                   | 18      | 0,0012             | 0,0021    |
| Ba        | Ba       | 1998                   | 1754    | 2971                   | 686     | 0,0026             | 0,0057    |
|           |          | Promedios e Incertezas |         | Promedios e Incertezas |         | Análisis Elemental |           |
|           |          | Muestra                | I2      | Muestra                | I2      | Relativo a Calcio  |           |
| Compuesto | Elemento | Compuesto              |         | Elemental              |         | Compuesto          | Elemental |
|           |          | Concent                | DesvStd | Concent                | DesvStd |                    |           |
| Al2O3     | Al       | 40926                  | 44870   | 8964                   | 12676   | 0,0549             | 0,0161    |
| SiO2      | Si       | 58821                  | 5317    | 27695                  | 3480    | 0,0789             | 0,0499    |
| PO4       | P        | 96788                  | 33569   | 25302                  | 2063    | 0,1298             | 0,0456    |
| S         | S        | 8637                   | 5236    | 11604                  | 1411    | 0,0116             | 0,0209    |
| Cl        | Cl       | 1199                   | 205     | 1239                   | 274     | 0,0016             | 0,0022    |
| K2O       | K        | 2785                   | 2465    | 3469                   | 596     | 0,0037             | 0,0062    |
| CaO       | Ca       | 745867                 | 55986   | 555172                 | 16482   | 1                  | 1         |
| Fe2O3     | Fe       | 14203                  | 4394    | 11624                  | 1327    | 0,019              | 0,0209    |
| Cu2O      | Cu       | 316                    | 294     | 421                    | 135     | 0,0004             | 0,0008    |
| ZnO       | Zn       | 8606                   | 1491    | 7485                   | 958     | 0,0115             | 0,0135    |
| Sr        | Sr       | 7872                   | 1465    | 8704                   | 375     | 0,0106             | 0,0157    |
| Ba        | Ba       | 948                    | 1641    | 0                      | 0       | 0,0013             | 0         |

Tabla A3. Resultado de concentraciones. Muestras I3, I4, I5, valores únicos.

| Muestra I3 |                     |          |                     | Análisis Elemental |           |
|------------|---------------------|----------|---------------------|--------------------|-----------|
|            |                     |          |                     | Relativo a Calcio  |           |
| Compuesto  | Concentración [ppm] | Elemento | Concentración [ppm] | Compuesto          | Elemental |
| Al2O3      | 0                   | Al       | 0                   | 0                  | 0         |
| SiO2       | 106440              | Si       | 49754               | 0,1397             | 0,0913    |
| PO4        | 120019              | P        | 39143               | 0,1575             | 0,0719    |
| S          | 0                   | S        | 0                   | 0                  | 0         |
| Cl         | 1853                | Cl       | 1853                | 0,0024             | 0,0034    |
| K2O        | 1315                | K        | 1092                | 0,0017             | 0,002     |
| CaO        | 762135              | Ca       | 544698              | 1                  | 1         |
| Fe2O3      | 2286                | Fe       | 1599                | 0,003              | 0,0029    |
| Cu2O       | 28                  | Cu       | 25                  | 0                  | 0         |
| ZnO        | 3565                | Zn       | 2864                | 0,0047             | 0,0053    |
| Sr         | 902                 | Sr       | 902                 | 0,0012             | 0,0017    |
| Ba         | 1513                | Ba       | 1513                | 0,002              | 0,0028    |
| Muestra I4 |                     |          |                     | Análisis Elemental |           |
|            |                     |          |                     | Relativo a Calcio  |           |
| Compuesto  | Concentración [ppm] | Elemento | Concentración [ppm] | Compuesto          | Elemental |
| Al2O3      | 36291               | Al       | 19207               | 0,0525             | 0,0389    |
| SiO2       | 130550              | Si       | 61024               | 0,1889             | 0,1236    |
| PO4        | 101950              | P        | 33250               | 0,1476             | 0,0673    |
| S          | 2071                | S        | 2071                | 0,003              | 0,0042    |
| Cl         | 970                 | Cl       | 970                 | 0,0014             | 0,002     |
| K2O        | 3052                | K        | 2534                | 0,0044             | 0,0051    |
| CaO        | 690925              | Ca       | 493804              | 1                  | 1         |
| Fe2O3      | 21229               | Fe       | 14849               | 0,0307             | 0,0301    |
| Cu2O       | 91                  | Cu       | 81                  | 0,0001             | 0,0002    |
| ZnO        | 4586                | Zn       | 3685                | 0,0066             | 0,0075    |
| Sr         | 415                 | Sr       | 415                 | 0,0006             | 0,0008    |
| Ba         | 4609                | Ba       | 4609                | 0,0067             | 0,0093    |
| Muestra I5 |                     |          |                     | Análisis Elemental |           |
|            |                     |          |                     | Relativo a Calcio  |           |
| Compuesto  | Concentración [ppm] | Elemento | Concentración [ppm] | Compuesto          | Elemental |
| Al2O3      | 17114               | Al       | 9057                | 0,0218             | 0,0161    |
| SiO2       | 29985               | Si       | 14016               | 0,0382             | 0,025     |
| PO4        | 141715              | P        | 46219               | 0,1804             | 0,0823    |
| S          | 2806                | S        | 2806                | 0,0036             | 0,005     |
| Cl         | 2006                | Cl       | 2006                | 0,0026             | 0,0036    |

|                                |        |    |        |        |        |
|--------------------------------|--------|----|--------|--------|--------|
| K <sub>2</sub> O               | 2675   | K  | 2221   | 0,0034 | 0,004  |
| CaO                            | 785577 | Ca | 561453 | 1      | 1      |
| Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | 2653   | Fe | 1855   | 0,0034 | 0,0033 |
| Cu <sub>2</sub> O              | 36     | Cu | 32     | 0      | 0,0001 |
| ZnO                            | 5298   | Zn | 4256   | 0,0067 | 0,0076 |
| Sr                             | 127    | Sr | 127    | 0,0002 | 0,0002 |
| Ba                             | 5420   | Ba | 5420   | 0,0069 | 0,0097 |

Tabla A4. Concentraciones en Huesos. (Enero, 2010)

| Muestra<br>B0179-1 |                        |          |                        | Análisis Elemental<br>Relativo a Calcio |           |
|--------------------|------------------------|----------|------------------------|---|-----------|
| Compuesto          | Concentración<br>[ppm] | Elemento | Concentración<br>[ppm] | Compuesto                               | Elemental |
| Al2O3              | 0                      | Al       | 0                      | 0                                       | 0         |
| SiO2               | 24492                  | Si       | 11448                  | 0,0465                                  | 0,0304    |
| PO4                | 410703                 | P        | 179239                 | 0,7804                                  | 0,4766    |
| S                  | 0                      | S        | 12624                  | 0                                       | 0,0336    |
| Cl                 | 0                      | Cl       | 1734                   | 0                                       | 0,0046    |
| K2O                | 0                      | K        | 0                      | 0                                       | 0         |
| CaO                | 526258                 | Ca       | 376117                 | 1                                       | 1         |
| Fe2O3              | 801                    | Fe       | 560                    | 0,0015                                  | 0,0015    |
| Cu2O               | 0                      | Cu       | 0                      | 0                                       | 0         |
| ZnO                | 245                    | Zn       | 197                    | 0,0005                                  | 0,0005    |
| Sr                 | 0                      | Sr       | 0                      | 0                                       | 0         |
| Ba                 | 0                      | Ba       | 0                      | 0                                       | 0         |
| Muestra<br>B0155-1 |                        |          |                        | Análisis Elemental<br>Relativo a Calcio |           |
| Compuesto          | Concentración<br>[ppm] | Elemento | Concentración<br>[ppm] | Compuesto                               | Elemental |
| Al2O3              | 27540                  | Al       | 14576                  | 0,0473                                  | 0,035     |
| SiO2               | 61029                  | Si       | 28527                  | 0,1048                                  | 0,0685    |
| PO4                | 277288                 | P        | 121014                 | 0,4762                                  | 0,2908    |
| S                  |                        | S        | 12564                  | 0                                       | 0,0302    |
| Cl                 |                        | Cl       | 2044                   | 0                                       | 0,0049    |
| K2O                | 3000                   | K        | 2490                   | 0,0052                                  | 0,006     |
| CaO                | 582338                 | Ca       | 416198                 | 1                                       | 1         |
| TiO2               | 2484                   | Ti       | 1489                   | 0,0043                                  | 0,0036    |
| Fe2O3              | 9945                   | Fe       | 6956                   | 0,0171                                  | 0,0167    |
| Cu2O               | 0                      | Cu       | 0                      | 0                                       | 0         |
| ZnO                | 765                    | Zn       | 615                    | 0,0013                                  | 0,0015    |
| Sr                 | 0                      | Sr       | 0                      | 0                                       | 0         |
| Ba                 | 0                      | Ba       | 0                      | 0                                       | 0         |
| Muestra<br>B0128-1 |                        |          |                        | Análisis Elemental<br>Relativo a Calcio |           |
| Compuesto          | Concentración<br>[ppm] | Elemento | Concentración<br>[ppm] | Compuesto                               | Elemental |
| Al2O3              | 28312                  | Al       | 14984                  | 0,0633                                  | 0,0469    |
| SiO2               | 38661                  | Si       | 18071                  | 0,0864                                  | 0,0565    |

| PO4             | 254206              | P        | 110941              | 0,5681                               | 0,3469    |
|-----------------|---------------------|----------|---------------------|--------------------------------------|-----------|
| S               | 0                   | S        | 17249               | 0                                    | 0,0539    |
| Cl              | 0                   | Cl       | 0                   | 0                                    | 0         |
| K2O             | 791                 | K        | 657                 | 0,0018                               | 0,0021    |
| CaO             | 447486              | Ca       | 319818              | 1                                    | 1         |
| TiO2            | 0                   | Ti       | 0                   | 0                                    | 0         |
| Fe2O3           | 4344                | Fe       | 3039                | 0,0097                               | 0,0095    |
| Cu2O            | 0                   | Cu       | 0                   | 0                                    | 0         |
| ZnO             | 430                 | Zn       | 346                 | 0,001                                | 0,0011    |
| Sr              | 0                   | Sr       | 0                   | 0                                    | 0         |
| Ba              | 0                   | Ba       | 0                   | 0                                    | 0         |
| Muestra B0040-1 |                     |          |                     | Análisis Elemental Relativo a Calcio |           |
| Compuesto       | Concentración [ppm] | Elemento | Concentración [ppm] | Compuesto                            | Elemental |
| Al2O3           | 39804               | Al       | 21066               | 0,0815                               | 0,0604    |
| SiO2            | 58873               | Si       | 27520               | 0,1206                               | 0,0788    |
| PO4             | 352379              | P        | 153785              | 0,7216                               | 0,4406    |
| S               |                     | S        | 21327               | 0                                    | 0,0611    |
| Cl              |                     | Cl       | 0                   | 0                                    | 0         |
| K2O             | 2217                | K        | 1840                | 0,0045                               | 0,0053    |
| CaO             | 488360              | Ca       | 349031              | 1                                    | 1         |
| TiO2            | 940                 | Ti       | 564                 | 0,0019                               | 0,0016    |
| Fe2O3           | 8089                | Fe       | 5658                | 0,0166                               | 0,0162    |
| Cu2O            | 0                   | Cu       | 0                   | 0                                    | 0         |
| ZnO             | 453                 | Zn       | 364                 | 0,0009                               | 0,001     |
| Sr              | 0                   | Sr       | 0                   | 0                                    | 0         |
| Ba              | 0                   | Ba       | 0                   | 0                                    | 0         |
| Muestra B0300-1 |                     |          |                     | Análisis Elemental Relativo a Calcio |           |
| Compuesto       | Concentración [ppm] | Elemento | Concentración [ppm] | Compuesto                            | Elemental |
| Al2O3           | 18347               | Al       | 9710                | 0,0325                               | 0,0241    |
| SiO2            | 26397               | Si       | 12339               | 0,0467                               | 0,0306    |
| PO4             | 341724              | P        | 149135              | 0,6049                               | 0,3694    |
| S               |                     | S        | 30                  | 0                                    | 0,0001    |
| Cl              |                     | Cl       | 690                 | 0                                    | 0,0017    |
| K2O             | 767                 | K        | 637                 | 0,0014                               | 0,0016    |
| CaO             | 564896              | Ca       | 403732              | 1                                    | 1         |
| TiO2            | 488                 | Ti       | 292                 | 0,0009                               | 0,0007    |
| MnO             | 1575                | Mn       | 1220                | 0,0028                               | 0,003     |
| Fe2O3           | 28201               | Fe       | 19725               | 0,0499                               | 0,0489    |

|      |     |    |     |        |       |
|------|-----|----|-----|--------|-------|
| Cu2O | 0   | Cu | 0   | 0      | 0     |
| ZnO  | 988 | Zn | 794 | 0,0017 | 0,002 |
| Sr   | 0   | Sr | 0   | 0      | 0     |
| Ba   | 0   | Ba | 0   | 0      | 0     |

TablaA5. Muestras Colección Cementerio General para análisis PIXE

| Mód. | Estante | Caja | Nº Inv. | Sexo/Edad | Fragmento                    | 1º<br>Análisis | 2º<br>Análisis | 3º<br>Análisis |
|------|---------|------|---------|-----------|------------------------------|----------------|----------------|----------------|
| VII  | 3.4     | 298  | B0335   | M, 50     | F. órbita                    | x              | x              | x              |
| VII  | 3.4     | 259  | B0311   | M,50-54   | 2 restos fragmentados        | x              | x              | x              |
| VII  | 3.3     | 96   | B0059   | M, 50-54  | 2 restos frag.               | x              | x              | x              |
| VII  | 3.3     | 58   | B0040   | M,50-54   | 2 restos frag                | x              | x              | √              |
| VII  | 3.3     | 87   | B0122   | M, 50-54  | Cuña                         | x              | x              | x              |
| VII  | 3.3     | 43   | B0004   | M, 50-54  | 2 restos frag                | x              | x              | x              |
| VII  | 3.2     | 211  | B0300   | F,54      | f. costilla                  | x              | x              | √              |
| VII  | 3.2     | 16   | B0006   | F,51      | Cuña                         | x              | x              | x              |
| VII  | 3.2     | 199  | B0259   | F,53      | Cuña                         | x              | x              | x              |
| VI   | 2.3     | 151  | B0162   | M,31      | 2 restos frag                | x              | x              | x              |
| VI   | 2.3     | 261  | B0387   | M,30      | frag. cráneo                 | x              | x              | x              |
| VI   | 2.2     | 201  | B0078   | F,32      | 2 restos frag                | x              | x              | x              |
| VI   | 2.2     | 29   | B0030   | F,33      | cuña, + varios f.            | x              | x              | x              |
| VI   | 3.3     |      | B0155   | M,35      | cuña, grande // incisivos    | √              | x              | √              |
| VI   | 2.2     | 203  | B0193   | F,33      | Cuña                         | x              | x              | √              |
| V    | 3.3     |      | B0128   | M,24      | Grande // incisivos          | √              | √              | √              |
| V    | 1.1     | 647  | B0759   | F,15-18   | frag. costilla               | x              | x              | x              |
| V    | 1.1     | 153  | B0179   | F,12      | Epíf h. l, cuña              | x              | x              | √              |
| V    | 1.1     | 200  | B0192   | F,13      | Coxis, Ep.H.L                | x              | x              | x              |
| V    | 1.3     | 197  | B0284   | M,13      | Ep.H.L, F. cráneo            | x              | x              | x              |
| V    | 1.3     | 83   | B0124   | M, 12     | Cuña                         | x              | x              | √              |
| V    | 1.3     | 66   | B0093   | M,10-14   | Cuña, 2 restos frag.         | x              | x              | x              |
| IV   | 1.2     |      | B0061   | M,6       | 2 restos frag.. // incisivos | √              | x              | x              |