

Universidad de Chile
Facultad de Ciencias Sociales
Departamento de Antropología

Evaluación del DNA bacteriano como marcador genético de poblaciones humanas

Memoria para optar al título de Antropóloga Física

Constanza de la Fuente Castro
Profesor Guía: Dr. Mauricio Moraga Vergara
Agosto, 2010

Índice

	Páginas
Resumen.....	4
1. Antecedentes	
1.1 Diversidad biológica humana: estimadores directos e indirectos.....	5-11
1.2 Características generales de bacterias.....	12-13
1.3 Flora microbiana de la cavidad oral.....	14-17
1.4 Cálculo Dental.....	17-20
2. Hipótesis.....	21
3. Objetivos.....	21
4. Material y Método	
4.1 Muestras.....	22
4.2 Extracción de DNA.....	23
4.3 Diseño de Partidores y amplificación por PCR.....	23-25
4.4 Clonación.....	25
4.5 Análisis de secuencias.....	25-27
5. Resultados	
5.1 Identificación por PCR.....	28-29
5.2 Análisis de secuencias.....	29-31
5.3 <i>Fusobacterium nucleatum</i>	31-32
5.4 Análisis filogenéticos.....	32-38
6. Discusión.....	39-42
7. Conclusiones.....	42
9. Anexos.....	43-50
8. Bibliografía.....	51-60

AGRADECIMIENTOS

En primer, a quien colaboró directa y sistemáticamente en la realización de este trabajo: Mauricio Moraga. Agradezco su paciencia, confianza y humor.

A Sergio Flores, quien me sugirió fuertemente desarrollar este trabajo y participó en su desarrollo y evaluación final.

A Luis Flores, por la revisión de esta memoria. Por sus comentarios y dedicación.

A Michelle de Saint Pierre, Ximena Leiva y Rocío López, por sus comentarios, amistad y compañía.

A Eugenio Aspillaga, quien fue uno de los gestores de este trabajo y colaboró con muestras.

A los odontólogos Patricio Urkieta y Juan Carlos Salinas, por contribuir con muestras para el desarrollo de esta memoria.

A mi familia, por su apoyo incondicional. Este trabajo está dedicado primero a mis padres, segundos a mis padres y tercero a mis padres.

RESUMEN

La diversidad biológica humana abordada desde una perspectiva molecular ha sido clásicamente estudiada utilizando marcadores en el genoma o proteoma humano (Stoneking, 1997). Sin embargo, el análisis de distintos organismos asociados a la especie humana ha demostrado tener un gran potencial para inferir eventos migratorios recientes o evaluar las relaciones genéticas entre las poblaciones hospederas. El cuerpo humano es colonizado por una numerosa cantidad y diversidad de microorganismos, que conforman su flora normal y patológica. La profundidad temporal y persistencia de esta relación ha permitido la utilización de ciertos organismos como estimadores indirectos de la historia micro-evolutiva de sus hospederos.

El objetivo de este trabajo es contribuir a la utilización de la flora bacteriana humana como marcador genético indirecto de sus hospederos, evaluando específicamente la amplia diversidad bacteriana de la cavidad oral. Para ello se planteó analizar bacterias orales en contextos arqueológicos, utilizando como fuente de DNA el cálculo dental acumulado en vida sobre las superficies dentales de los individuos. Sin embargo, la diversidad genética de las bacterias orales y su aptitud como marcadores genéticos de los hospederos no han sido ampliamente investigadas (Caufield, 2009; Nasidze *et al*, 2009), mientras que la composición bacteriana del tártaro sólo ha sido evaluado mediante técnicas de microscopia (Vandermeersch *et al*, 1994; Pap *et al*, 1995; Linossier *et al*, 1996).

Este estudio constituye una primera aproximación a la composición bacteriana del tártaro dental utilizando técnicas moleculares, considerando la frecuencia y variabilidad genética de cinco bacterias en muestras actuales y antiguas. Los resultados permitieron identificar a la especie bacteriana más adecuada -por frecuencia y variabilidad- para posteriores investigaciones, enfocadas en analizar su variación genética y efectividad como estimador indirecto de la historia micro-evolutiva humana, desde contextos antiguos y actuales. Además, se consiguió definir y validar un protocolo de extracción de DNA desde tártaro, ajustando los parámetros para la amplificación de genes bacterianos en restos prehistóricos.

1. ANTECEDENTES

1.1 Diversidad biológica humana: estimadores directos e indirectos.

El origen y dispersión de nuestra especie han sido abordados desde distintas disciplinas, considerando aspectos culturales y biológicos. Ambas perspectivas han aportado a la reconstrucción de la historia evolutiva de *Homo sapiens* mediante el estudio de poblaciones actuales y extintas. Si bien estos aspectos son complementarios, a menudo pueden generar contradicciones, inherentes a sus modos y tiempos de transmisión: mientras la información genética es transmitida verticalmente, de padres a descendientes; la cultura puede ser transmitida tanto vertical como horizontalmente, entre individuos no relacionados (Torrioni *et al*, 2006). Por ello, se considera necesario evaluar las diversas hipótesis desde un punto de vista más integrado, contrastando con las distintas fuentes disponibles (Laland *et al*, 2010).

El desarrollo de la biología molecular ha contribuido de manera importante al estudio de la evolución y diversidad humana, configurando la sub-disciplina de la Antropología molecular. Desde el análisis de los grupos sanguíneos y la constatación de sus diferencias entre poblaciones, se han evaluado diversos polimorfismos con el objetivo de inferir la diversidad genética humana y su evolución (Stoneking, 1997; Crawford, 2006).

Dependiendo de las preguntas de investigación planteadas, se han utilizado distintos marcadores genéticos en proteínas o DNA de poblaciones humanas: aloenzimas, RFLP (enzimas de restricción), RAPD (Randomly amplified polymorphic DNA), microsatélites, retroelementos y SNP, caracterizados en cromosomas autosómicos, sexuales y DNA mitocondrial (mtDNA). Los marcadores autosómicos son de transmisión biparental y por lo tanto son más representativos de la población en conjunto. Estos marcadores están sujetos a eventos de recombinación y segregación independiente que generan nuevas combinaciones de alelos en loci distintos, situación que contribuye a la diversidad molecular, pero que de acuerdo a la pregunta de investigación no siempre es una característica deseable (Crawford, 2007).

Por otro lado, están los marcadores de herencia uniparental como en el DNA mitocondrial (mtDNA) y cromosoma Y, que permiten evaluar sólo los linajes maternos y paternos respectivamente. Una de las ventajas de estos marcadores es la ausencia de eventos de recombinación (excepto en región PAR de cromosoma Y), de modo que se heredan como

un bloque de genes ligados, manteniendo los haplogrupos ancestrales (Pakendorf&Stoneking, 2005).

El mtDNA, ha sido particularmente relevante para inferir eventos pasados, ya que presenta una tasa de mutación mayor que el genoma nuclear, principalmente en la región D-loop. Mediante enzimas de restricción se han caracterizado diversos haplogrupos cuya distribución geográfica refleja los eventos migratorios y de flujo génico pasados (Crawford, 2006). Además, el mtDNA se presenta en cientos de copias en cada célula, por lo cual ha sido ampliamente utilizado en estudios de DNA antiguo. Una vez que muere el organismo, con el paso del tiempo el DNA es blanco de una serie de alteraciones que conllevan a su inevitable destrucción. Procesos endógenos y exógenos degradan el material genético dificultando su recuperación. Sin embargo, el alto número de copias de mitocondrias por célula favorece la extracción y amplificación del DNA desde contextos antiguos y la estructura circular cerrada de esta molécula contribuye a su preservación, protegiéndolo de la acción de exonucleasas (Ho&Gilbert, 2010).

Complementario al análisis de marcadores genéticos en poblaciones humanas, se ha evaluado la utilización de diversos organismos como estimadores indirectos de la historia evolutiva humana (Ashford, 2000; Disotelle, 2003; Wirth *et al*, 2005). El ser humano establece relaciones con un gran número de organismos, eucariontes y procariontes, algunas de ellas tan antiguas como el origen de *Homo sapiens*, o que han surgido a lo largo de su expansión y desarrollo, como por ejemplo, producto de la domesticación de plantas y animales. En ocasiones los polimorfismos humanos no muestran la variabilidad suficiente para inferir los eventos evolutivos pasados debido a procesos recientes, como cuellos de botella, que disminuyen la diversidad genética de las poblaciones, o a la baja tasa de mutación de los marcadores utilizados. Por ello, la utilización de organismos con mayores tasas de mutación y tiempos generacionales más breves ha servido para esclarecer y poner a prueba hipótesis sobre la evolución humana, eventos de migración y flujo génico (Holmes, 2008; Wirth *et al*, 2005; Kitchen *et al*, 2008).

Dependiendo del organismo y su relación con los grupos humanos es posible responder a distintas preguntas de investigación. En el caso de animales y plantas, su explotación como fuentes de recursos alimenticios, medicinales, ornamentales o rituales, ha generado relaciones de diversa naturaleza. Por ejemplo, en relación al proceso de domesticación, es posible evaluar por lo menos dos aspectos. Primero, el proceso de domesticación en sí mismo, si fue generado independientemente o por difusión, aportando evidencias del

contacto entre poblaciones y su dispersión. Segundo, luego de la domesticación, la dependencia de los grupos humanos por ciertos recursos puede generar patrones de distribución geográfica de los organismos que sugieren su traslado intencional, acompañando las migraciones humanas. Tal es el caso del poblamiento de Polinesia, en donde la migración conjunta de los grupos humanos con sus fuentes de recursos ha permitido estimar el tiempo y modo de dichos movimientos. Al analizar la diversidad genética de las poblaciones polinésicas, se ha observado que presentan escasas evidencias sobre el poblamiento de la región. Los bajos niveles de variación genética de la población ancestral, el flujo génico en tiempos prehistóricos y de post-contacto europeo y las disminuciones de la población producto de la introducción de nuevas enfermedades, ha dificultado el estudio del poblamiento utilizando marcadores humanos (Matisoo-Smith *et al*, 1998). Como alternativa, uno de los marcadores indirectos utilizados es *Rattus exulans*, roedor transportado en canoas por las poblaciones ancestrales polinésicas. A partir del mtDNA de especímenes actuales y restos óseos antiguos de sitios arqueológicos, se han puesto a prueba diversas hipótesis de poblamiento polinésico, permitiendo presentar una visión más compleja de la movilidad humana en la zona (Matisoo-Smith *et al*, 1998; 2004).

De modo similar, se ha discutido el origen y fecha de introducción de la gallina (*Gallus gallus*) en Sudamérica. Una de las hipótesis plantea que data de tiempos precolombinos, sugiriendo que fue introducida por poblaciones polinésicas. Esta hipótesis fue sustentada por Storey y colaboradores (2007), mediante el análisis de restos óseos de gallina encontrados en el sitio arqueológico El Arenal-1, ubicado en la península de Arauco, región del Biobío. El sitio (fechado por termoluminiscencia en 700-1390 AD) fue asociado al complejo cultural El Vergel, desarrollado entre el 1000-1500 AD. Se realizó una datación directa de los restos, obteniendo una fecha de 1304-1424 cal AD, y se analizó una región del D-loop del mtDNA de los especímenes encontrados en el Arenal-1, de sitios arqueológicos en Polinesia, de gallina araucana actual y de secuencias publicadas en GenBank. Las secuencias de El Arenal-1 mostraron una gran afinidad con secuencias de sitios polinésicos, anteriores y contemporáneos a dicho sitio. Los resultados permitieron respaldar la hipótesis de origen polinésico de la gallina en Sudamérica, y plantear que los restos del sitio El Arenal-1 correspondían a especímenes descendientes de gallinas polinésicas (Storey *et al*, 2007). Aunque estos resultados fueron cuestionados en posteriores estudios mediante análisis más completos sobre la diversidad genética de la gallina, su distribución mundial y por la calibración de los fechados (Góngora et al,

2008), se destaca el valor de la aproximación para discutir hipótesis de migraciones o contacto temprano entre poblaciones.

Otros estimadores indirectos comúnmente utilizados son parásitos o comensales que han acompañado a las poblaciones humanas, algunos desde su salida de África. El cuerpo humano es colonizado por una gran diversidad de organismos, denominados en conjunto “segundo genoma” o microbioma humano. Pueden contribuir en distintas actividades metabólicas del hospedero y se estima que su número supera 10 veces a las células del cuerpo humano (Hooper *et al*, 2002; Zaneveld *et al*, 2008). Las relaciones que establecen huésped y hospedero varían de acuerdo a la patogenicidad del huésped, la resistencia o susceptibilidad del hospedero y las condiciones ecológicas particulares (Woolhouse *et al*, 2002; Paracer&Ahmadjian, 2000; Turnbaugh *et al*, 2007; Ley *et al*, 2008).

La estrecha y prolongada relación que se establece entre ambos organismos genera presiones selectivas mutuas y los organismos pasan por un “proceso recíproco de cambio genético adaptativo” conocido como co-evolución (Wollhouse *et al*, 2006). Como evidencia de este proceso, en diversos estudios se ha observado que existe una correlación entre los patrones evolutivos y la distribución geográfica de virus o bacterias y las poblaciones humanas hospederas, y que ha permitido su utilización como estimadores indirectos de la historia evolutiva humana (Disotell, 2003; Wirth *et al*, 2005). Además, el estudio de los parásitos y comensales que colonizan el cuerpo humano informa sobre los hábitos y políticas de salud públicas de las poblaciones hospederas, considerando por ejemplo la prevalencia de ciertas enfermedades de origen microbiano (Nieberding, 2006; Crawford, 2007).

La evaluación de estos organismos como estimadores indirectos debe considerar su modo de transmisión (horizontal vs. vertical), grado de recombinación, tasa de mutación y factores epidemiológicos, que condicionan su dispersión y transmisión (Holmes, 2004; Wirth *et al*, 2005). Su utilización no se limita al estudio evolutivo de poblaciones humanas, siendo también aplicado en contextos forenses, para la identificación geográfica de restos humanos (Ikegaya, 2008).

En el caso de los virus, se distingue entre los de RNA y DNA. Los primeros presentan mayores tasas de mutación, pueden transmitirse vertical y horizontalmente, y por lo general tienen un grado mayor de patogenicidad, limitando su utilización como marcadores indirectos (Holmes, 2008). Sin embargo, ciertos virus de RNA como HLTV (human T-lymphotropic virus) y Hepatitis-G, presentan patrones de distribución geográfica

que reflejan los movimientos migratorios inferidos mediante otros marcadores, culturales o genéticos. Para HTLV, se identificaron subtipos asociados a distintas poblaciones que respaldaban, por ejemplo, el poblamiento de América desde Asia o el tráfico de esclavos de África hacia América (Cassar *et al*, 2007;). No obstante, los dos tipos identificados (HTLV I y II) muestran diversas limitaciones: transmisión horizontal, múltiples orígenes independientes, falta de concordancia entre señales filogenéticas y geografía, regiones bajo selección y altas tasas de evolución que permiten sugerir la presencia de homoplasias (Wirth *et al*, 2005;). El virus de Hepatitis G también se encuentra ampliamente distribuido y presenta una distribución geográfica afín con los principales movimientos poblacionales fuera de África. Sin embargo, la evaluación de distintas regiones de su genoma sugiere la transferencia horizontal de genes, limitando su utilización para inferir migraciones humanas.

Por su parte, los virus de DNA se transmiten vertical o sexualmente, y tienen tasas de evolución menores que los de RNA. Los más comunes son el virus JC (Polyomavirus) y Papiloma (Wirth *et al*, 2005; Kitchen *et al*, 2008; Pavesi, 2005). El primero infecta los tejidos renales y tiene una alta prevalencia en la población, entre 70 a 90%, sin producir patologías. Su transmisión ocurre principalmente a nivel familiar o de comunidad, y la recombinación es poco frecuente (Pavesi, 2005). La secuenciación de este virus en diversos individuos ha permitido identificar genotipos asociados a distintas poblaciones. Pavesi en el 2005 sostiene que la relación entre este virus y las poblaciones humanas es muy antigua, probablemente previa a la salida de *Homo sapiens* de África. El autor plantea la existencia de un linaje ancestral que dio origen a dos linajes evolutivos independientes, sustentando la hipótesis de salida de África mediante dos oleadas migratorias, cada una llevando un linaje distinto. Además, observa que existe una estrecha relación entre los virus de nativos americanos y poblaciones del noreste de Asia, consistente con las teorías de poblamiento Americano (Pavesi, 2005). Sin embargo, en estudios posteriores se han observado discrepancias entre las filogenias del virus y las poblaciones humanas hospedadas. Junto con ello, se ha estimado una tasa de mutación mayor a la utilizada inicialmente, limitando el uso de este virus a eventos migratorios recientes (Shackelton *et al*, 2008; Kitchen *et al*, 2008; Holmes, 2008).

Por último, el virus papiloma humano presenta una gran diversidad de cepas que infectan la piel y mucosas, siendo el tipo HPV-16 y HPV-18 los más comunes, y los que podrían reflejar las migraciones de las poblaciones hospedadas. Pese a excepciones en su distribución geográfica que sugieren la transferencia horizontal de genes (LGT), es

consistente con las hipótesis principales, aunque no aporta con nuevos conocimientos sobre las migraciones humanas (de Thé, 2007).

En bacterias los estudios se han centrado básicamente en *Helicobacter pylori*. Este organismo coloniza el estómago de más del 50% de la población mundial y es agente de la gastritis, úlceras peptídicas y cáncer gástrico, aunque en la mayoría de las personas se comporta como comensal. Presenta un modo de transmisión vertical –de madres a hijos, similar al mtDNA– característica que favorece su utilización como marcador genético indirecto de las poblaciones hospederas. Además, muestra una gran diversidad genética, incluso en genes esenciales, y una alta tasa de recombinación (Kersulyte *et al*, 2000). En esta especie se han identificado cepas asociadas a distintas poblaciones, cuya distribución geográfica es congruente con las principales migraciones humanas (Suerbaum&Achtman, 2004; Wirth *et al*, 2005; Yamaoka, 2009) (Figura 1).

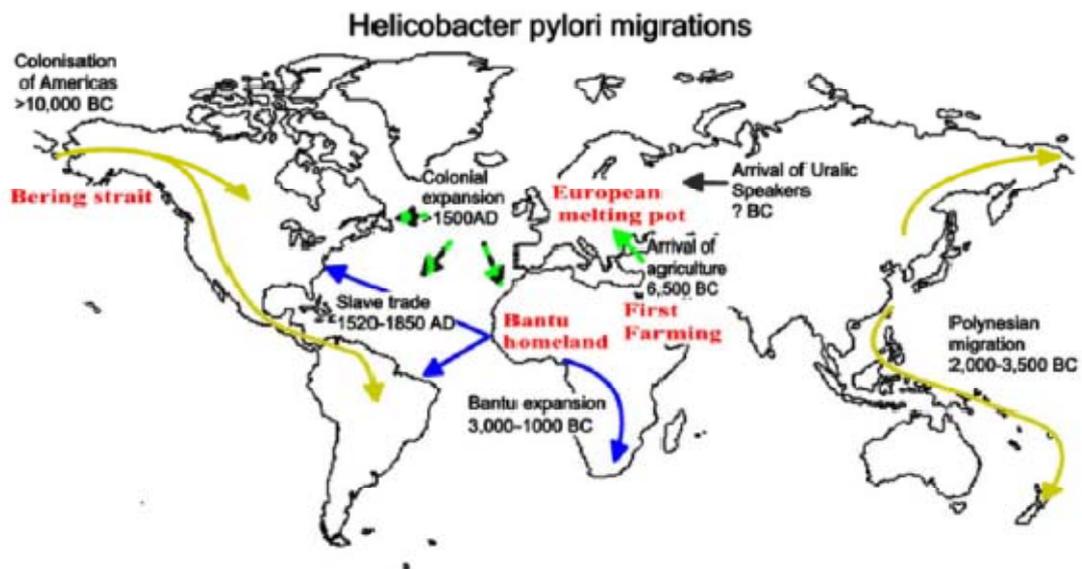


Figura 1: Posibles migraciones de *H. pylori* (imagen de Suerbaum&Achtman, 2004). Las flechas indican la dirección de las principales migraciones de *H. pylori* y las poblaciones humanas, y el color la cepa de la bacteria.

Inicialmente, el estudio de esta bacteria en población americana mostró una mayor asociación entre estas cepas y las europeas en lugar de las asiáticas, como era de

esperar según la hipótesis de poblamiento americano. A partir de esta evidencia se sugirió que *H. pylori* no formó parte del poblamiento inicial de América y fue introducida durante la colonización europea. Sin embargo, estudios posteriores permitieron identificar cepas asiáticas en población nativa americana, mientras que las cepas europeas fueron encontradas principalmente en población mestiza, sugiriendo la recombinación entre ambas cepas y quizás un menor fitness para la cepa asiática (Suerbaum&Atchman, 2004). Además, la bacteria fue identificada en restos momificados del norte de México, fechados en ca. 1350 AC, confirmando la presencia pre-colombina de *H. pylori*.

La diversidad genética de la bacteria también ha sido estudiada en contextos más acotados, con el objetivo de comparar la información entregada por *H. pylori* y polimorfismos en humanos. Wirth y colaboradores analizaron las relaciones genéticas entre budistas y musulmanes de Ladakh, al norte de la India, mediante marcadores mitocondriales, autosómicos y en *H. pylori*, demostrando la superioridad de la bacteria como marcador genético para eventos recientes, ya que los marcadores en humanos no fueron capaces de distinguir a ambas poblaciones (Wirth *et al*, 2004). Sin embargo, para estudiar esta bacteria se necesitan muestras de biopsias, obtenidas generalmente desde individuos que consultan por alguna patología gastrointestinal (Wirth *et al*, 2005), limitando su análisis a las cepas más patógenas. A su vez, el estudio en contextos antiguos depende de la conservación de tejidos blandos que permitan extraer y analizar el DNA de la bacteria, situación que solo es posible bajo ciertas condiciones ambientales.

En la cavidad oral, Nasidze y colaboradores (2009) evaluaron la diversidad bacteriana en saliva con el objetivo de identificar especies que puedan ser utilizadas para inferir la estructura poblacional y migraciones humanas, encontrando una gran variabilidad entre individuos, pero limitada estructuración geográfica. Los taxones identificados en mayor frecuencia fueron *Streptococcus*, *Prevotella*, *Veillonella*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Rothia*, *Porphyromonas* y *Fusobacterium*, las cuales se sugiere estudiar como posibles marcadores indirectos de poblaciones humanas (Nasidze *et al*, 2009). A nivel de especie, Caufield evaluó la distribución geográfica y poblacional de *Streptococcus mutans*, bacteria de la flora normal de la cavidad oral y uno de los principales agente cariogénicos. Sin embargo, pese a que la bacteria presenta un modo de transmisión vertical, los resultados de este estudio no son concluyentes respecto a la capacidad de la bacteria o polimorfismos utilizados para reflejar eventos evolutivos de la especie humana (Caufield, 2009).

1.2 Características generales de bacterias

Las bacterias son organismos unicelulares procariotas de diversas formas y tamaños (0.5-5µm). Pueden colonizar una amplia variedad de ambientes según sus requerimientos nutricionales, siendo clasificadas de acuerdo a sus necesidades de oxígeno y la forma de obtención de energía. Como toda célula procariota, no presentan un núcleo delimitado por membrana y su DNA se encuentra condensado formando una estructura visible denominada nucleoide. Son haploides y presentan un cromosoma único, circular en su gran mayoría. Algunas bacterias contienen DNA extracromosómico, también circular, denominado plásmido y que se replica y transcribe independiente del DNA cromosómico.

Un aspecto característico de las bacterias es la presencia de pared celular, que le confiere forma y rigidez a la célula. Según diferencias estructurales de la pared, se distingue a bacterias gram-positivas y gram-negativas, mediante la tinción de Gram. La pared de las primeras es más ancha y esta compuesta en casi un 90% por capas de peptidoglicanos, mientras que la pared de las gram-negativas tiene una estructura más compleja, constituida por una mayor diversidad de moléculas. La estructura básica del peptidoglicano tiene dos cadenas de derivados de azúcares (N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmuránico) y aminoácidos, unidos entre sí constituyendo una estructura repetitiva llamado tetrapéptido de glicano. Las cadenas están unidas mediante enlaces glucosídicos y por puentes peptídicos a través de los aminoácidos. El número de puentes peptídicos es variable entre las bacterias y determina la rigidez de la pared (a mayor número de puentes, mayor rigidez de la pared). En menor proporción, la pared de las bacterias gram-positivas contiene ácidos teitoicos, primariamente alcoholes y fosfato.

Las bacterias gram-negativas tienen una delgada capa de peptidoglicano, rodeada de una capa de lipopolisacáridos. Esta última es una segunda bicapa lipídica, denominada membrana externa, constituida por fosfolípidos, polisacáridos y proteínas. Su función es principalmente estructural y es relativamente permeable gracias a la presencia de proteínas llamadas porinas, que permiten el paso de ciertas moléculas (Madigan *et al*, 2002)

Las bacterias se reproducen asexualmente, por fisión. Durante este proceso la célula duplica el número de sus constituyentes, permitiendo en la división de la célula por fisión binaria generar dos células idénticas. La duración de este ciclo es variable y depende de factores nutricionales y genéticos. Si bien este mecanismo de reproducción no permite la

combinación de dos genomas como ocurre en los organismos de reproducción sexual, las bacterias presentan formas de recombinación que les permite intercambiar segmentos de DNA incluso entre especies distintas, proceso también conocido como transferencia horizontal de genes. Otras fuentes importantes de variación en las bacterias son los eventos de mutación y la reorganización de segmentos de DNA (Arber, 2000).

La transferencia horizontal o lateral de genes es una importante fuerza evolutiva en bacterias, caracterizada por la transmisión no genealógica de material genético entre organismos (Goldenfeld&Woese, 2007; Boto, 2010). Fue propuesta a los inicios de los '90 como una explicación alternativa a las incongruencias observadas en las filogenias de bacterias, en donde la agrupación en cluster utilizando ciertos genes difería considerablemente de las agrupaciones observadas mediante otros marcadores morfológicos, fisiológicos y moleculares (Boto, 2010).

Los eventos de transferencia horizontal pueden ocurrir mediante tres mecanismos: transformación, conjugación y transducción. El primero consiste en la incorporación de fragmentos de DNA no mayores a 250kb desde el ambiente. Durante cierta etapa de crecimiento, la célula adquiere la capacidad de incorporar fragmentos de DNA (competencia), permitiendo que el DNA se una a receptores en la superficie de la bacteria y que una de las hebras ingrese a la célula. Posteriormente el fragmento se incorpora al cromosoma de la bacteria, replicándose junto con el resto del genoma. Por su parte, la conjugación esta mediada por plásmidos y permite la transferencia de pequeños fragmentos de DNA, genes o el cromosoma completo. En algunas especies, la bacteria donadora presenta apéndices en su superficie conocidos como pili, que hacen contacto con receptores en la célula receptora, permitiendo su unión y posterior transferencia de DNA. Finalmente, la transducción permite la transferencia de fragmentos de aproximadamente 50kb vía bacteriófagos o virus de bacterias (Dale&Park, 2004).

Estos mecanismos de recombinación son especialmente relevantes al momento de evaluar la aptitud de diferentes especies como marcadores indirectos de la historia evolutiva humana. Una bacteria adecuada para dicho objetivo debería idealmente ser transmitida de forma vertical y presentar una baja tasa de transferencia horizontal, evitando la presencia de cepas recombinantes. Por ejemplo, en el caso de bacterias con una tasa de recombinación alta, se podrían reconstruir distintas historias evolutivas de acuerdo al gen o fragmento analizado, obteniendo conclusiones equivocadas respecto al hospedero. Sin embargo, la identificación de cepas recombinantes puede contribuir a

resolver otros problemas de investigación, siendo un caso concreto de contacto y mestizaje entre dos poblaciones.

1.3 Flora microbiana de la cavidad oral

La cavidad oral es un ambiente abierto y dinámico que se caracteriza por presentar una amplia diversidad bacteriana. Se ha estimado que contiene más de 700 especies, aunque cerca del 50% aun no han sido identificadas o cultivadas (Aas *et al*, 2005). Sus condiciones ecológicas son heterogéneas debido a la presencia de diversas superficies o ecosistemas que son colonizados preferencialmente por las bacterias, permitiendo observar diferencias cuantitativas y cualitativas dentro de la cavidad oral (Avila *et al*, 2009). Los factores involucrados en este ambiente pueden ser fisicoquímicos (humedad, pH, temperatura y potencial óxido-reducción), de adhesión (entre microorganismos y tejido del hospedero), de agregación y co-agregación (entre bacterias), nutricionales, protectores del hospedero y antagónicos interbacterianos (Liébana, 1995).

La colonización de la cavidad oral comienza poco después del nacimiento. Inicialmente su composición es relativamente simple, pero va diversificándose con la erupción dental (Papaioannou *et al*, 2009). La flora bacteriana normal juega un rol importante tanto en la mantención de la salud oral como en la etiología de enfermedades orales (Hojo *et al*, 2009; Avila *et al*, 2009). La gran mayoría de las bacterias son comensales, algunas están asociadas a enfermedades propias de la cavidad oral (pe.: periodontitis y caries) y otras a enfermedades sistémicas, como endocarditis, neumonía y osteomielitis (Paster *et al*, 2001; Aas *et al*, 2005).

Las bacterias que se encuentran en mayor proporción son streptococos gram-positivos del grupo viridians, tales como *Streptococcus mutans*, *S. gordonii*, *S. mitis* y *S. sanguinis*. Otras especies identificadas son bacilos gram-positivos del género *Actinomyces*, *Lactobacillus*, *Eubacterium* y *Rothia dentocariosa*; cocos gram-negativos del género *Neisseria* y *Veillonella*; y bacilos gram-negativos como *Haemophilus*, *Actinobacillus*, *Eikenella*, *Treponema*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Leptotrichia*, *Capnocytophaga* y *Fusobacterium*, entre otros (Avila *et al*, 2009; Jenkinson&Lamont, 2005). La microflora oral se encuentra organizada en comunidades polibacterianas, principalmente como biofilm adheridas a las superficies de dientes, mucosas, lengua y prótesis (Jenkinson&Lamont, 2005; Avila *et al*, 2009). Las diferencias en la composición bacteriana de las distintas

superficies se explican en gran parte por las características anatómicas de la cavidad oral. Las bacterias presentan adhesinas específicas en su superficie, complementarias a ciertos receptores del hospedero que se distribuyen diferencialmente en la cavidad oral (Aas *et al*, 2005).

La variación en la composición bacteriana de cavidad oral también se ve afectada por el desarrollo de condiciones patológicas (Mager *et al*, 2003; Aas *et al*, 2005; Filoche *et al*, 2009). Según la hipótesis ecológica planteada por Marsh (revisado en Filoche *et al*, 2010), el desarrollo de patologías está relacionado a cambios en las condiciones ambientales de la cavidad oral, debido por ejemplo a la falta de higiene bucal o alteraciones en la dieta, que permiten el aumento de especies patológicas (Ruby & Barbeau, 2002). Las principales patologías de la cavidad oral, caries y enfermedad periodontal, están asociadas a la acumulación de placa sobre las superficies dentales (Li *et al*, 2004). Ambas patologías son de carácter polibacteriano y las principales especies involucradas se han definido como metabólicamente opuestas. Las caries se caracterizan por la desmineralización progresiva del esmalte, dentina y cemento, producto de la acción lítica de bacterias con metabolismos fermentativos productores de ácidos (Hillson, 2005). Los principales agentes etiológicos incluyen a especies de los géneros *Streptococcus* (mayoritariamente *S. mutans*), *Rothia*, *Actinomyces*, *Lactobacilli* y *Bifidobacterium* (Filoche *et al*, 2009). Por su parte, la enfermedad periodontal involucra la inflamación de los tejidos que dan soporte al diente producto de la acumulación de bacterias (Filoche *et al*, 2009). El grupo de bacterias involucradas es diverso y ha sido caracterizado en complejos bacterianos, con ciertas especies predominantes (Socransky *et al*, 1998; Filoche *et al*, 2009). En particular, la enfermedad periodontal se relaciona con el complejo rojo, compuesto por las especies *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* y *Tannerella forsythia*. Otras bacterias involucradas son *Prevotella intermedia* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. (Jenkinson&Lamont, 2005; Filoche *et al*, 2009).

La placa dental está conformada por una diversa comunidad de microorganismos inmersos en una matriz extracelular de polímeros, provenientes del hospedero y de las mismas bacterias (Li *et al*, 2004; Marsh, 2005). Según su ubicación respecto al límite gingival se distingue entre placa supragingival y subgingival. Esta diferenciación influye también en su composición y organización, principalmente debido a la disponibilidad de nutrientes y oxígeno.

El desarrollo de placa dental comienza poco después de la limpieza, con la formación de una capa acelular denominada película adquirida, compuesta por proteínas y glicoproteínas derivadas del hospedero (saliva). Estas moléculas son fuente de receptores para las bacterias, permitiendo la colonización de la superficie dental. Los colonizadores iniciales o tempranos son principalmente especies de los géneros *Actinomyces*, *Lactobacillus* y *Streptococcus*. En menor frecuencia se encuentran *Capnocytophaga* spp., *Eikenella* spp., *Haemophilus* spp., *Prevotella* spp., *Propionibacterium* spp., y *Veillonella* spp. (Kolenbrander *et al*, 2002; Marsh, 2005). Los streptococos se encuentra en mayor proporción, probablemente debido a que tienen la capacidad de adherirse a diversas moléculas del hospedero y co-agregar con una amplia variedad de especies (Kolenbrander *et al*, 2002; Jenkinson&Lamont, 2005). La presencia y frecuencia de las distintas especies va sufriendo alteraciones durante la maduración de la placa dental según diversos factores, entre ellos la disponibilidad de nutrientes, oxígeno, y las relaciones antagónicas o de cooperación entre las bacterias (Figura 2). La acumulación de placa favorece la colonización y aumento de un segundo grupo de especies, denominadas colonizadores tardíos, constituido por bacterias involucradas en patologías. Algunas de estas especies son *Eubacterium* spp., *A. actinomycetemcomitans*, *T. denticola*, *P. intermedia*, *P. gingivalis*, *Selenomonas flueggei*, *T. forsythensis* (Kolenbrander *et al*, 2002). Estudios de diversidad bacteriana en placa dental han permitido observar diferencias en la composición de acuerdo a las condiciones de salud. En sitios sanos predominan las cocos gram-positivos, mientras que las áreas patológicas están colonizadas preferencialmente por espiroquetas y especies gram-negativas (Marsh, 2005; Handfield *et al*, 2008; Avila *et al*, 2009).

Una especie altamente frecuente en placa dental de sitios sanos y patológicos es *Fusobacterium nucleatum*, componente estructural clave en el biofilm. Esta bacteria co-agrega con una gran cantidad de especies, tanto colonizadores tempranos como tardíos, actuando como un puente entre ambos grupos de especies (Kolenbrander *et al*, 2002). Además, se ha observado que su presencia condiciona la colonización de otras especies, principalmente del complejo rojo, como *P. gingivalis* (Kolenbrander *et al*, 2002; Karpathy *et al*, 2007).

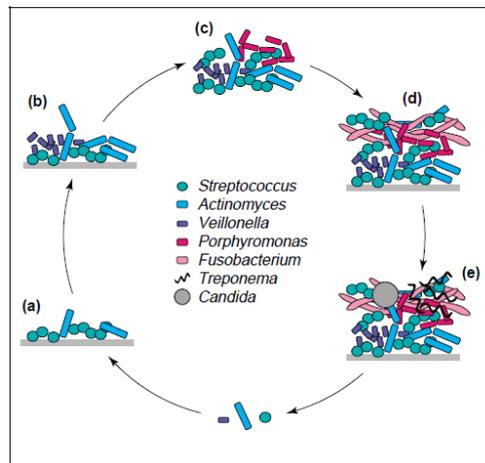


Figura 2: Desarrollo de placa dental (Jenkinson & Lamont, 2005). El esquema muestra la sucesión de especies bacterianas en la formación de placa bacteriana. Sobre la superficie de los dientes se forma la película adquirida, permitiendo la adhesión de los colonizadores iniciales, principalmente *Streptococcus* y *Actinomyces*, y que a su vez favorecen la agregación de otras bacterias como *Veillonella*. Los cambios en el ambiente local que producen estas bacterias permite la agregación de colonizadores tardíos como *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Treponema* e incluso hongos como *Candida albicans*.

1.4 Cálculo dental

La mineralización de la placa dental forma el tártaro o cálculo dental. Este proceso involucra la incorporación de cristales de fosfato de calcio, principalmente hidroxiapatita, whitlockita, fosfato octacálcico y brucita, a la matriz orgánica de la placa (Liébana, 1995; Lieverse, 1999). La precipitación de las sales minerales esta estimulada por la alcalinización de la cavidad oral y el aumento en la concentración de calcio y fosfato, factores que a su vez dependen de la dieta, el metabolismo de las bacterias orales y hábitos de higiene. Además, se ha observado que algunos individuos presentan una predisposición a formar tártaro o que hábitos como el consumo de tabaco incrementan su formación (White, 1997). Al igual que la placa dental, de acuerdo a su ubicación, se distingue entre tártaro supragingival y subgingival (figura 3). El primero se ubica sobre el margen gingival, adherido al esmalte, mientras que el cálculo subgingival se forma en la raíz del diente, una vez que se retrae el margen gingival, razón por la cual se asocia con mayor frecuencia al desarrollo de enfermedad periodontal. El tártaro supragingival puede

estar presente en condiciones de salud y enfermedad y presenta una estructura más heterogénea, con áreas no mineralizadas.

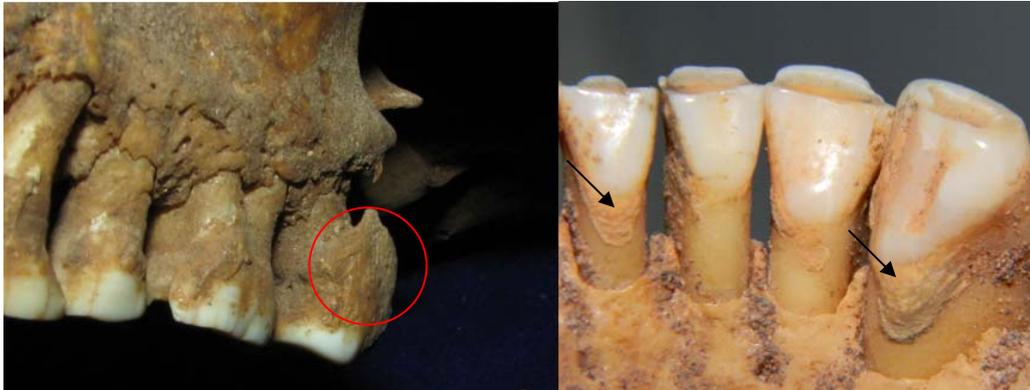


Figura 3: Cálculo dental. A la izquierda, tártaro supragingival (señalado en círculo); a la izquierda, subgingival (señalado con flechas). Fotografías correspondientes a restos bioantropológicos de colecciones arqueológicas depositadas en el Museo Arqueológico R.P. Gustavo Le Paige.

En contextos arqueológicos el cálculo dental ha sido considerado principalmente como un estimador de dieta y patologías orales. Por ejemplo, se ha observado que el alto contenido proteico en la dieta estimula la formación de tártaro debido al aumento del pH en la cavidad oral, mientras que el incremento de carbohidratos tiene el efecto contrario, facilitando el desarrollo de caries (White, 1997; Lieverse, 1999). Este antecedente sirvió para asociar el estado de salud oral en grupos arqueológicos a tipos de dieta, en donde las poblaciones agricultoras presentarían un mayor predominio de caries *versus* cazadores-recolectores, presentándose la situación contraria en el caso del tártaro. Sin embargo, debido a que la formación de cálculo responde mejor a fenómenos multifactoriales, ha sido desestimado como un indicador directo de dieta.

A nivel microscópico, se han analizado fitolitos o restos microscópicos de sílice, que se forman en los tejidos de las plantas, adoptando diversas formas y tamaños según el tipo de tejido y planta. Estos microfósiles de plantas han sido extraídos desde sedimentos (por flotación), cerámica, líticos y dientes, informando sobre la economía de grupos extintos y ambientes pasados. Su caracterización en la matriz calcificada del tártaro ha permitido la identificación de los diversos componentes vegetales en la dieta (Lalueza *et al*, 1996; Henry & Piperno, 2008).

La presencia de tártaro también se ha asociado al desarrollo de enfermedad periodontal. La acumulación de placa dental sobre el tártaro, favorece la inflamación del tejido gingival

debido a la acumulación de bacterias (Hillson, 1996; Lieverse, 1999), situación que puede conducir a la pérdida de piezas dentales y reabsorción alveolar.

Finalmente, análisis de microscopía en tártaro han permitido observar una gran variedad de bacterias inmersas en esta matriz calcificada, en individuos de data arqueológica y neanderthal fechados en 60.000 años AP (Vandermeersch *et al*, 1994; Pap *et al*, 1995; Linossier *et al*, 1996). En estos estudios se ha enfatizado la buena preservación de la pared celular y las similitudes entre las bacterias conservadas en tártaro de restos bioantropológicos y las presentes en grupos controles de población actual (Linossier *et al*, 1988; 1996). Mediante técnicas de microscopía y de inmunofluorescencia se observaron diversos morfotipos bacterianos, identificando en un caso a la bacteria *Streptococcus mutans* (Linossier *et al*, 1996) (Figura 4).

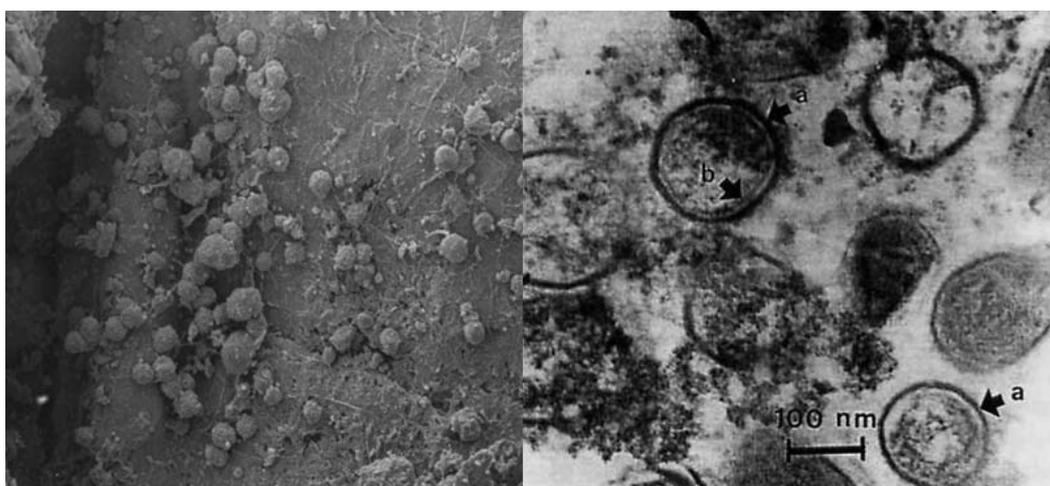


Figura 4: Microscopía de Cálculo Dental. A la izquierda: microscopía electrónica de barrido (200x) de tártaro antiguo, correspondiente a restos bioantropológicos de Pica-8 (Urzúa *et al*, 2009). A la derecha: microscopía electrónica de transmisión de tártaro antiguo atacameño (Linossier *et al*, 1996). En esta última imagen se pueden observar bacterias inmersas en tártaro antiguo. Las flechas señalan la pared celular de las bacterias.

En contextos forenses, el tártaro ha sido utilizado como un método alternativo y no destructivo para determinar sexo en restos óseos, amplificando mediante PCR fragmentos de cromosomas sexuales (Kawano *et al*, 1995). Sin embargo, la extracción de DNA desde cálculo dental con el objetivo de evaluar su composición bacteriana no se ha realizado ni en contextos actuales ni antiguos.

Estos antecedentes motivaron la evaluación molecular del contenido bacteriano del cálculo dental en individuos actuales y restos bioantropológicos, considerando las ventajas de su conservación en contextos arqueológicos. Se formularon dos preguntas de investigación: primero, en relación al potencial del tártaro como fuente de DNA, ¿es posible extraer DNA bacteriano desde el cálculo dental de individuos actuales y restos bioantropológicos?; y segundo, las bacterias conservadas en el tártaro, ¿permiten inferir la historia evolutiva de sus hospederos?

2. HIPÓTESIS

HA1: El cálculo dental adherido a la superficie de los dientes de individuos actuales y antiguos conserva bacterias de la cavidad oral, cuyo DNA puede ser analizado mediante técnicas moleculares.

HA2: La variabilidad genética de las bacterias orales permite inferir la historia microevolutiva de poblaciones humanas chilenas diferenciadas geográfica y temporalmente.

H02: La variabilidad genética de las bacterias orales no permite inferir la historia microevolutiva de poblaciones humanas chilenas diferenciadas geográfica y temporalmente.

3. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es analizar las propiedades del DNA de bacterias de la cavidad oral (*Actinomyces naeslundii*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*) como marcadores genéticos indirectos de la historia micro-evolutiva de las poblaciones humanas hospedadas.

Los objetivos específicos son:

1. Extraer DNA de bacterias de la cavidad oral a partir de muestras de tártaro dental antiguas y actuales.
2. Evaluar la variabilidad genética de bacterias de la cavidad oral, en muestras de tártaro antiguas y actuales a partir de los genes elegidos a priori
3. Inferir la historia de linajes humanos de poblaciones chilenas diferenciadas geográfica y temporalmente, a partir de las bacterias conservadas en el tártaro dental.

4. MATERIAL Y MÉTODO

4.1 Muestras

Se analizaron 72 muestras de tártaro, de las cuales 39 son de población actual y 33 de restos bioantropológicos. Las muestras actuales (facilitadas por odontólogos) corresponden a individuos residentes en Santiago, de ambos sexos y edades entre los 27 a 89 años. Los restos bioantropológicos provienen de las colecciones Cementerio General, Pica-8, Tarapacá-40 y Chonos, depositadas en la facultad de Ciencias Sociales de la Universidad de Chile. Además, se incluyeron 4 muestras provenientes de sitios arqueológicos de Argentina y sur de Chile (Tabla 1). El tártaro fue extraído mecánicamente utilizando una cureta y depositado en tubos eppendorf de 1.5 ml.

Las colecciones bioantropológicas de Pica-8 y Tarapacá-40 provienen de sitios en el norte de Chile y han sido asignados al período Intermedio Tardío (1000-1450 DC) y Formativo respectivamente. Las muestras de Chonos proceden de distintos sitios del sur de Chile, asignados al grupo indígena conocida etnohistóricamente como Chono.

Tabla 1: Muestras de tártaro utilizadas en este estudio.

Muestra	N	Fechas	Ubicación
Santiago	39	Actual	Santiago, Región Metropolitana
Cementerio General	12	1960-1970	Región Metropolitana
Caserones-Tarapacá 40	4	250-600 DC	Región de Tarapacá
Pica 8	6	1000-1450 DC	Región de Tarapacá
Chono	7	500±70 AP	Guaitecas-Península de Taitao
RB02	1	3741 ± 51 AP*	Sítios Río Bote 1, Provincia de Santa Cruz, Argentina
OB03	1	3565 +/- 45 AP	Sitio Oreja de Burro 1, Provincia de Santa Cruz Argentina
GOJ03	1	Sin información	Provincia de Jujuy, Norte de Argentina
IP11	1	4520+/-60 AP	Sitio Ayayema, Isla Madre de Dios, Archipiélagos Occidentales Patagonia.

* Datación de individuo RB01, ubicado en mismo nivel estratigráfico de RB02.

4.2 Extracción de DNA

Para la extracción de DNA se utilizó un protocolo modificado de DNA antiguo estimando un máximo de 10mg de cálculo dental por muestra (Kemp *et al*, 2006). El tártaro fue colocado en tubos Eppendorf de 1.5 ml y tratado con hipoclorito de sodio (concentración comercial) para eliminar contaminantes superficiales. Las muestras fueron desmineralizadas en EDTA 0.5M, incubando a temperatura ambiente con agitación constante por 24 horas (muestras actuales por 48 horas). Luego se agregó proteinasa-K y SDS (10%) para la digestión de proteínas, incubando a 53°C con agitación constante por 16 horas. En el caso de las muestras actuales se incluyó un paso previo en lisozima (buffer Tris-EDTA y lisozima), incubando a 37°C por dos horas.

La eliminación de las proteínas y componentes celulares se realizó mediante dos extracciones de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y una de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). El DNA fue precipitado en un volumen de acetato de amonio 5M y dos volúmenes de isopropanol durante 16 horas. Finalmente se centrifugó por 15 minutos a 13.000rpm para eliminar el isopropanol y el pellet fue lavado en etanol 75%. El DNA fue secado y resuspendido en 100 µl de TE para tártaro actual y 50 µl para antiguo.

Con el objetivo de evitar la contaminación, los procedimientos de extracción de muestras antiguas fueron realizados en un laboratorio separado de las muestras actuales, utilizando (en ambos casos) material desechable o previamente sometido a luz UV.

4.3 Diseño de partidores y amplificación por PCR

La identificación de las bacterias se realizó mediante amplificación por PCR, utilizando partidores especie-específicos para fragmentos de aproximadamente 200bp. Los partidores fueron diseñados para fragmentos no superiores a 250bp debido a que los procesos de degradación del DNA que tienen lugar con el paso del tiempo, no permite en la mayoría de los casos amplificar fragmentos mayores (Willerslev&Cooper, 2005). Fueron evaluados en Blast para evitar la amplificación de otros organismos, considerando que la identificación se realiza en un medio polibacteriano. Bajo el mismo criterio, se utilizaron genes distintos para cada bacteria, evitando la amplificación de más de una especie.

El mix de reacción (25 µl volumen total) contenía: 0.2 µl de enzima Go Taq HotStart (5U/µl), 5 µl de buffer 5x de la enzima, 2 µl de dNTPs (2.5mM), 2 µl de MgCl² (25mM), 1.25 µl de cada partidore (10 µM) y 0.7 µl de BSA en las muestras antiguas. Se utilizaron 3

µl del DNA extraído para las muestras antiguas y 2 µl para las actuales. El PCR se realizó bajo las siguientes condiciones: denaturación inicial a 95°C por 5 minutos, 45 ciclos para tártaro antiguo y 35 para actual de 95°C por 30 segundos, annealing por 30 segundos según la temperatura de cada partidador (ver tabla 2) y elongación a 72°C por 30 segundos. La elongación final se realizó a 72°C por 5 minutos.

Todos los análisis moleculares fueron realizados en laboratorios del Programa de Genética Humana (ICBM) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Se diseñaron partidores para cinco bacterias (tabla 2): *Actinomyces naeslundii*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus gordonii* y *Streptococcus mutans*. Las primeras cuatro especies fueron elegidas usando como referente estudios de placa dental, ya que su mineralización conduce a la formación del cálculo (Kolendrande *et al*, 2002; Duncan, 2003; Filoche *et al*, 2010; Hojo *et al*, 2009; Avila *et al*, 2009), mientras que *S. mutans* ha sido identificada en estudios anteriores de microscopia de tártaro (Linossier *et al*, 1996). Ambas especies de *Streptococcus* y *A. naeslundii* son bacterias gram positivas, anaeróbicas facultativas y forman parte de la colonización inicial de la superficie dental (Kolendrande *et al*, 2002). *P. gingivalis* y *F. nucleatum* son bacterias gram negativas y anaeróbicas. La primera se asocia al desarrollo de enfermedad periodontal y es parte de los colonizadores tardíos de la placa, mientras que la segunda no está directamente relacionada a patologías y actúa como puente entre los colonizadores iniciales y tardíos de la placa dental (Kolenbrande *et al*, 2002).

Tabla 2: Información de partidores diseñados para cada bacteria

Especie	Gen	Función	Acceso Genbank	Partidores	Tm (°C)	Tamaño (bp)
<i>A. naeslundii</i>	uref	Proteína accesoria de la ureasa ^a	<u>AF048783</u>	F:5'cacacccactgaccccttc3' R:5'agcccctcggagaaggtc3'	59	179
<i>S. gordonii</i>	sspA	Proteína de membrana involucrada en adherencia ^b	<u>NC_009785</u>	F:5'gtctgattggtggcctcatt 3' R:5'tttgcagcatctgtttcagc 3'	52	166
<i>S. mutans</i>	gbpA	Proteína involucrada en la virulencia de la bacteria ^c	<u>NC_004350</u>	F:5'cttcaccgctgtctttgtca3' R:5'cgatggcaaacgtgtatcag3'	58	149
<i>F. nucleatum</i>	fadA	Involucrado en la colonización y adherencia de la bacteria ^d	<u>DQ012979</u>	F:5'gcagtttctgcttcagcattt3' R:5'tgctgaagtctttgagctcttt3'	53	166
<i>P. gingivalis</i>	fimA	Relacionado con adherencia y formación de biofilm ^e	<u>AB195790</u>	F:5'tgcgacgctatatgcaagac3' R:5'tcttcaaaaccacgctgatg3'	52	166

^a Morou-Bermudez *et al*, 1999; ^b Kolenbrander *et al*, 2002; ^c Matsumura *et al*, 2003; ^d Han *et al*, 2005; ^e Lo *et al*, 2010.

4.4 Clonación

El fragmento amplificado de *Fusobacterium nucleatum* fue clonado en 8 muestras¹ de tártaro actual y antiguo para evaluar la presencia simultánea de dos o más variantes de la bacteria en un mismo individuo. Se utilizó como vector de clonación el plasmidio pGEM®-T de Promega, siguiendo los protocolos descritos en el manual técnico del producto. La reacción de ligación se realizó incubando a 4° durante toda la noche, en una solución con un volumen final de 2,5 µl, y que contenía el buffer 2x de ligación, el vector, el producto de PCR, la enzima T4 DNA ligasa y agua bidestilada. La cantidad de inserto o producto de PCR utilizada fue calculada para obtener una razón mínima de 1:1 entre el inserto y el vector en la solución de reacción final. La reacción de transformación se realizó por choque térmico utilizando las células competentes JM109 (Promega) con una incubación final de 1.5 horas a 37°C. Para estimar la eficiencia del procedimiento, por cada reacción de ligación se prepararon dos placas: una con 200 µl y otra con 20 µl, incubando a 37° por una noche. Se muestrearon 10 colonias por placa y se evaluó la eficiencia de la ligación mediante amplificación por PCR con partidores del plasmidio (T7 y SP6) y visualización

¹ Una muestra corresponde a saliva de C. de la Fuente (MH043).

en geles de agarosa de acuerdo a los tamaños estimados para el plasmidio con y sin inserto.

4.5 Análisis de secuencias

Las secuencias obtenidas fueron editadas y alineadas en Bioedit, incluyendo secuencias publicadas en GenBank. Se utilizó el programa DnaSP (DNA Sequence Polymorphism, Librado & Rozas, 2009) para calcular índices de diversidad molecular (π y θ)² e identificar los haplogrupos.

Se aplicaron tres métodos de inferencia filogenética: Neighbor-Joining (NJ), Máxima Parsimonia e Inferencia Bayesiana. El primero método reconstruye las relaciones filogenéticas en base a una matriz de distancias. Los valores de dicha matriz son una estimación de la distancia evolutiva entre las secuencias, calculados a partir del número de cambios. Este análisis se realizó en el programa MEGA 4.0.2 (Tamura *et al*, 2007) utilizando el modelo Kimura 2 parameter³ y un bootstrap de 500. El árbol construido por Máxima Parsimonia fue realizado en el programa PAUP 4.0b10 (Swofford, 2002). Este método busca el o los árboles que minimizan la cantidad de cambios evolutivos necesarios para explicar los datos disponibles. Se realizó una búsqueda heurística con un bootstrap igual a 100, y finalmente un árbol de consenso. El análisis bayesiano se ejecutó en el programa MrBayes v 3.1.2 (Huelsenbeck *et al*, 2001), utilizando ModelTest (Posada&Crandall, 1998; 2001) para obtener el modelo de evolución adecuado. Este análisis se basa en la probabilidad *a posteriori*, calculada para una hipótesis o árbol, en función de su probabilidad *a priori* y verosimilitud. La probabilidad *a posteriori* representa la probabilidad de que el árbol sea correcto, y este método busca el o los árboles que maximicen dicha probabilidad (Holder&Lewis, 2003). El cálculo fue realizado con un número de generaciones igual a 2 millones y muestreo cada 500.

Los árboles obtenidos mediante los distintos métodos fueron evaluados estadísticamente en el programa CONSEL mediante el test AU (Approximately unbiased test; Shimodaira & Hasegawa, 2001). Este programa calcula el valor de p de cada árbol mediante un bootstrap multi-escalado, utilizando una matriz de logaritmos de verosimilitud sitio a sitio

² π : Diversidad nucleotídica. Es el promedio de diferencias nucleotídicas entre pares de secuencias. θ : proporción de sitios nucleotídicos que se espera sean polimórficos. Calculado según la ecuación de Watterson (1975).

³ Modelo que considera distintas tasas de sustitución para transiciones y transversiones.

de cada árbol, generado previamente en PAUP. El bootstrap multi-escalado implica que cada set de réplicas de bootstrap considera distintos largos de secuencia en orden ascendente. Se mantuvieron los parámetros por defecto, realizando 10 set de 10.000 replicas de bootstrap de la matriz. La interpretación del test se realiza en base a un valor de p , en donde las topologías con valores menores a 0.05 son rechazadas.

5. RESULTADOS

Para evaluar la cantidad y estado del DNA extraído se realizaron gels de DNA genómico en algunas muestras de tártaro actual y antiguo. La Figura 5 permite observar el contraste entre el DNA extraído de muestras antiguas y actuales, advirtiéndose en las primeras un avanzado estado de degradación y fragmentación. En el tártaro actual la situación es variable, pero la mayoría muestra un buen estado de conservación.

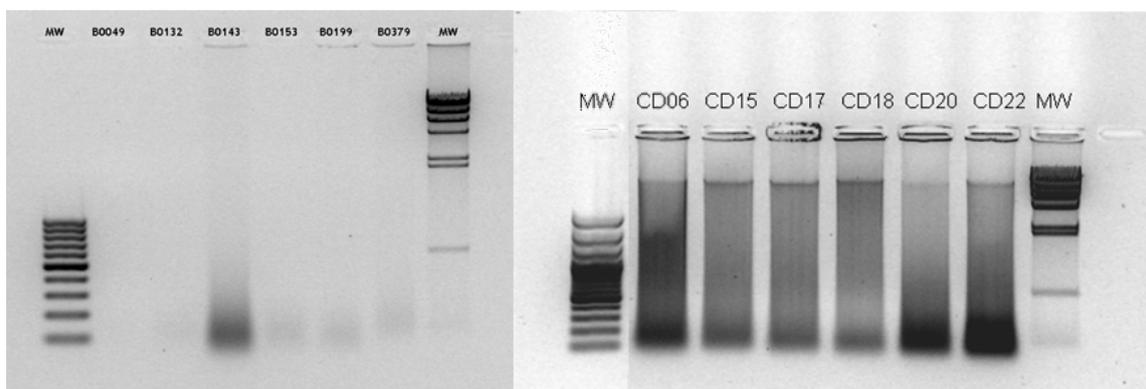


Figura 5: Gel DNA genómico. A la izquierda, gel de DNA genómico de muestras de Cementerio General. A la derecha, gel de DNA genómico para muestras de tártaro actual.

5.1 Identificación por PCR

Se analizaron un total de 72 muestras de cálculo dental: 39 correspondientes a individuos actuales y 33 a restos bioantropológicos. De las primeras, en el 100% fue posible identificar al menos una bacteria, mientras que en las antiguas 11 (33,3%). En ambos set de muestras, la bacteria con mayor número de amplificadas fue *F. nucleatum*, en un 100% de las muestras actuales y 30,3% (10) de las antiguas. La bacteria identificada en menor frecuencia fue *S. mutans*, en 15 muestras actuales y 1 antigua (tabla 3).

Tabla 3: Número de muestras con amplificadas para cada bacterias.

	N	<i>A. naeslundii</i>	<i>F. nucleatum</i>	<i>S. gordonii</i>	<i>S. mutans</i>	<i>P. gingivalis</i>
Actual	39	32	39	37	15	25
Antiguo	33	2	10	6	1	6

De las 11 muestras de colecciones bioantropológicas que rindieron amplificadas, 6 corresponden a muestras provenientes de la colección Chono o de sitios del sur, en su mayoría con dos o tres bacterias identificadas. Sólo una muestra de las colecciones arqueológicas nortinas presenta amplificadas, para las bacterias *F. nucleatum* y *S. gordonii*. Las muestras restantes (4) corresponden a la colección Cementerio General (tabla 4).

Tabla 4: Bacterias amplificadas en restos bioantropológicos.

Muestra*	Colección/Sitio	<i>A. naeslundii</i>	<i>F. nucleatum</i>	<i>P. gingivalis</i>	<i>S. gordonii</i>	<i>S. mutans</i>
B0095	Cementerio General	x	x	x	x	
B0219	Cementerio General		x			
B0233	Cementerio General		x	x	x	
B0339	Cementerio General		x			
B0495	Pica-8		x		x	
C27	Chono		x	x	x	
CH1	Chono		x		x	
CH3	Chono	x	x			x
CH4	Chono			x		
RB02	Río Bote 1		x	x	x	
IP11	Ayayema		x	x		
Total (%)		2 (6.06)	10 (30.3)	6 (18.18)	6 (18.18)	1 (3.03)

* Sólo muestras que amplificaron.

5.2 Análisis de secuencias

Se obtuvieron 56 secuencias para cuatro bacterias: 18 para *F. nucleatum*, 16 de *S. gordonii*, 11 de *P. gingivalis* y 10 de *A. naeslundii*. De estas secuencias, 37 corresponde a muestras de tártaro actual y 19 a restos bioantropológicos. Fueron editadas en Bioedit y analizadas junto a las secuencias disponibles para cada bacteria en GenBank con el programa DnaSP.

Para *F. nucleatum* se utilizaron 25 secuencias en total: 7 publicadas, 10 de individuos actuales y 8 de restos bioantropológicos. El análisis de los cromatogramas de estas secuencias permitió observar peaks dobles en los sitios variables, sugiriendo la presencia simultánea de más de una variante de la bacteria en un mismo individuo (Figura 6).

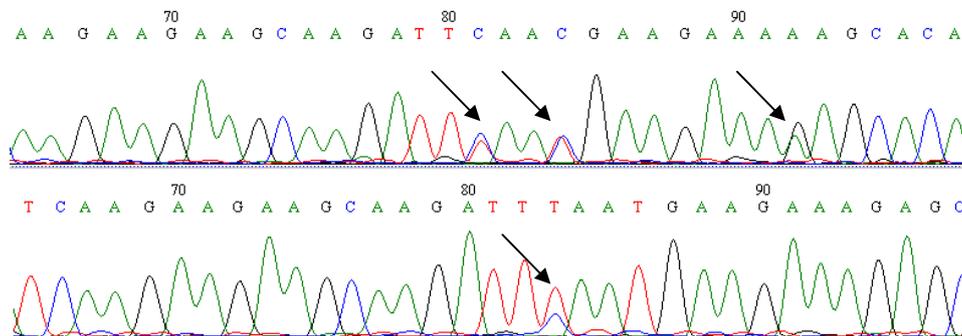


Figura 6: Cromatogramas de fragmento secuenciado en *F. nucleatum*. Imagen superior corresponde a muestra de tártaro sub-actual (B0339) y la inferior a tártaro actual (1B). En ambos casos se observan peaks dobles (señalados con flecha), sugiriendo la presencia de por lo menos dos variantes de la bacteria en una misma muestra.

Con el objetivo de identificar estas variantes, se clonaron 8 muestras de tártaro actual y antiguo, incluyendo una muestra de saliva de quien realizó los análisis. Por reacción de ligación se muestrearon y secuenciaron 5 colonias, obteniendo un total de 40 secuencias. A partir de ellas se caracterizaron 10 variantes, según los cambios nucleotídicos indicados en la tabla 5. Finalmente se identificó el número mínimo de variantes necesarias (dos o tres) para resolver el patrón de dobles peaks de las muestras restantes, permitiendo aislar estos tipos.

Tabla 5: Variantes identificadas en *F. nucleatum*. Se indican los cambios que caracterizan a cada variante y el número de secuencias identificadas por cada una.

Variantes	127	137	141	144	152	165	168	173	181	184	207	211	N
1	G	G	T	T	G	C	T	G	C	G	G	T	13
2			C						T				5
3									T		A		1
4			C										5
5				C	A	T		A					3
6					A	T	C	A					2
7						T		A					3
8								A					4
9												A	1
10	A	A								A			1
Total													46*

* Secuencias dentro de una variante y provenientes de la misma muestra fueron consideradas sólo una vez. Se muestran solo los sitios diagnósticos para cada variante.

Se analizó un fragmento de 166bp, identificando 19 sitios variables, de los cuales 12 son informativos. De ellos, dos son no sinónimos y producen un cambio en la secuencia aminoacídica. La diversidad nucleotídica (π) para dicho fragmento fue de 0.029 y se calculó un promedio de diferencias nucleotídicas (k) igual a 3.373. Los sitios variables (informativos) fueron identificados en las cepas publicadas, las secuencias de tártaro actual y antiguo, sin presentar diferencias según el origen o data de las muestras, excepto en su frecuencia, y corresponden a los mismos sitios que presenta dobles peaks en los cromatogramas.

En *A. naeslundii* se analizó un fragmento de 179bp en 11 secuencias (9 de tártaro actual y 1 sub-actual), sin identificar sitios variables. Para *P. gingivalis* se analizaron 28 secuencias, 17 publicadas, 6 de individuos actuales y 5 de restos bioantropológicos. En un fragmento de 166bp se identificaron 3 sitios variables, correspondiente a cambios en una sola secuencia. Finalmente, para *S. gordonii* se utilizaron 17 secuencias (11 de tártaro actual y 5 antiguo). Se analizó un fragmento de 166bp en donde se identificaron 4 sitios variables, solo 2 informativos. Los resultados de estos análisis se resumen en la tabla 6.

Tabla 6: Resumen secuencias analizadas e índices de diversidad molecular

Bacteria	Tamaño Fragmento	Secuencias analizadas	Sitios Variables	Número de haplotipos (Hd)	π	θ
<i>A. naeslundii</i>	179bp	11	0	1 (0)	0	0
<i>F. nucleatum</i>	166bp	46	19	16 (0.882)	0.029	0.034
<i>P. gingivalis</i>	166bp	28	3	4 (0.206)	0.004	0.015
<i>S. gordonii</i>	166bp	17	4	6 (0.831)	0.011	0.013

π :diversidad nucleotídica; θ :Theta; Hd: diversidad haplotípica.

5.3 *Fusobacterium nucleatum*

Considerando que *F. nucleatum* es la bacteria que presenta mejor rendimiento, tanto en tártaro actual como antiguo, se evaluó su presencia en 40 muestras de saliva, correspondientes a individuos actuales residentes en Santiago (N=20), Provincia de Aconcagua (N=10) y alrededores de Temuco (N=10). Se obtuvieron 39 amplificadas que fueron secuenciadas para evaluar la variabilidad del fragmento. Las secuencias muestran

los mismos polimorfismos identificados en las bacterias de tártaro y nuevamente es posible observar en los cromatogramas peaks dobles en los sitios variables, reforzando la hipótesis de la presencia simultánea de distintas variantes de la bacteria en un mismo individuo. Según las variantes definidas anteriormente, más una caracterizada en las secuencias de saliva, se identificó el número de variantes mínimo para explicar el patrón de dobles peaks observado en las secuencias que presentaban más de una señal en los cromatogramas. Se aislaron dos o tres variantes por muestra obteniendo en total 81 secuencias (anexo 1).

Se realizó un nuevo análisis con el total de secuencias disponibles online y obtenidas de saliva y tártaro para *F.nucleatum* (N=128), identificando 19 sitios polimórficos, 13 de ellos informativos. La diversidad nucleotídica (π) en este set de datos fue de 0.024 y el k de 2.793, menor a lo observado en el grupo de secuencias iniciales. El análisis de los datos excluyendo las secuencias de tártaro antiguo muestra valores de diversidad molecular aun menores a los obtenidos para el total de secuencias. Los valores para los tres set de muestras se presentan en la tabla 7.

Tabla 7: Índices de diversidad molecular en distintos grupos de muestras.

Muestra (N*)	Variantes	Sitios variables	H (Hd)	(π)	θ	K
Grupo 1 (46)	10	19	16 (0.882)	0.029	0.034	3.373
Grupo 2 (131)	12	19	20 (0.889)	0.024	0.031	2.793
Grupo 3 (117)	10	13	16 (0.879)	0.022	0.021	2.591

H: haplotipos; Hd: diversidad haplotípica; π : diversidad nucleotídicas; θ : theta. K: promedio de diferencias nucleotídicas entre pares de secuencias.

Grupo 1: muestras de tártaro y publicadas; Grupo 2: muestras de tártaro, publicadas y saliva; Grupo 3: solo actuales (publicadas, saliva y tártaro). * Secuencias clonadas de una misma variante y provenientes de la misma muestra fueron consideradas sólo una vez.

5.4 Análisis filogenéticos

Considerando el número de muestras y diversidad de las secuencias, los análisis filogenéticos fueron realizados sólo para *F. nucleatum*, incluyendo como outgroup a la especie *Fusobacterium simiae*, bacteria encontrada en la placa dental de simios.

Se obtuvieron 3 árboles consenso, uno según cada método (anexo 2, 3 y 4). Por máxima parsimonia se generaron 100 árboles y por inferencia bayesiana 4001, a partir de los cuales se construyeron los árboles de consenso respectivos utilizando el criterio de

majority rule. En ambos casos la topología y relación entre las taxa fue similar, con la mayor parte de los nodos sin resolver (anexo 3 y 4). Esta situación sugiere que los datos son insuficientes para resolver las relaciones genéticas entre las muestras.

La evaluación estadística de los árboles en CONSEL permite rechazar las topologías generadas mediante Inferencia Bayesiana y Máxima Parsimonia, al nivel de significancia de 0.05, mientras que el árbol de Neighbor-Joining se presenta como la hipótesis más probable de acuerdo a los datos, con un valor de p igual a 1 en el test AU (tabla 8).

Tabla 8: Resultados de Consel, valor de p test AU

Árbol	AU
Distancia	1
Inferencia Bayesiana	2×10^{-60}
Máxima Parsimonia	1×10^{-5}

El árbol de distancias permite identificar ciertos clusters que si bien no tienen un correlato geográfico, son congruentes con la caracterización de las variantes (Figura 7). Las secuencias publicadas (GenBank) y que han sido identificadas como subespecies se distribuyen en el árbol de distancias de manera similar a lo observado en otros estudios, donde las subespecies *fusiforme* y *vincentii* están estrechamente relacionadas, mientras que la subespecie *polymorphum* se encuentra a mayor distancia (Kim *et al*, 2010). En la clasificación por variantes, la subespecie *nucleatum* forma parte de la variante 4, *fusiform* de la variante 5, *vincentii* de la variante 6 y *polymorphum* de la 1.

La composición de cada variante es diversa, incluyendo secuencias de tártaro antiguo, actual y saliva en la mayoría de los casos, y su distribución no permite advertir un patrón geográfico o temporal, así como tampoco su frecuencia. Al incluir las secuencias obtenidas de saliva se identificó una nueva variante y se observó un cambio en la frecuencia de las anteriores, pero que no se relaciona con el origen de las muestras. Dos variantes fueron identificadas sólo en muestras de tártaro antiguo mediante clonación (Ch1 e IP11). Sin embargo, en función de su distribución podrían formar parte de la variante 1.

A nivel molecular, la diversidad dentro de las variantes es baja o nula. Incluso al evaluar la diversidad molecular entre las subespecies publicadas y *F. simiae*, se observa una baja diversidad entre ambas especies, con un número de diferencias nucleotídicas de 6 (Figura 8), confirmando que el fragmento o gen utilizado es altamente conservado.

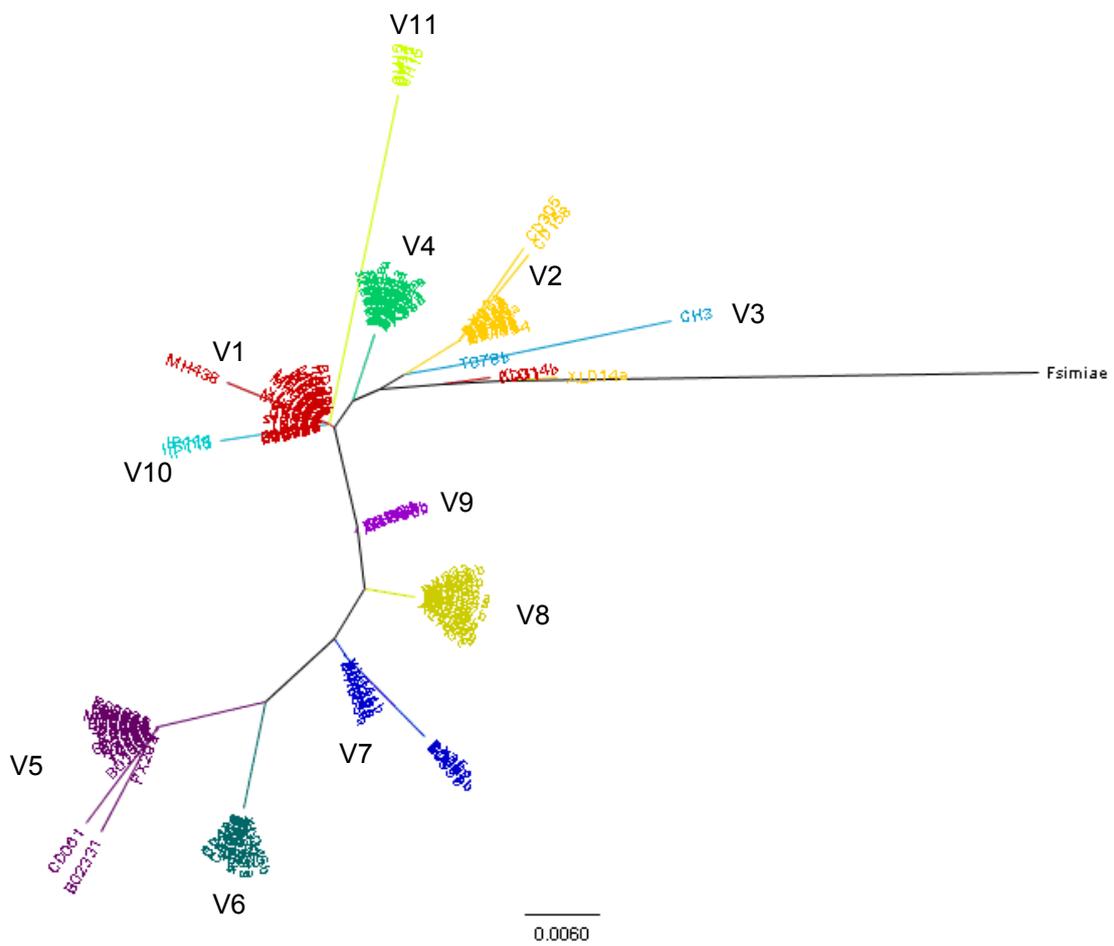


Figura 7: Neighbord-Joining. Árbol sin raíz construido en el programa MEGA utilizando el modelo de sustitución nucleotídicas Kimura 2-P. Las variantes (V) son señaladas en color y con el número respectivo.

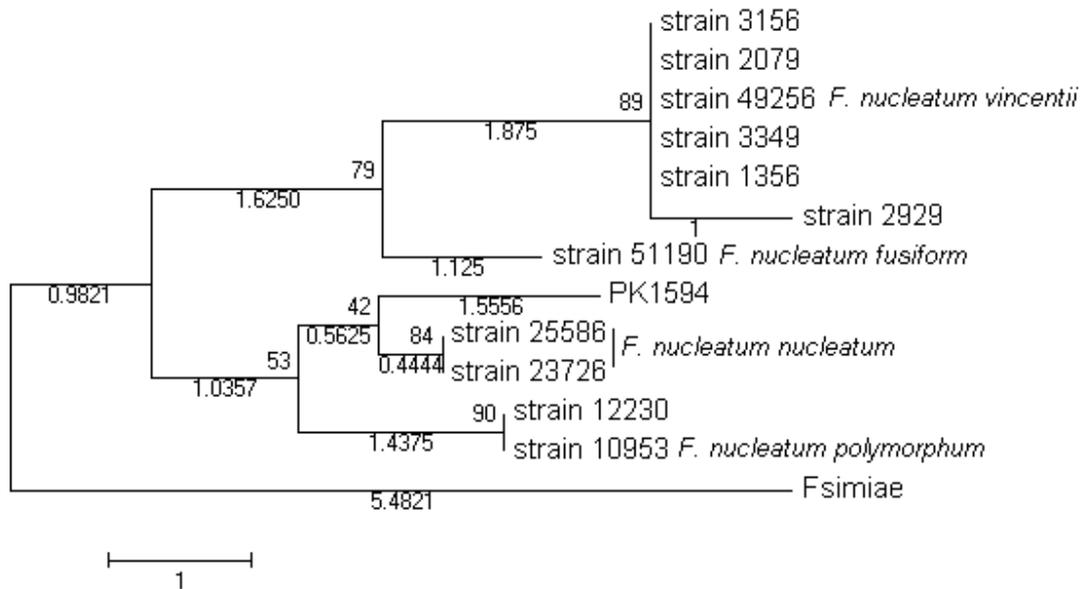


Figura 8: Neighbor-Joining de secuencias publicadas. Neighbor-Joining construido en MEGA señalando el número de diferencias nucleotídicas entre secuencias. Se indican las variantes que han sido identificadas como subespecies.

Las relaciones entre las variantes también fueron analizadas a partir de un network o red filogenética, ejecutado en el programa Network 4.5.1.6. (Bandelt *et al*, 1995). Esta (re)construcción se basa en el criterio de máxima parsimonia y se realizó con el algoritmo de median-joining. Cada círculo representa un haplotipos y el tamaño su frecuencia, mientras que los números en rojo indican los cambios nucleotídicos asociados a dicho haplotipos (Figura 9). La variante 1, identificada con mayor frecuencia, se ubica al centro del network, desde donde se diversifican las variantes 4, 9, 10 y 11. El cambio en el sitio 141, presente en las variantes 4 y 2, sufre una reversión en la variante 3, mientras que la transición en el sitio 165 ocurre en dos ocasiones, en la variante 7 y hacia la 5 y 6. Estas dos ultimas variantes están conectadas por un *median vector*, que representa una secuencia hipotética necesaria para vincular las secuencias existentes (Bandelt *et al*, 1999).

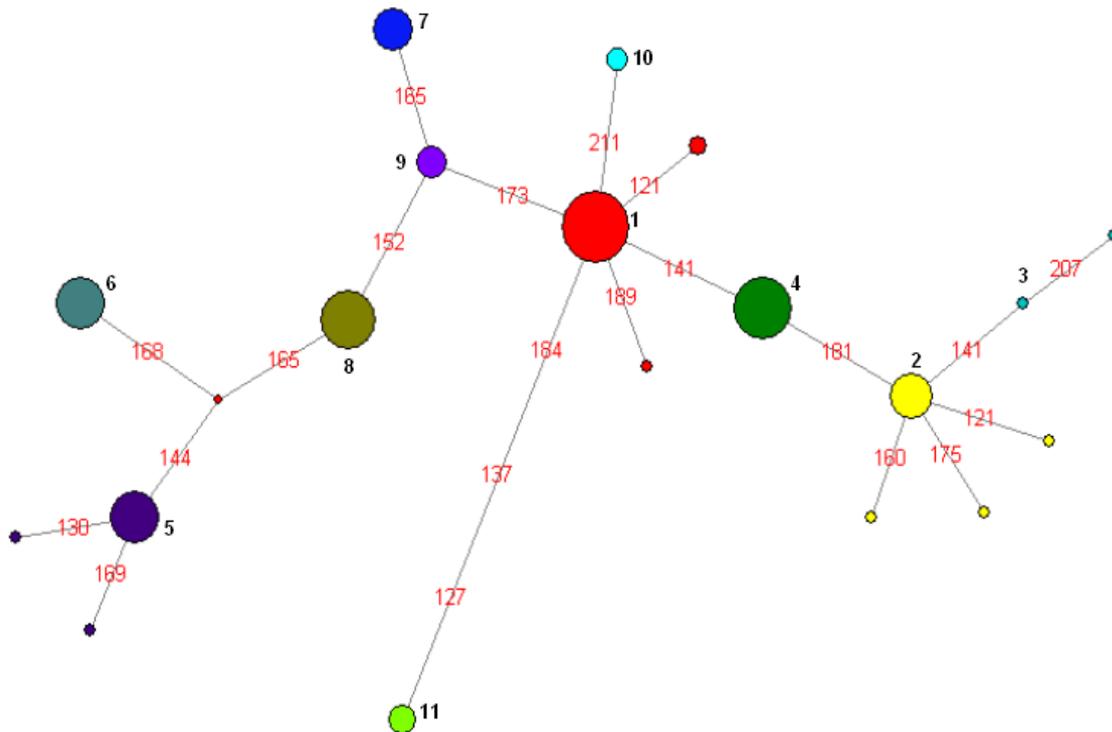


Figura 10: Network. Reconstrucción de red filogenética entre las variantes de *F. nucleatum* realizada en el programa Network 4.5.1.6 utilizando el algoritmo de median-joining. Los colores indican las distintas variantes identificadas en este trabajo y los números en rojo los cambios nucleotídicos asociados. El tamaño de cada círculo es proporcional a la frecuencia de cada variante.

En un segundo Network (Figura 11) se muestra la distribución de los distintos haplotipos en tártaro y saliva. No se aprecian sesgos importantes en la composición de cada haplotipo, y sólo unos pocos casos se identifican únicamente en saliva o tártaro. Esta última situación se observa con mayor frecuencia, probablemente debido a la diversidad temporal y geográfica de las muestras de cálculo dental.

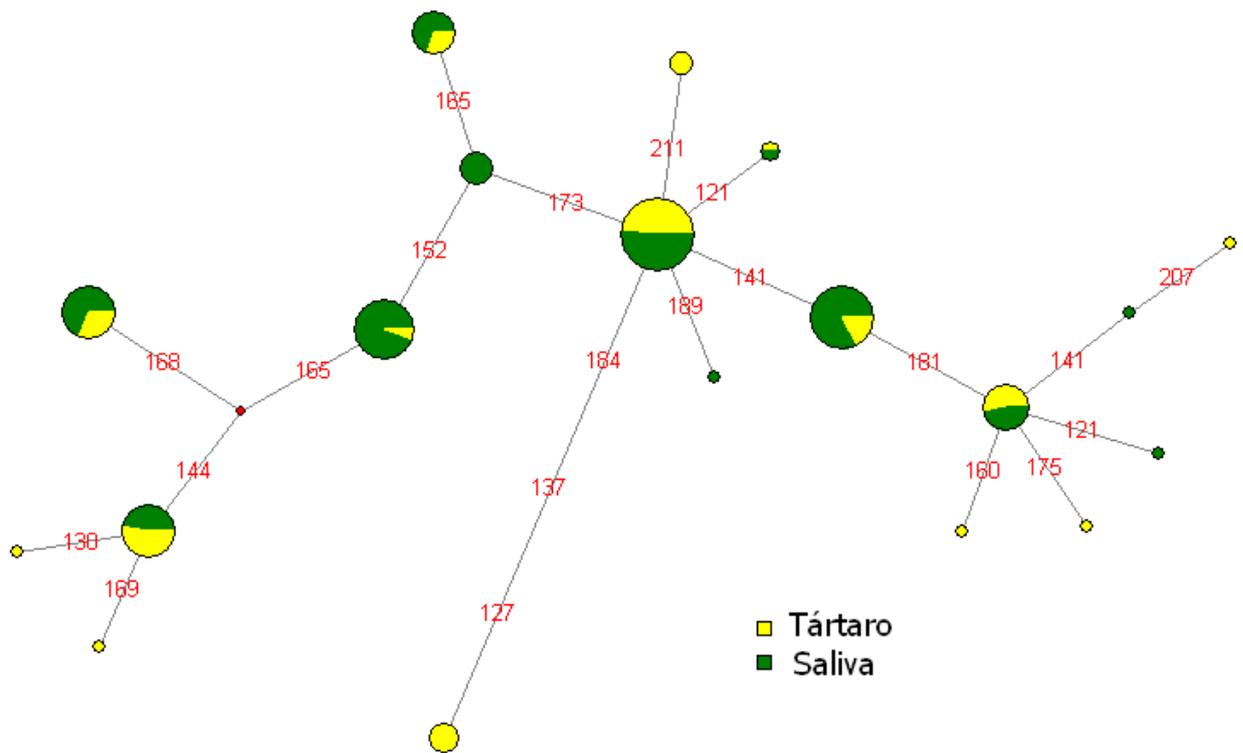


Figura 11: Network. Se indica la distribución de los haplotipos en tártaro (amarillo) y saliva (verde). Cada círculo representa un haplotipos y el tamaño su frecuencia. Los números en rojo indican los cambios nucleotídicos asociados a cada haplotipos.

Finalmente, en la Figura 12, se indica la distribución geográfica de cada haplotipo, eliminando el factor temporal (muestras antiguas). Se observa que cada haplotipo tiene una composición muy diversa, sin evidenciar una tendencia geográfica.

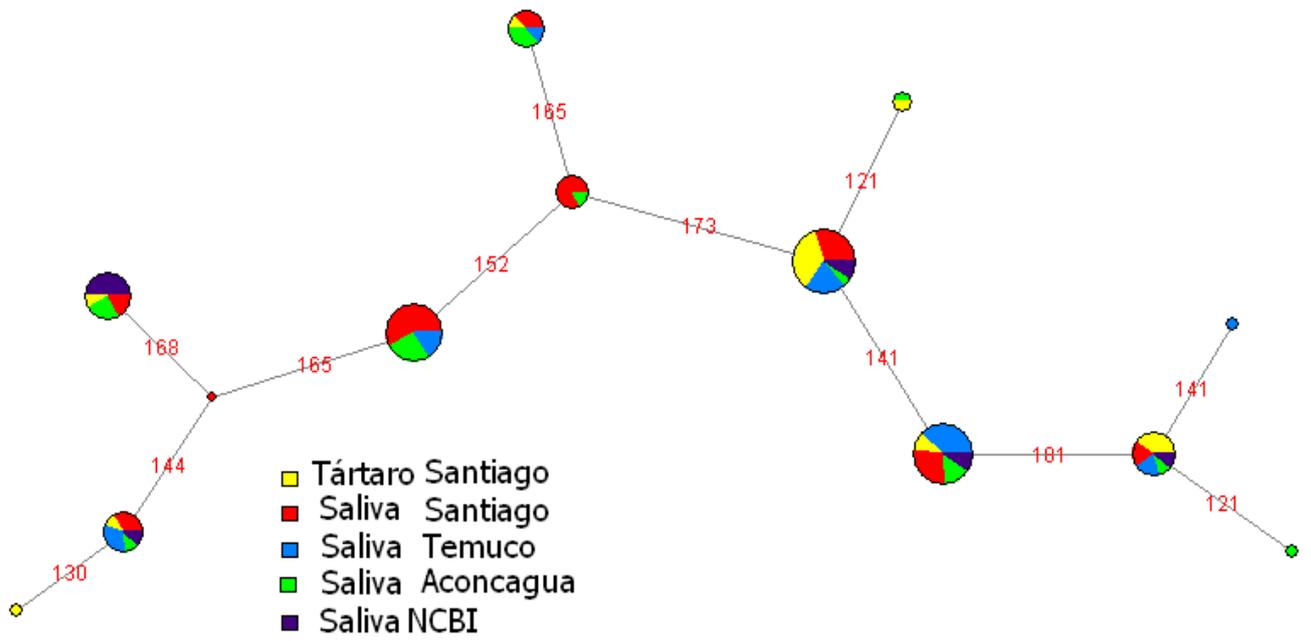


Figura 12: Network. Se indica la distribución de los haplotipos según lugar geográfico.

6. DISCUSIÓN

La técnica de extracción implementada permitió la amplificación de DNA bacteriano y obtención de secuencias desde tártaro dental en un grupo diverso de muestras, que incluyó individuos actuales y restos bioantropológicos de hasta 4000 años de antigüedad. Esta técnica no había sido aplicada previamente en tártaro, y por lo tanto constituye el primer antecedente para el estudio molecular de bacterias orales en restos antiguos. Las diferencias en el rendimiento de la extracción, ilustradas mediante los geles de DNA genómico, y amplificación por PCR, pueden ser entendidas en función de las características de la muestra. Por un lado, los procesos de degradación endógenos y exógenos del material genético que tienen lugar con el paso del tiempo, también afectan el DNA de bacterias conservadas en el tártaro dental de individuos arqueológicos, dificultando la recuperación de su DNA. Mediante técnicas de microscopía se han observado bacterias con pared celular en aparente buen estado de preservación (Linossier *et al*, 1996), pero la conservación estructural de la bacteria no implica la conservación de su material genético. En este sentido, el rendimiento de la extracción y amplificación en muestras antiguas fue menor, pero consistente con la data de los restos. En el caso de las muestras nortinas, estudios de DNA antiguo han indicado que existe una mayor frecuencia o predisposición de los restos conservados en ambientes secos y áridos, al daño oxidativo y formación de enlaces cruzados, bloqueando la acción de la polimerasa durante el PCR o generando artefactos en las secuencias (Gilbert *et al*, 2003). En función de este antecedente, es posible comprender el menor rendimiento de dichas muestras.

Por otro lado, es necesario considerar la influencia de la dieta, hábitos de higiene y costumbres en la constitución de la flora oral y por tanto, en la conservación de las bacterias en el tártaro. Por microscopía, se han identificado diferencias en los morfotipos bacterianos entre poblaciones con distintos patrones de subsistencia, encontrando una mayor diversidad en grupos agricultores *versus* cazadores-recolectores (Linossier *et al*, 1996). Siendo la dieta uno de los factores involucrados en el ambiente de la cavidad oral y potencialmente en su constitución bacteriana, las diferencias en los patrones de subsistencia entre poblaciones podrían afectar la presencia y frecuencia de ciertas especies bacterianas. Sin embargo, por el pequeño tamaño de la muestra no es posible evaluar este aspecto en mayor profundidad. Aunque las cinco bacterias fueron

identificadas en por lo menos una muestra antigua, es importante considerar que la elección de estas especies fue realizada en base a estudios de placa dental actual, en individuos con dietas muy diversas que podrían determinar una mayor diversidad bacteriana, no observada en poblaciones arqueológicas.

Finalmente, se espera que las eventuales diferencias en la flora bacteriana debido a costumbres, como el procesamiento de material vegetal con los dientes -uso parafuncional- o consumo de tabaco, y prácticas de higiene oral, influyan esencialmente en la predisposición a desarrollar patologías -por cambios ecológicos en la cavidad oral que determinen un aumento de especies patológicas- o en la formación de cálculo dental, y no en la flora oral normal. De acuerdo al planteamiento inicial de este trabajo, se asume que ciertas bacterias han co-habitado con la especie humana por un período prolongado de tiempo, de modo que es posible utilizarlas como marcador genético indirecto de las poblaciones hospederas. En este sentido, se espera que las costumbres y prácticas de higiene involucren principalmente un cambio en las frecuencias de las bacterias, y no así en su presencia o ausencia.

En relación a la variabilidad de las bacterias, los genes o fragmentos analizados parecen ser altamente conservados. Incluso el que presentó mayor diversidad, *fadA*, muestra escasa variación entre especies del género *Fusobacterium* (*nucleatum* y *simiae*). Se observó que la variación de este fragmento no se encuentra geográfica o temporalmente estructurada, pero la agrupación en clusters fue consistente con la diferenciación previa de variantes. Conforme a los dobles peaks observados sólo en los sitios variables, se sugirió la presencia de distintas variantes en un mismo individuo, las que fueron caracterizadas mediante clonación. Se descartó que esta situación fuese producto de contaminación o daño oxidativo debido a su recurrencia en secuencias tanto actuales como antiguas, siendo además reportada en otros estudios mediante la identificación molecular de subespecies de *F. nucleatum* (Kim *et al*, 2010). Sin embargo, los resultados de la clonación no permitieron en todos los casos resolver el patrón de dobles peaks observados, por limitaciones inherentes al número de colonias muestreadas por placa.

De las 11 variantes asignadas, dos fueron identificadas exclusivamente en tártaro antiguo y una en saliva. Las ocho restantes presentan una composición diversa, y no se advierten diferencias significativas entre las bacterias secuenciadas de saliva y tártaro. La asignación de estas variantes y la relación genética entre ellas es consistente con lo planteado para las subespecies utilizando otros genes de la bacteria (Kim *et al*, 2010),

sugiriendo que el fragmento analizado podría servir para diferenciar subespecies en *F. nucleatum*. Sin embargo, los valores de bootstrap obtenidos muestran un bajo soporte en la mayoría de los nodos (Anexo 2). Particularmente, el bajo valor de bootstrap (19%) entre las variantes 2 y 3 permitiría cuestionar esta distinción, asumiendo que forman parte de una sola variante. Lo mismo ocurre con las variantes 10 y 11 en relación a la variante 1. Las variantes que presentan mayor soporte son las 5, 6 y 7, con valores de bootstrap cercanos a 50. Si bien estos valores son bajos respecto a otros estudios (sobre el 80%), se explican en función de la poca diversidad observada en el fragmento de DNA analizado, incluso a nivel de género.

La relación genética entre las variantes también fue abordada mediante un network. Este tipo de gráficos permite analizar no sólo las relaciones ancestro-descendiente, sino además la relación entre secuencias estrechamente relacionadas, de modo que es posible inferir eventos como la transferencia horizontal de genes y homoplasias. En este caso, la identificación de caracteres ancestrales y derivados se ve dificultada por la escasa información y secuencias del gen analizado en otras especies, cercanas o del género *Fusobacterium*.

En el network, la baja diversidad del fragmento analizado se ve reflejada en los pocos cambios nucleotídicos que diferencian a las variantes, siendo definidas principalmente por su frecuencia. Junto con ello, se observa la baja variabilidad dentro de cada variante. La variante 2 es la que presenta una mayor diversidad, situación que junto con la baja frecuencia de la 3, permitiría reafirmar que conforman un solo grupo. Esta última variante está representada por solo dos secuencias y según el network podría estar caracterizada por una reversión en el sitio 141. Por otro lado, la relación entre las variantes 5, 6, 7, 8 y 9 fue resuelta mediante la transición en el sitio 165, observada en las variantes 5, 6 y 7, y que podría corresponder a una homoplasia.

En relación a la diversidad molecular del conjunto de datos, se obtuvieron distintos valores según las secuencias utilizadas en el análisis. La menor diversidad fue calculada al excluir las secuencias de tártaro sub-actual y arqueológico. Estas muestras son más heterogéneas en términos geográficos y temporales que las restantes, obtenidas de tártaro o saliva de individuos actuales, situación que permitiría explicar la disminución de diversidad.

Siendo *F. nucleatum* la bacteria identificada con mayor frecuencia en los distintos contextos, se sugiere profundizar en su diversidad genética. La variación geográfica o poblacional de esta bacteria no ha sido evaluada anteriormente y su estudio se ha

limitado a las propiedades de co-agregación o influencia en condiciones patológicas (Kapatral *et al*, 2002; Han *et al*, 2005). Sin embargo, la caracterización de sub-especies o cepas podría contribuir en la evaluación de la bacteria utilizando un enfoque poblacional. Además, sería recomendable evaluar la señal filogenética de otros genes que presenten mayor variabilidad en la especie.

7. CONCLUSIONES

Este trabajo constituye una primera aproximación al estudio de la diversidad bacteriana en cálculo dental. Efectivamente el tártaro se presenta como una fuente privilegiada de DNA bacteriano, proyectando su análisis en estudios poblacionales o paleopatológicos, siendo la extracción y amplificación de DNA de bacterias orales posible en el 100% de los casos actuales y 33% de los antiguos. Los resultados obtenidos contribuyen no sólo al análisis molecular del microbioma humano, sino que también permitieron consolidar una técnica de análisis poco destructiva para evaluar la flora bacteriana de la cavidad oral, condición favorable al trabajar con material bioantropológico fragmentario y de gran valor patrimonial.

Esta técnica puede servir a diversos objetivos, tanto a la búsqueda de marcadores genéticos indirectos de poblaciones humanas, como al estudio evolutivo de las mismas bacterias, análisis paleopatológicos, de zoonosis (en conjunto con el proceso de domesticación) y dieta.

En función de los fragmentos de DNA analizados, la segunda hipótesis de trabajo es rechazada. No se descarta que esta hipótesis pueda ser validada mediante otros genes o bacterias, pero los fragmentos de DNA utilizados en este trabajo son altamente conservados en cada especie y no permitieron diferenciar geográfica o temporalmente a las muestras. Sin embargo, conocer la frecuencia de estas cinco bacterias en tártaro actual y antiguo permitió identificar preliminarmente a la bacteria que presenta mejor rendimiento, principalmente en restos antiguos. De esta manera, continuando con este enfoque, será posible analizar la diversidad genética de dicha bacteria (*Fusobacterium nucleatum*) y su señal filogenética, evaluando luego su utilidad para inferir la historia micro-evolutiva de las poblaciones humanas hospederas.

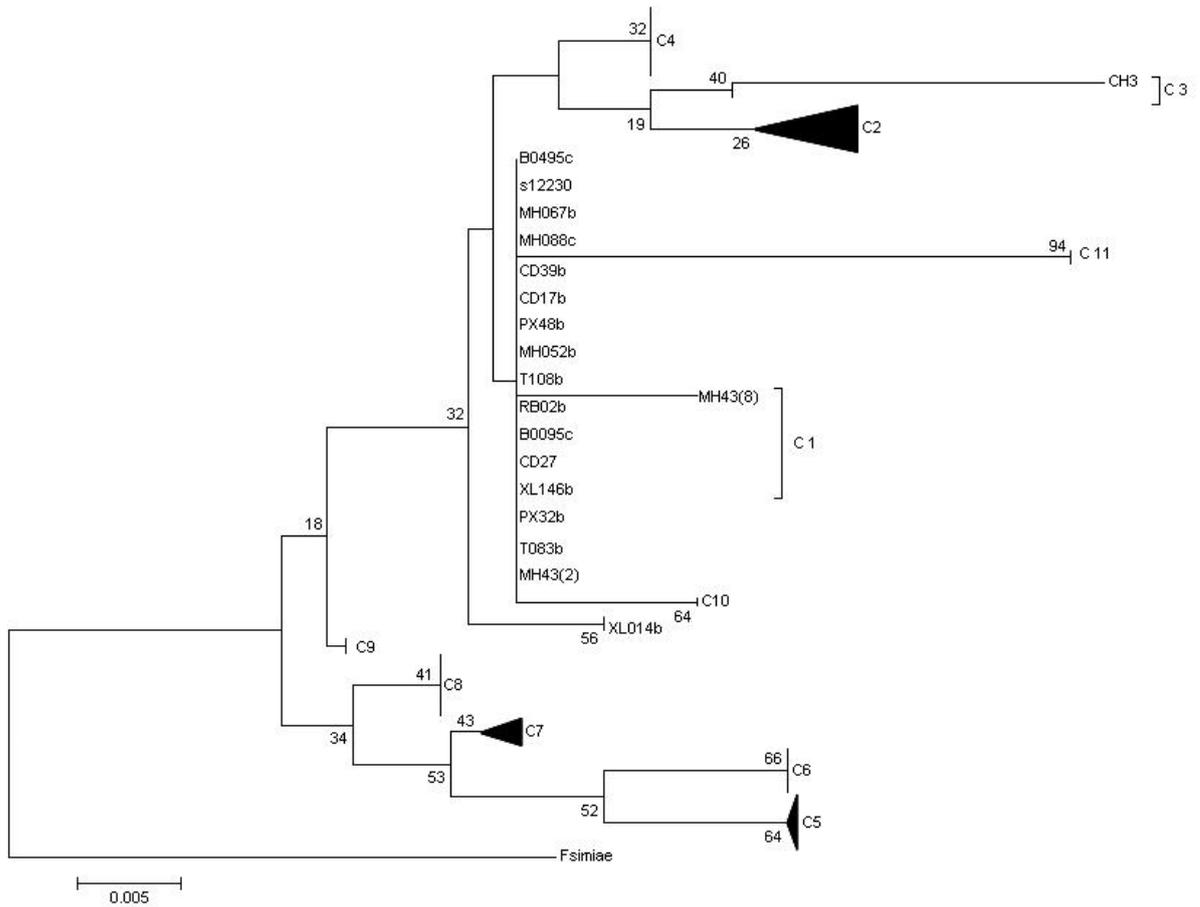
8. ANEXOS

1. Variantes caracterizadas en *F. nucleatum*. Se indican los cambios que caracterizan a las variantes y las muestras asociadas a cada una.

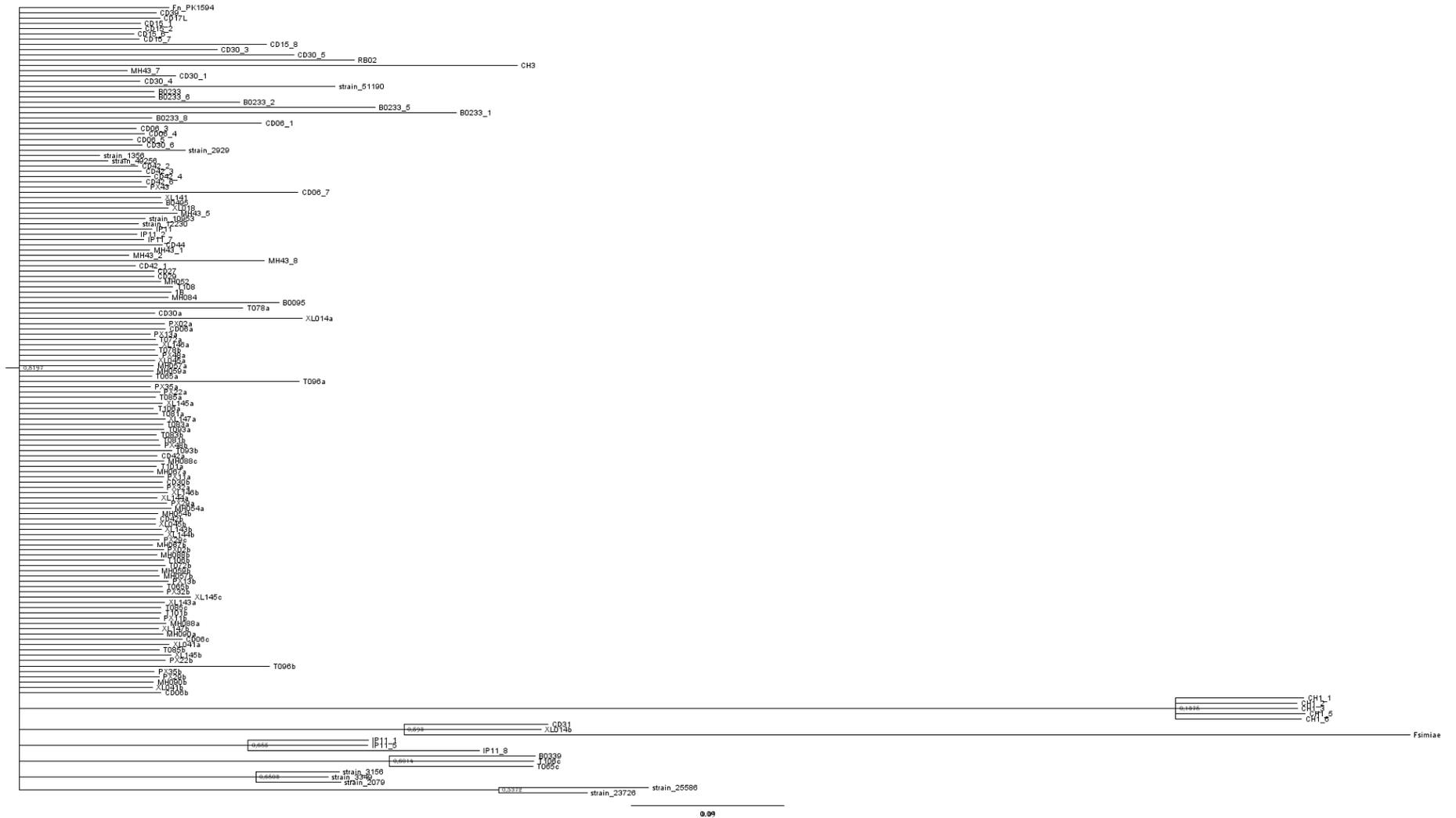
V	127	137	141	144	152	165	168	173	181	184	211	N*	Secuencias
1	G	G	T	T	G	C	T	G	C	G	T	29	s10953, s12230, PX11b, 1Bb, B0495c, MH052b, B0095c, CD17b, CD27, CD29, CD30b, CD31, MH088c, CD39b, PX32b, PX48b, RB02b, T081b, XL146b, T083b, T093b, T101b, T108b, XL014b, MH067b, CD42b, CD42-1, IP11-2, IP11-7, MH43-1, MH43-2, MH43-8, CD44
2			C						T			12	PK1594, CD17a, CD15a, CD30a, CD39a, PX02a, PX13a, RB02a, XL014a, T072a, XL146a, T078a, CD15-1, CD15-2, CD15-6, CD15-7, CD15-8, CD30-3, CD30-5
3									T			2	CH3, T078b
4			C									24	s25586, s23726, 1Ba, CD15b, B0339a, PX22a, PX35a, MH057a, MH059a, PX45a, T065a, T083a, T093a, T085a, T106a, T096a, T108a, XL145a, XL147a, XL045a, T081a, PX48a, CD30-1, CD30-4, MH43-7
5				C	A	T		A				14	s51190, B0095a, MH090a, PX29a, PX45b, PX35b, T065b, B0339b, T096b, T106b, XL041a, B0233-1, B0233-2, B0233-5, B0233-6, B0233-8, CD06-1, CD06-3, CD06-4, CD06-5, CD30-6
6					A	T	C	A				12	s3349, s3156, s2929, s2079, s1356, s49256, PX29b, XL045b, XL143a, XL144a, PX43, CD42-2, CD42-3, CD42-4, CD42-6, CD42a
7						T		A				10	CD06-7, B0095b, PX35c, T085b, PX22b, MH088a, XL145b, XL147b, B0495a, XL041b
8					A			A				21	XL018, B0495b, XL143b, XL145c, XL147c, MH057b, PX11a, XL141, PX02b, MH088b, MH059b, PX32a, T085c, T101a, T072b, PX13b, PX22c, MH067a, MH052a, MH43-5, MH054a
9								A				5	MH084, MH054b, MH090b, XL144b, PX29c
10											A	1	IP11-1, IP11-5, IP11-8
11	A	A								A		1	CH1-1, CH1-2, CH1-3, CH1-5, CH1-6

* Secuencias dentro de una variante y provenientes de la misma muestra fueron consideradas sólo una vez. s: secuencias publicadas; PX, XL, MH y T: secuencias de saliva. CD: secuencias de tártaro actual. Se muestran solo los sitios diagnósticos, identificados en más de una secuencia o colonia.

2. Neighbord-Joining. Árbol construido en MEGA utilizando el método de Neighbord-Joining. Se utilizó el modelo de sustitución nucleotídicas Kimura 2-P y un bootstrap de 500 (sólo se indican los valores de bootstrap mayores a 15).



4. Árbol obtenido mediante inferencia bayesiana. El árbol fue realizado en el programa MrBayes utilizando el modelo GTR+I+G. Se muestra el árbol de consenso obtenido con el criterio de majority rule.



5. Total de secuencias y sitios variables analizados. Las letras a, b y c permiten diferencias las distintas variantes presentes en una misma muestra, mientras que el guión y número distinguen a los clones.

	114	121	127	130	137	141	144	152	160	165	168	169	173	175	181	184	189	207	211
s12230	C	A	G	G	G	T	T	G	G	C	T	G	G	C	C	G	A	T	T
PX11b																			
1Bb																			
B0495c																			
MH052b																			
B0095c																			
CD17b																			
CD27																			
CD29																			
CD31		T																	
MH088c																			
CD39b																			
PX32b																			
PX48b																			
RB02b																			
T081b																			
XL146b																			
T083b																			
T093b																			
T101b																			
T108b																			
XL014b		T																	
MH067b																			
CD42b																			
CD42-1																			
IP11-2																			
IP11-7																			
MH43-1																			
MH43-2																			
MH43-8																	G		
CD44																			
PK1594						C									T				
CD17a						C									T				
CD15a						C									T				
CD39a						C									T				
PX02a						C									T				
PX13a						C									T				
RB02a						C									T				
XL014a		T				C									T				
T072a						C									T				
XL146a						C									T				
T078a						C									T				
CH3	T														T				C

PX35c										T			A						
T085b										T			A						
PX22b										T			A						
MH088a										T			A						
XL145b										T			A						
XL147b										T			A						
B0495a										T			A						
XL041b										T			A						
XL018									A				A						
B0495b									A				A						
XL143b									A				A						
XL145c									A				A						
XL147c									A				A						
MH057b									A				A						
PX11a									A				A						
XL141									A				A						
PX02b									A				A						
MH088b									A				A						
MH059b									A				A						
PX32a									A				A						
T085c									A				A						
T101a									A				A						
T072b									A				A						
PX13b									A				A						
PX22c									A				A						
XL018									A				A						
MH067a									A				A						
MH052a									A				A						
MH43-5									A				A						
MH054a									A				A						
MH084													A						
MH054b													A						
MH090b													A						
XL144b													A						
PX29c													A						
B0233-1													A						
B0233-2													A						
B0233-5													A						
B0233-6													A						
B0233-8													A						
CD06-1							A						A						
CD06-3													A						
CD06-4													A						
CD06-5													A						
CD30-6													A						
CD15-1													A						
CD15-2													A						
CD15-6													A						
CD15-7													A						

CD15-8														A	T				
CD30-3														A					
CD30-5														A					
IP11-1																			A
IP11-5																			A
IP11-8																			A
CH1-1			A		A														A
CH1-2			A		A														A
CH1-3			A		A														A
CH1-5			A		A														A
CH1-6			A		A														A

9. Bibliografía

Aas, J., Paster, B., Stokes, L., Olsen, I., Dewhirst, F., 2005. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *Journal of Clinical Microbiology*. Am Soc Microbiol 43, 5721.

Adachi, N., Umetsu, K., Takigawa, W., Sakaue, K., 2004. Phylogenetic analysis of the human ancient mitochondrial DNA. *Journal of Archaeological Science* 31, 1339-1348.

Arber, W. 2000. Genetic variation: molecular mechanisms and impact on microbial evolution. *FEMS Microbiology Reviews* 24, 1-7

Ashford, R.W., 2000. Parasites as indicators of human biology and evolution. *Journal of medical microbiology* 49, 771-2.

Avila, M., Ojcius, D.M., Yilmaz, Ö., 2009. The Oral Microbiota : Living with a Permanent Guest. *DNA and Cell Biology* 28, 405-411.

Balaresque, P.L., Ballereau, S.J., Jobling, M.A., 2007. Challenges in human genetic diversity: demographic history and adaptation. *Human Molecular Genetics* 16, R134-9.

Bandelt, HJ., Forster, P., Sykes, B.C., Richards, M.B. 1995. Mitochondrial portraits of human populations using median networks. *Genetics* 141 (2), 743-53.

Bandelt, HJ., Forster, P., Röhl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular biology and evolution* 16(1), 37-48.

Boto, L. 2010. Horizontal gene transfer in evolution: facts and challenges. *Proc. R. Soc. B* 277, 819-827.

Cassar, O., Capuano, C., Bassot, S., Charavay, F., Duprez, R., Afonso, P.V., Abel, M., Walter, H., Mera, W., Martin, P.M., Chungue, E., Gessain, A., 2007. Human T lymphotropic virus type 1 subtype C melanesian genetic variants of the Vanuatu Archipelago and Solomon Islands share a common ancestor. *The Journal of infectious diseases* 196, 510-21.

Caufield, P.W., 2009. Tracking human migration patterns through the oral bacterial flora. *Clinical Microbiology and Infection* 15, 37-39.

- Cavalli-Sforza, L.L., 1997. Genes, peoples, and languages. PNAS 94, 7719-24.
- Chiaroni, J., Underhill, P.a., Cavalli-Sforza, L.L., 2009. Y chromosome diversity, human expansion, drift, and cultural evolution. PNAS 106, 20174-9.
- Coop, G., Peakrell, J.K., Novembre, J., Kudaravalli, S., Li, J., Absher, D., Myers, R.M., Cavalli-Sforza, L.L., Feldman, M.W., Pritchard, J.K., 2009. The role of geography in human adaptation. PLoS Genetics 5, e1000500.
- Crawford, D. 2007. *Deadly Companions: How Microbes Shaped our History*. Oxford University Press, USA; First Edition
- Crawford, M. 2006. *Anthropological Genetics: Theory, Methods and Applications*. Cambridge University Press; First Edition
- Dale, J., Park, S. 2004. *Molecular Genetic of Bacteria*. Wiley, England; Fourth Edition.
- DeGiorgio, M., Jakobsson, M., Rosenberg, N.A., 2009. Explaining worldwide patterns of human genetic variation using a coalescent-based serial founder model of migration outward from Africa. PNAS 106, 16057-62.
- Deshpande, O., Batzoglou, S., Feldman, M.W., Cavalli-Sforza, L.L., 2009. A serial founder effect model for human settlement out of Africa. *Proceedings of The Royal Society* 276, 291-300.
- de Thé, G., 2007. Microbial genomes to write our history. *The Journal of infectious diseases* 196, 499-501.
- Disotell, T.R., 2003. Discovering human history from stomach bacteria. *Genome Biology* 4, 12-15.
- Duncan, M.J., 2003. Genomics of Oral Bacteria. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 14, 175-187.
- Eshleman, J.a., Malhi, R.S., Smith, D.G., 2003. Mitochondrial DNA studies of Native Americans: Conceptions and misconceptions of the population prehistory of the Americas. *Evolutionary Anthropology: Issues, News, and Reviews* 12, 7-18.

Filоче, S., Wong, L., Sissons, C., 2009. Oral Biofilms: Emerging Concepts in Microbial Ecology. *Journal of dental research* 89, 8-18.

Foll, M., Gaggiotti, O., 2006. Identifying the environmental factors that determine the genetic structure of populations. *Genetics* 174, 875-91.

Fox, L., C., J., J., A., 1996. Phytolith analysis on dental calculus, enamel surface, and burial soil: information about diet and paleoenvironment. *American Journal of Physical Anthropology* 101, 101-113.

Garrigan, D., Hammer, M.F., 2006. Reconstructing human origins in the genomic era. *Nature reviews. Genetics* 7, 669-80.

Gilbert, M.T., Hansen, A.J., Willerslev, E., Rudbeck, L., Barnes, I., Lynnerup, N., Cooper, A., 2003. Characterization of genetic miscoding lesions caused by postmortem damage. *American Journal of Human Genetics* 72, 48-61.

Goebel, T., 2007. The Missing Years for Modern Humans. *Science* 315, 194-196.

Goldenfeld, N., Woese, C. 2007. Biology's next revolution. *Nature* 445, 369-369

Guglielmino, C.R., Viganotti, C., Hewlett, B., Cavalli-Sforza, L.L., 1995. Cultural variation in Africa : Role of mechanisms of transmission and adaptation. *PNAS* 92, 7585-7589.

Handfield, M., Baker, H.V., Lamont, R.J., 2008. Beyond Good and Evil in the Oral Cavity: Insight into Host-Microbe Relationships Derived From Transcriptional Profiling of Gingival Cells. *Journal of Dentistry* 87, 203-223.

Henry, A.G., Piperno, D.R., 2008. Using plant microfossils from dental calculus to recover human diet: a case study from Tell al-Raqā'i, Syria. *Journal of Archaeological Science* 35, 1943-1950.

Hillson, S. 1996. *Dental Anthropology*. New York: Cambridge University Press

Hillson, S. 2005. *Teeth*. New York: Cambridge University Press

Ho, S.Y., Gilbert, M.T., 2010. Ancient mitogenomics. *Mitochondrion. Mitochondria Research Society* 10, 1-11.

Hojo, K., Nagaoka, S., Ohshima, T., Maeda, N., 2009. Bacterial Interactions in Dental Biofilm Development. *Journal of Dental Research* 88, 982.

Holder M, Lewis PO. 2003. Phylogeny estimation: Tradicional and bayesian approaches. *Nature Reviews Genetics* 4, 275-284.

Holmes, E.C., 2004. The phylogeography of human viruses. *Molecular Ecology* 13, 745-756.

Holmes, E.C., 2008. Evolutionary history and phylogeography of human viruses. *Annual Review of Microbiology* 62, 307-28.

Hooper, L.V., Midtvedt, T., Gordon, J.I., 2002. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annual Review of Nutrition* 22, 283-307.

Huelsenbeck JP, Ronquist F. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17,754-755

Ikegaya, H., 2008. Geographical identification of cadavers by human parasites. *Forensic Science International. Genetics* 2, 83-90.

Jakobsson, M., Scholz, S.W., Scheet, P., Gibbs, J.R., VanLiere, J.M., Fung, H., Szpiech, Z.a., Degnan, J.H., Wang, K., Guerreiro, R., Bras, J.M., Schymick, J.C., Hernandez, D.G., Traynor, B.J., Simon-Sanchez, J., Matarin, M., Britton, A., van de Leemput, J., Rafferty, I., Bucan, M., Cann, H.M., Hardy, J.a., Rosenberg, N.a., Singleton, A.B., 2008. Genotype, haplotype and copy-number variation in worldwide human populations. *Nature* 451, 998-1003.

Jenkinson, H., Lamont, R., 2005. Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends in Microbiology* 13, 589–595.

Kawano, S., Tsukamoto, T., Ohtaguro, H., Tsutsumi, H., Takahashi, T., Miura, I., Mukoyama, R., Aboshi, H., Komuro, T. 1995. Sex determination from dental calculus by polymerase chain reaction (PCR). *Nihon Hoigaku Zasshi* 49 (3), 193-198.

Kemp, B.M., Monroe, C., Glenn, Smith D. 2006. Repeat silica extraction: a simple technique for the removal of PCR inhibitors from DNA extracts. *Journal of Archaeological Science* 33, 1680-1689

Kersulyte, D., Mukhopadhyay, A.K., Velapatiño, B., Wanwen, S., Pan, Z., Garcia, C., Hernandez, V., Valdez, Y., Mistry, R.S., Gilman, R.H., Yuan, Y., Gao, H., Alarcón, T., López-Brea, M., Balakrish Nair, G., Chowdhury, A., Datta, S., Shirai, M., Nakazawa, T., Ally, R., Segal, I., Wong, B.C., Lam, S.K., Olfat, F.O., Borén, T., Engstrand, L., Torres, O., Schneider, R., Thomas, J.E., Czinn, S., Berg, D.E., 2000. Differences in genotypes of *Helicobacter pylori* from different human populations. *Journal of Bacteriology* 182, 3210-8.

Karpathy, S.E., Qin, X., Gioia, J., Jiang, H., Liu, Y., Petrosino, J.F., Yerrapragada, S., Fox, G.E., Haake, S.K., Weinstock, G.M., Highlander, S.K. 2007. Genome sequence of *Fusobacterium nucleatum subspecies polymorphum* - a genetically tractable fusobacterium. *PLoS One* 2(7):e659.

Kim, H., Lee, D., Chang, Y., Kim, M.J., Koh, S., Kim, J., Seong, J., Song, S.K., Shin, H.S., Son, J., Jung, M.Y., Park, S., Yoo, S.Y., Cho, K.W., Kim, D., Moon, S., Kim, D., Choi, Y., Kim, B., Jang, H., Kim, C.S., Kim, C., Choe, S., Kook, J., 2010. Application of *rpoB* and zinc protease gene for use in molecular discrimination of *Fusobacterium nucleatum* subspecies. *Journal of clinical microbiology* 48, 545-53.

Kitchen, A., Miyamoto, M.M., Mulligan, C.J., 2008. Utility of DNA viruses for studying human host history: case study of JC virus. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 46, 673-82.

Klein, R.G., 2008. Out of Africa and the evolution of human behavior. *Evolutionary Anthropology: Issues, News, and Reviews* 17, 267-281.

Kolenbrander, P.E., Andersen, R.N., Blehert, D.S., Egland, P.G., Foster, J.S., Jr, R.J., Colonizers, L., 2002. Communication among Oral Bacteria. *Infection and Immunity* 66, 486-505.

Laland, K.N., Odling-Smee, J., Myles, S., 2010. How culture shaped the human genome: bringing genetics and the human sciences together. *Nature reviews. Genetics* 11, 137-48.

Ley, R.E., Lozupone, C.a., Hamady, M., Knight, R., Gordon, J.I., 2008. Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nature reviews. Microbiology* 6, 776-88.

Li, J., Helmerhorst, E.J., Leone, C.W., Troxler, R.F., Yaskell, T., Haffajee, A.D., Socransky, S.S., Oppenheim, F.G., 2004. Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. *Journal of Applied Microbiology* 97, 1311-8.

Li, J.Z., Absher, D.M., Tang, H., Southwick, A.M., Casto, A.M., Ramachandran, S., Cann, H.M., Barsh, G.S., Feldman, M., Cavalli-Sforza, L.L., Myers, R.M., 2008. Worldwide human relationships inferred from genome-wide patterns of variation. *Science* 319, 1100-4.

Librado, P., Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatic* 25, 1451-52.

Liébana Ureña J. 1995. *Microbiología oral*. 1a. ed. Madrid: Interamericana-McGraw-Hill.

Lieverse AR. 1999. Diet and the aetiology of dental calculus. *Int J Osteoarchaeol* 9(1), 219-232.

Linossier A, Aspillaga E, Gajardo M. 1988. Hallazgo de bacterias comensales de la cavidad oral en tártaro dental de restos óseos de indígenas chonos. *Rev Chil Antrop* 7(1), 123-128.

Linossier A, Gajardo M, Olavarria J. 1996. Paleomicrobiological study in dental calculus: *Streptococcus mutans*. *Scanning Microsc* 10(4), 1005-13.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V. and Clark, D.P. 2002. *Brock Biology of Microorganisms*, Décima Edición. Madrid: Pearson.

Mager, D.L., Ximenez-Fyvie, L.A., Haffajee, A.D., Socransky, S.S., 2003. Distribution of selected bacterial species on intraoral surfaces. *J Clin Periodontol* 30, 644-654.

Makarenkov, V., Kevorkov, D. and Legendre, P. 2006. *Phylogenetic Network Reconstruction Approaches*, Applied Mycology and Biotechnology, International Elsevier Series, vol. 6. Bioinformatics, 61-97.

- Marsh, P.D., 2004. Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Research* 38, 204-11.
- Marsh, P.D., 2005. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community lifestyle. *Journal of Clinical Periodontology* 32, 7-15.
- Matisoo-Smith, E., Roberts, R.M., Irwin, G.J., Allen, J.S., Penny, D., Lambert, D.M., 1998. Patterns of prehistoric human mobility in polynesia indicated by mtDNA from the Pacific rat. *PNAS* 95, 15145-50.
- Matisoo-Smith, E., Robins, J.H., 2004. Origins and dispersals of Pacific peoples: evidence from mtDNA phylogenies of the Pacific rat. *PNAS* 101, 9167-72.
- Nasidze, I., Li, J., Quinque, D., Tang, K., Stoneking, M., 2009. Global diversity in the human salivary microbiome. *Genome Research* 19, 636-643.
- Nasidze, I., Quinque, D., Li, J., Li, M., Tang, K., Stoneking, M., 2009. Comparative analysis of human saliva microbiome diversity by barcoded pyrosequencing and cloning approaches. *Analytical Biochemistry*. 391, 64-8.
- Nieberding, C.M., Olivieri, I., 2007. Parasites: proxies for host genealogy and ecology?. *Trends in Ecology and Evolution* 22, 156-65.
- Pakendorf, B., Stoneking, M., 2005. Mitochondrial DNA and Human Evolution. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 6, 165-83.
- Paracer S., Ahmadjian, V. 2000. *Symbiosis: An Introduction to Biological Associations*. Oxford University Press. Second Edition
- Paster, B.J., Boches, S.K., Galvin, J.L., Ericson, R.E., Lau, C.N., Levanos, V.A., Sahasrabudhe, A., Dewhirst, F.E. 2001. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol* 183(12), 3770-83.
- Pap, I., Tillier A., Arensburg, B., Weiner, S., Chech, M. (1995) First scanning electron microscope analysis of dental calculus from european neanderthals: Subalyuk (Middle Paleolithic, Hungary). *Bull. et Mém. de la Société d' Anthropologie de Paris*, n.s.t 7: 69-72.

Papaioannou, W., Gizani, S., Haffajee, A.D., Quirynen, M., Mamai-Homata, E., Papagiannoulis, L., 2009. The microbiota on different oral surfaces in healthy children. *Oral Microbiology and Immunology* 24, 183-9.

Pavesi, A., 2005. Utility of JC polyomavirus in tracing the pattern of human migrations dating to prehistoric times. *J. Gen. Virol.* 86, 1315-1326.

Posada D, Crandall KA., 1998. ModelTest: Testing the model of testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14, 817-818

Posada D, Crandall KA., 2001 Selecting the best-fit model of nucleotide substitution. *Syst Biol* 50, 580-601

Pruvost, M., Schwarz, R., Bessacorreia, V., Champlot, S., Grange, T., Geigl, E., 2008. DNA diagenesis and palaeogenetic analysis: Critical assessment and methodological progress. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 266, 211-219.

Relethford, J.H., 1998. Genetics of Modern Human Origins and Diversity. *Annu. Rev. Anthropol.* 27, 1-23.

Relethford, J.H., 2008. Genetic evidence and the modern human origins debate. *Heredity* 100, 555-63.

Ruby, J., Barbeau, J., 2002. The buccale puzzle: the symbiotic nature of endogenous infections of the oral cavity. *Can J Infect Dis* 13, 34-41.

Shackelton, L.A., Rambaut, A., Pybus, O.G., Holmes, E.C., 2006. JC virus evolution and its association with human populations. *J. Virol.* 80, 9928-9933.

Shimodaira, H., Hasegawa, M., 2001. CONSEL: for assessing the confidence of phylogenetic tree selection. *Bioinformatics* 17, 1246-7.

Socransky, S.S., Haffajee, A.D., Cugini, M.A., Smith, C., Kent, R.L., 1998. Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology* 25, 134-144.

Stoneking, M., 1997. The human genome project and molecular anthropology. *Genome Research* 7, 87-91.

Stoneking, M., 2008. Humans origins: The molecular perspective. European Molecular Biology Organization Reports 9, S46-50.

Storey, A.A., Ramírez, J.M., Quiroz, D., Burley, D.V., Addison, D.J., Walter, R., Anderson, A.J., Hunt, T.L., Athens, J.S., Huynen, L., Matisoo-Smith, E.A., 2007. Radiocarbon and DNA evidence for a pre-Columbian introduction of Polynesian chickens to Chile. PNAS 104, 10335-9.

Suerbaum, S., Achtman, M., 2004. Helicobacter pylory: Recombination, Population Structure and Human Migrations. International Journal of Medical Microbiology 294, 133-139.

Swofford DL. 2002. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), version 4.0b10. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.

Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution 24:1596-1599

Templeton, A.R., 2007. Genetics and Recent Human Evolution. Evolution 61, 1507-1519.

Torrioni, A., Achilli, A., Macaulay, V., Richards, M., Bandelt, H., 2006. Harvesting the fruit of the human mtDNA tree. Trends in Genetics 22, 339-45.

Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Hamady, M., Fraser-liggett, C.M., Knight, R., Gordon, J.I., 2007. The human microbiome project. Nature 449, 804-810.

Urzúa, I., Pacheco, A., Retamal, R., Moncada, G. 2006. Condición Oral de la Colección Esqueletal del Cementerio Pica 8 (Período Intermedio Tardío, Complejo Pica-Tarapacá). XVII Congreso Nacional de Arqueología Chilena, Valdivia Octubre 2006, Actas del Congreso.

Vandermeersch, B., Arensburg, B., Tillier A., Rak, Y., Weiner, S., Spiers, M., Aspillaga, E. (1994) Middle Palaeolithic dental Bacteria from Kebara, Israel. C.R. Acad Sci. Paris 319, Série II: 727-731. citado por Pap et al, 1995.

Weaver, T.D., Roseman, C.C., 2008. New developments in the genetic evidence for modern human origins. Evolutionary Anthropology: Issues, News, and Reviews 17, 69-80.

White, D. 1997. Dental calculus: recent insights into occurrence, formation, prevention, removal and oral health effects of supragingival and subgingival deposits. *Eur J Oral Set* 105, 508-522

Willerslev, E., Cooper, A., 2005. Ancient DNA. *Proceedings of The Royal Society* 272, 3-16.

Wirth, T., Meyer, A., Achtman, M., 2005. Deciphering host migrations and origins by means of their microbes. *Molecular Ecology* 14, 3289-306.

Wirth, T., Wang, X., Linz, B., Novick, R.P., Lum, J.K., Blaser, M., Morelli, G., Falush, D., Achtman, M., 2004. Distinguishing human ethnic groups by means of sequences from *Helicobacter pylori*: Lessons from Ladakh. *PNAS* 101, 4746-4751.

Woolhouse, M.E., Webster, J.P., Domingo, E., Charlesworth, B., Levin, B.R., 2002. Biological and biomedical implications of the co-evolution of pathogens and their hosts. *Nature Genetics* 32, 569-77.

Yamaoka, Y., 2009. *Helicobacter pylori* typing as a tool for tracking human migration. *Clinical Microbiology and Infection* 15, 829-34.

Zaneveld, J., Turnbaugh, P.J., Lozupone, C., Ley, R.E., Hamady, M., Gordon, J.I., Knight, R., 2008. Host-bacterial coevolution and the search for new drug targets. *Current Opinion in Chemical Biology* 12, 109-14.