

UCH-FC
MA6-B
L791

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS Y FARMACEUTICAS

SISTEMA DE GRUPO SANGUINEO ABO EN POBLACIONES
PREHISTORICAS DEL VALLE DE AZAPA, CHILE

ELENA LLOP ROMERO

- 1983 -

SISTEMA DE GRUPO SANGUINEO ABO EN POBLACIONES
PREHISTORICAS DEL VALLE DE AZAPA, CHILE

Tesis

entregada a la

Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Magister en Ciencias Biológicas

con mención en Genética

por

ELENA LLOP ROMERO

Patrocinante de Tesis: Dr. Francisco Rothhammer E.

1983

FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS Y FARMACEUTICAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

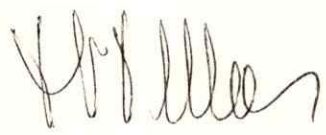
INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Post-Grado de la Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magister presentada por la candidata

ELENA GLORIA LLOP ROMERO


ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de Tesis para el Grado de Magister en Ciencias Biológicas con mención en Genética

Patrocinante de Tesis


.....
Dr. Francisco Rothhammer E.

Comisión Informante de Tesis


.....
Dr. Danko Brncic


.....
Dr. Lafayette Eaton


.....
Dr. Mario Roseblatt

.....

A MI FAMILIA

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Francisco Rothhammer, por su permanente estímulo y valiosa crítica en la realización de esta tesis.

A Cecilia Leyton, María Luisa López y María Antonieta Cruz por su generosidad y valiosa colaboración en el estudio de la contaminación bacteriana de las momias.

A la Antropóloga Silvia Quevedo del Museo de Historia Natural de Santiago y al Dr. Marvin Allison y los Arqueólogos Guillermo Focacci y Calógero Santoro del Instituto de Antropología de la Universidad de Tarapacá, por su valiosa ayuda en la obtención de los especímenes de momia.

A los Profesores Gustavo Hoecker y Alicia Ramos por su permanente estímulo.

A los colegas del Departamento de Biología Celular y Genética, en especial a Mónica Acuña y Patricia Iturra.

Al Dr. Tulio Pizzi por su colaboración en el procesamiento de los especímenes de músculo de momia para microscopía óptica.

Al Sr. Héctor Muñoz por su ayuda técnica en el trabajo fotográfico y a la Srta. Julia Palma por la transcripción de este manuscrito.

Esta tesis ha sido financiada parcialmente a través del Proyecto B-5188-135 del Departamento de Desarrollo de la Investigación, Universidad de Chile y el Proyecto 0339 del Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico.

I N D I C E D E M A T E R I A S

	PAG.
A. PAGINAS PRELIMINARES	
Página de título	i
Informe de aprobación	
Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
Indice de Materias	v
Lista de tablas	viii
Lista de figuras	xii
Resumen	xiv
B. PAGINAS DE TEXTO	
INTRODUCCION	1
MATERIALES Y METODOS	12
1. Poblaciones prehistóricas	12
2. Tipificación del grupo sanguíneo ABO de los especímenes de músculo de mo- mia. Técnica de inhibición de la he- maglutinación.	18

INDICE DE MATERIAS (CONT.)

	PAG.
3. Determinación de la contaminación bacteriana.	29
4. Análisis de correlación entre contaminación bacteriana y grupo sanguíneo ABO.	37
RESULTADOS	38
Grupo sanguíneo ABO	38
Contaminación bacteriana	51
Análisis de correlación entre contaminación bacteriana y grupo sanguíneo ABO.	59
DISCUSION	62
Consideraciones acerca de la técnica de inhibición de la hemaglutinación.	62
Posible efecto de la contaminación bacteriana.	66
Relación de los resultados obtenidos en hallazgos previos.	69

INDICE DE MATERIAS (CONT.)

	PAG.
Evolución del sistema ABO	73
CONCLUSIONES	77
BIBLIOGRAFIA	79

L I S T A D E T A B L A S

	PAG.
I Frecuencias fenotípicas de grupo sanguíneo ABO en diferentes estudios de momias de América del Sur.	6
II Fuente bacteriana de antígenos ABO.	9
III Efecto de enzimas bacterianas sobre los antígenos del grupo sanguíneo ABO.	10
IV Sitios arqueológicos, períodos culturales fechados y número de individuos de las poblaciones prehistóricas estudiadas.	16
V Titulación de los antisueros anti A, anti B y lectina anti H con eritrocitos A, B y O respectivamente.	23
VI Títulos, índices de absorción y grupo sanguíneo ABO del espécimen de músculo del cadáver número 1 tipificado previamente como grupo sanguíneo A.	39

CONTINUACION LISTA DE TABLAS

	PAG.
VII Títulos, índices de absorción y grupo sanguíneo ABO del espécimen de músculo del cadáver número 7 tipificado previamente como grupo sanguíneo B.	40
VIII Títulos, índices de absorción y grupo sanguíneo ABO del espécimen de músculo del cadáver número 4 tipificado previamente como grupo sanguíneo O.	41
IX Títulos, índices de absorción y grupo sanguíneo ABO del espécimen de músculo de momia número 99.	42
X Indices promedio de absorción y grupo sanguíneo ABO de los especímenes de músculo de cadáveres control.	44
XI Indices promedio de absorción y grupo sanguíneo ABO. Aborígenes de Arica. Período cultural arcaico (5000-3500 A.C.).	45

CONTINUACION LISTA DE TABLAS

	PAG.
XII Indices promedio de absorción y grupo sanguíneo ABO. Aborígenes de Arica. Período cultural agricultores tempranos (530-490 A.C.).	46
XIII Indices promedio de absorción y grupo sanguíneo ABO. Aborígenes de Arica. Período cultural agricultores medios (730-1000 D.C.).	47
XIV Indices promedio de absorción y grupo sanguíneo ABO. Aborígenes de Arica. Período cultural agricultores tardíos (1100-1370 D.C.).	49
XV Frecuencias fenotípicas de grupo sanguíneo ABO (en porcentajes) en las poblaciones estudiadas.	50

CONTINUACION LISTA DE TABLAS

	PAG.
XVI Grado de contaminación de esporas bacterianas de los especímenes estudiados con tinción de Gram según período cultural.	60
XVII Frecuencias génicas de grupo sanguíneo ABO en poblaciones prehistóricas chilenas.	70

L I S T A D E F I G U R A S

	PAG.
1. Momia de la colección del Museo de Historia Natural de Santiago, procedente del Valle de Azapa. Período Agrícola.	13
2. Momia de la colección del Museo de Historia Natural de Santiago, procedente del Valle de Azapa. Período Agrícola.	14
3. Momia de la colección del Museo de Historia Natural de Santiago, procedente del Valle de Azapa. Período Agrícola.	15
4. Esquema del principio general de la técnica de inhibición de la hemaglutinación.	27
5. Microfotografías de cortes histológicos a microscopía óptica de músculo esquelético de momia.	52

CONTINUACION LISTA DE FIGURAS

	PAG.
6. Microfotografía de un corte histológico de músculo esquelético de la momia número 97, observado al microscopio de contraste de fase.	55
7. Microfotografías electrónicas de cortes de músculo esquelético de momias en las cuales se observan esporas bacterianas.	56

R E S U M E N

El objetivo fundamental de esta tesis guarda relación con la tipificación del grupo sanguíneo ABO de momias precolombinas pertenecientes al Valle de Azapa, Chile, con el objeto de poner a prueba la hipótesis comúnmente aceptada de que los aborígenes sudamericanos carecían de los alelos A y B del sistema de grupo sanguíneo ABO.

Para este fin se tipificaron especímenes de músculo de 54 momias fechadas entre 5000 años A.C. y 1370 años D.C., encontrándose una momia de grupo sanguíneo A, 45 de grupo O y 8 sin especificidad antigénica ABO.

Se estudió la contaminación bacteriana existente en los especímenes de músculo de momia con el objeto de enfrentar la crítica de un posible sesgo de los resultados debido a esta causa. Como contaminantes de los tejidos se detectaron esporas bacterianas, las cuales no poseen antígenos de especificidad ABO. Sin embargo las formas vegetativas de las esporas pueden haber poseído enzimas que hayan producido transformaciones de los antígenos ABO existentes en las momias. No nos fue posible cultivar las esporas,

por lo tanto desconocemos el tipo de enzima que pudieron haber tenido. No obstante, las transformaciones de las especificidades antigénicas ABO por efecto de las enzimas bacterianas siempre ocurren en el sentido $AB \rightarrow A, B, O \text{ o } \emptyset$, $A \rightarrow O \text{ o } \emptyset$, $B \rightarrow O \text{ o } \emptyset$ y $O \rightarrow \emptyset$, por lo tanto nuestros resultados pueden estar sesgados en el sentido de subestimar las especificidades antigénicas A y/o B, pero en ningún caso simular la existencia de A o B cuando este grupo no está verdaderamente presente.

Se postula que las poblaciones aborígenes del Valle de Azapa fueron polimórficas para el sistema ABO debiendo haber tenido genes A y tal vez B en bajas frecuencias. Finalmente se plantea la hipótesis que la disminución de genes A y B de las poblaciones aborígenes sudamericanas con respecto a las etnias mongoloides que supuestamente les dieron origen, se debe a efecto de fundador.

I N T R O D U C C I O N

Durante las últimas dos décadas, y particularmente a partir de mediados de los años sesenta, las poblaciones aborígenes de Sudamérica han sido caracterizadas genéticamente utilizando antígenos eritrocitarios, proteínas séricas, enzimas eritrocitarias y antígenos HL-A con el objeto de dar respuesta a algunas interrogantes relacionadas con el proceso microevolutivo que han experimentado. En este contexto, se ha desarrollado una vasta metodología que ha permitido estimar en base a similitudes y diferencias para ciertas características biológicas, el grado de proximidad genética entre grupos tribales y postular algunas teorías acerca de su origen (véase por ejemplo 1,2,3,4,5,6).

Los estudios mencionados y otros citados más adelante han demostrado que los indígenas sudamericanos presentan niveles restringidos de polimorfismo para la mayoría de los marcadores genéticos estudiados. Así por ejemplo, tienen una frecuencia muy baja o ausencia de los antígenos A y B del sistema de grupo sanguíneo ABO, del haplotipo cde para el sistema Rh, y de varios alelos del sistema HL-A entre otros (7,8,9,10,11,12).

En general las tribus de la foresta tropical estudiadas carecen por completo de los genes A y B presentando el gen O una frecuencia de 1.0. La mayoría de las poblaciones andinas estudiadas presentan en cambio frecuencias bajas pero significativas de los genes A y B ($A \leq 0.05$ y $B \leq 0.01$). Estas bajas frecuencias de A y B han sido atribuidas hasta ahora a mezcla caucasoide (2,9,13,14,15). Los hallazgos descritos motivaron a varios investigadores a postular que los indígenas sudamericanos carecían en su totalidad de los genes A y B del sistema ABO antes de la llegada de los invasores europeos (10,16,17).

Boyd (16), quien se interesó inicialmente por este problema, planteó tres hipótesis alternas para explicar la baja frecuencia de los antígenos A y B del sistema ABO en las poblaciones amerindias sudamericanas.

- 1.- En Sudamerica hubo una fuerte selección natural en contra de los portadores de genes A y B, la cual trajo como consecuencia la fijación del gen O.
- 2.- Las poblaciones que llegaron a Sudamerica no eran portadoras de genes A y B. Por lo tanto, debido a efecto de fundador, estos genes no se encuentran presentes en estas poblaciones.

3.- En Sudamerica se presenta el efecto de la deriva genética. Debido al tamaño pequeño que presentaban las poblaciones inmigrantes a Sudamerica los genes A y B se perdieron por azar.

Boyd (16), consideró que para aceptar la segunda o tercera hipótesis era necesario suponer tamaños poblacionales muy pequeños, a su juicio menores que los estimados de acuerdo a la evidencia arqueológica, cultural y lingüística. Planteó, por lo tanto, que le parecía más factible la primera explicación, aunque esta fuese absolutamente hipotética.

Resulta evidente que las diversas hipótesis formuladas sobre la evolución del sistema ABO en Sudamerica pueden ser validadas estudiando la variación genética existente en poblaciones humanas prehistóricas. Esta posibilidad existe en algunas regiones del mundo en las cuales dadas las condiciones climáticas y características químicas del suelo se conserva en ellas un elevado número de individuos momificados en forma natural, es decir, por deshidratación, de 5.000 y más años de antigüedad. Entre los lugares que expresan esta característica se cuenta el norte de Chile, sur de Perú y suroeste de Bolivia.

Esta particularidad unida al hecho de que es posible tipificar ciertos marcadores genéticos en tejidos de momia permite llevar a cabo un estudio de variación genética humana con un enfoque cronológico (17,18,19,20,21,22,23,24, 25).

Al revisar en la literatura existente los diferentes métodos empleados en la tipificación de marcadores genéticos en tejidos momificados, aparecen tres sistemas marcadores como susceptibles a ser determinados. Estos son los sistemas de grupos sanguíneos ABO y Rh y el sistema mayor de histocompatibilidad humano HL-A. Los sistemas ABO y HL-A expresan antígenos que forman parte de la membrana celular de prácticamente todas las células del organismo, en tanto el sistema Rh tiene una distribución más restringida, encontrándose prácticamente limitado a la membrana celular de los eritrocitos (11,26).

La tipificación del sistema de grupo sanguíneo Rh intentada por Gilbey y Lubran (19) y Suárez-Morales y Linares (22) en tejido muscular nos merece dudas debido a que los antígenos Rh no se encuentran presentes en las células musculares y por otra parte pruebas realizadas en nuestro laboratorio con tejido muscular de cadáveres de grupo sanguíneo Rh conocido dieron un resultado negativo.

La tipificación de antígenos HL-A en momias ha sido intentada por dos autores (27,28) y pese a haber sido criticados estos resultados recientemente (11) abren interesantes posibilidades. Nosotros hemos tipificado un espécimen en nuestro laboratorio siguiendo a los autores antes mencionados pudiendo identificar en este ejemplar de 800 años de antigüedad los siguientes antígenos HL-A: A₃, B₁₂ y B₂₇. Sin embargo las dificultades técnicas, lo laborioso del procedimiento a emplearse y los elevadísimos costos nos han obligado a postergar la tipificación de este sistema para el futuro.

La tipificación del sistema de grupo sanguíneo ABO ha sido realizada por diversos autores. Los primeros intentos fueron realizados por Boyd y Boyd, quienes en el año 1933 describieron una técnica de inhibición de la hemaglutinación con la cual lograron determinar el grupo sanguíneo ABO en muestras de músculo de momia (29). Después de Boyd y Boyd numerosos investigadores intentaron tipificar este grupo sanguíneo en tejidos momificados. Los resultados obtenidos en momias sudamericanas aparecen en la Tabla I. Así por ejemplo, Matson (18), estudió 16 momias sudamericanas en las cuales sólo detectó el grupo sanguíneo O. Boyd y Boyd (20), estudiaron 134 momias peruanas Precolombinas en-

T A B L A I

FRECUENCIAS FENOTIPICAS DE GRUPO SANGUINEO ABO EN DIFERENTES ESTUDIOS DE MOMIAS DE AMERICA DEL SUR
(en porcentajes *)

REFERENCIA	PROCEDECIA	N	A	E	A	B	O	(-)
		n	%	n	%	n	%	n
Matson, A., 1936 (18)	Sud América	16	0	0	0.00	0	0.00	15
Boyd, W. y Boyd, L. 1937 (20)	Perú Precolombinos	134	1	0.79	6	4.72	2	1.58
Gilbey, B. y Lubran, M. 1952 (19)	Perú y Colombia Precolombinos	8	3	60.00	0	0.00	0	0.00
Otten, C. y Flory, L. 1963 (21)	Perú y Chile Precolombinos	7	0	0.00	0	0.00	0	0.00
Suárez-Morales, O. y Linares, E. 1967 (22)	Bolivia Precolombinos	10	0	0.00	0	0.00	0	0.00
Etcheverry, R. et al. 1970 (17)	Chile, Atacameños Precolombinos	80	0	0.00	0	0.00	0	0.00
Lippold, L. 1971 (23)	Perú y Chile	20	0	0.00	0	0.00	0	0.00
Allison, M. et al., 1978 (25)	Perú Precolombinos	113	27	33.80	4	3.50	21	18.60
	Chile Precolombinos	49	4	8.20	0	0.00	0	0.00
	Perú Coloniales	58	11	19.00	0	0.00	1	1.70
	Chile Coloniales	12	1	9.00	0	0.00	0	0.00

* = Los porcentajes de los grupos sanguíneos fueron obtenidos en base a los especímenes con especificidad antigénica ABO.

N = Número total de individuos de cada estudio.

n = Número de individuos de cada grupo sanguíneo

contrando 1 individuo A, 6 de grupo B, 2 de grupo AB y el resto O. Gilbey y Lubran (19) estudiaron 8 momias de Perú y Colombia Precolombinas, encontrando 3 de grupo A y 2 de grupo O. Otten y Flory (21), estudiaron 7 momias de Perú y Chile todas grupo sanguíneo O. Suárez-Morales y Linares (22), estudiaron 10 momias bolivianas Precolombinas encontrando sólo grupo sanguíneo O. Etcheverry et al. (17), estudiaron 80 momias chilenas Precolombinas todas grupo sanguíneo O. Lippold (23), estudió 20 momias de Perú y Chile resultando ser todas de grupo O. Finalmente, Allison et al. (25), estudiaron 113 momias peruanas Precolombinas encontrando 27 individuos A, 4 B, 21 AB y el resto O. Al mismo tiempo estudiaron 49 momias chilenas Precolombinas encontrando 4 individuos A y el resto O. Como se puede apreciar, los resultados obtenidos en los diferentes estudios de poblaciones de momias sudamericanas estudiadas para grupo sanguíneo ABO no son del todo concordantes. Algunos autores encuentran un 100% de individuos pertenecientes a grupo sanguíneo O, en tanto otros logran determinar antígenos A y/o B en frecuencias considerables.

Cabe hacer notar que una de las críticas más importantes a la tipificación de grupo sanguíneo ABO en tejidos momificados es la contaminación bacteriana. Numerosas

especies bacterianas contienen antígenos ABO, debido a que los hidratos de carbono responsables de la especificidad ABO se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. Especialmente se han descrito estos antígenos en varias especies de bacilos gram (-), en las cuales forman parte del antígeno bacteriano O, encontrándose ausentes en prácticamente todas las especies bacterianas gram + estudiadas a excepción del neumococus tipo I como se puede apreciar en la Tabla II (30,31).

Por otra parte, otras especies bacterianas contienen enzimas que transforman los antígenos ABO (ver Tabla III) (32,33). En estos casos la acción enzimática bacteriana produce transformaciones de los grupos sanguíneos, que siempre sigue el orden que se describe a continuación. Un espécimen de grupo sanguíneo AB puede ser transformado en A ó B ó O, o bien perder su especificidad ABO, un grupo A puede ser transformado en O o perder su especificidad, un grupo B puede ser transformado igualmente en O ó perder su especificidad y finalmente un espécimen O sólo puede perder su especificidad ABO. Para enfrentar la crítica correspondiente a la contaminación bacteriana, Lippold (23) y Allison et al. (24) han realizado una determinación de la contaminación bacteriana existente en las muestras tipificadas para

T A B L A I I
 FUENTE BACTERIANA DE ANTIGENOS ABO
 †

ANTIGENO	BACTERIA
A	<i>Salmonella paratyphi</i> B
	<i>Pneumococcus</i> Tipo I
	<i>Escherichia freundii</i>
	<i>Escherichia coli</i> VI
B	<i>Salmonella berkeley</i> *
	<i>Proteus</i> OX 19
	<i>Ricketzia prowaseki</i>
	<i>Ricketzia mooseri</i>
	<i>Escherichia coli</i> O86
	<i>Escherichia coli</i> VI
	<i>Serratia marcescens</i>
Arizona 21*	
H	<i>Salmonella poona</i>
	<i>Salmonella atlanta</i>
	<i>Salmonella worthington</i>
	<i>Escherichia coli</i> VI
	<i>Serratia marcescens</i>
	<i>Shigella dysenteriae</i>
	<i>Salmonella grumpensis</i> *
	Arizona 9*
	<i>Escherichia coli</i> 127*
<i>Escherichia coli</i> 128*	

Fuente: * Springer, et al., 1961 (30)
 Hart, D. et al., 1979 (31)

T A B L A III

EFFECTO DE ENZIMAS BACTERIANAS SOBRE LOS ANTIGENOS DEL GRUPO SANGUINEO ABO

BACTERIA	ENZIMA	TRANSFORMACION DEL GRUPO SANGUINEO
<i>Bacillus cereus</i>	-D Galactosidasa	B en O
* <i>Bacillus cereus</i>	L Fucopiranososa	Destruye O
<i>Bacillus fulminans</i>	L Fucopiranososa	Destruye O
<i>Clostridium maesbashi</i>	-D Galactosidasa	B en O
<i>Clostridium perfringens</i>	X	Descompone A
<i>Clostridium tertium</i>	N-Deacetilasa	Descompone A
	N-Acetil Galactosaminidasa	A en O
<i>Clostridium welchii</i>	Diferentes enzimas sacaro-líticas	Destruye A, B, O
<i>Lactobacillus bifidus</i>	X	Destruye B
<i>Treponema foetus</i>	N-Acetil Galactosaminidasa + N-Deacetilasa	A en O
	EXO Glicosidasa	Destruye B y O

X = Enzima no identificada

Fuente: Lengyel, 1975 (32)
*Iseki, S. 1962 (33)

grupo sanguíneo ABO, ejecutando una tinción para bacterias en cortes de estos tejidos. Ambos autores señalan que la contaminación bacteriana encontrada es prácticamente inexistente, lo cual corroboraría la validez de sus resultados.

Motivada tanto por el trabajo de laboratorio, como por la validación de modelos evolutivos simples, he decidido determinar en la presente tesis la presencia de antígenos ABO en momias Precolombinas pertenecientes al Valle de Azapa, Chile con el objeto de poner a prueba la hipótesis comúnmente aceptada de que las poblaciones aborígenes de Sudamérica carecían de los alelos A y B del sistema de grupo sanguíneo ABO. Objetivos adicionales de esta tesis son explicar los hallazgos en términos evolutivos y tratar de evaluar el posible efecto de la contaminación bacteriana en la tipificación de tejidos momificados, contribuyendo de esta manera al desarrollo de la paleogenética de poblaciones humanas.

M A T E R I A L E S Y M E T O D O S1. POBLACIONES PREHISTORICAS

Las momias estudiadas se obtuvieron de siete sitios arqueológicos ubicados en el Valle de Azapa, Chile. En las figuras 1, 2 y 3 se puede observar el aspecto morfológico de 3 de estos ejemplares.

Los siete sitios arqueológicos utilizados en nuestro estudio, incluyeron cuatro períodos culturales (ver Tabla IV). Como se puede apreciar en la Tabla IV, el sitio arqueológico más antiguo estudiado corresponde al sitio Morro de Arica, el cual está localizado en la desembocadura del Valle de Azapa en la costa y pertenece al período cultural Arcaico con un fechado de 5000 a 3500 A.C. (34). De este sitio se estudiaron 4 momias.

El segundo período cultural considerado corresponde al período Agricultores Tempranos representado por dos sitios arqueológicos. El sitio El Laucho ubicado en la costa estuvo representado por 13 momias, este sitio tiene un fechado de 530 A.C. (35) y el sitio Alto

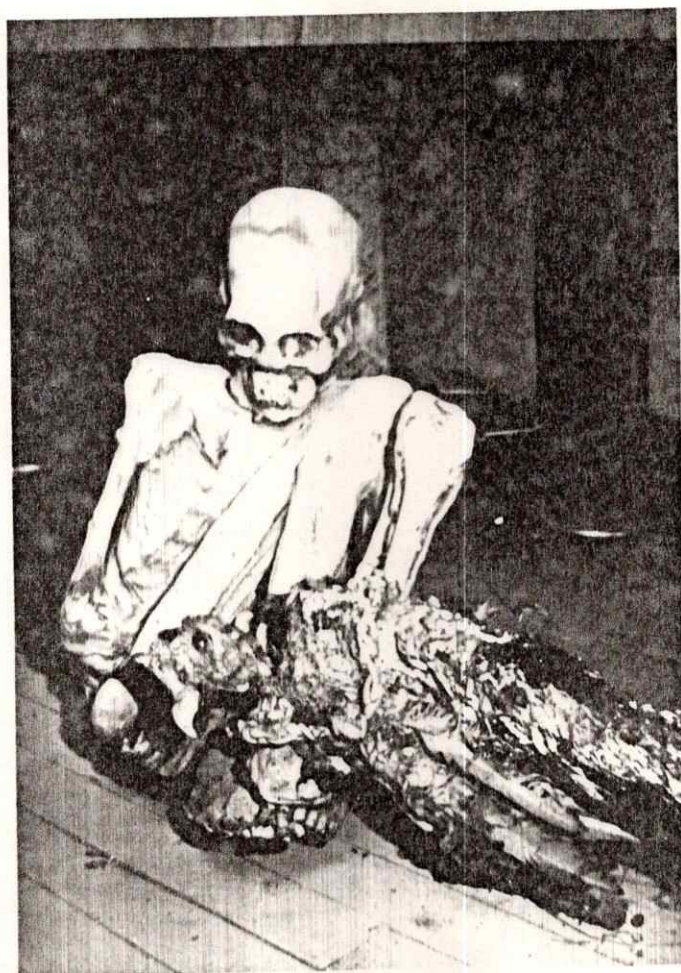


Figura 1: Momia de la colección del Museo de Historia Natural de Santiago, procedente del Valle de Azapa. Período Agrícola. (Foto J.E. Lira).



Figura 2: Momia de la colección del Museo de Historia Natural de Santiago, "procedente del Valle de Azapa. Período Agrícola. (Foto J.E. Lira).

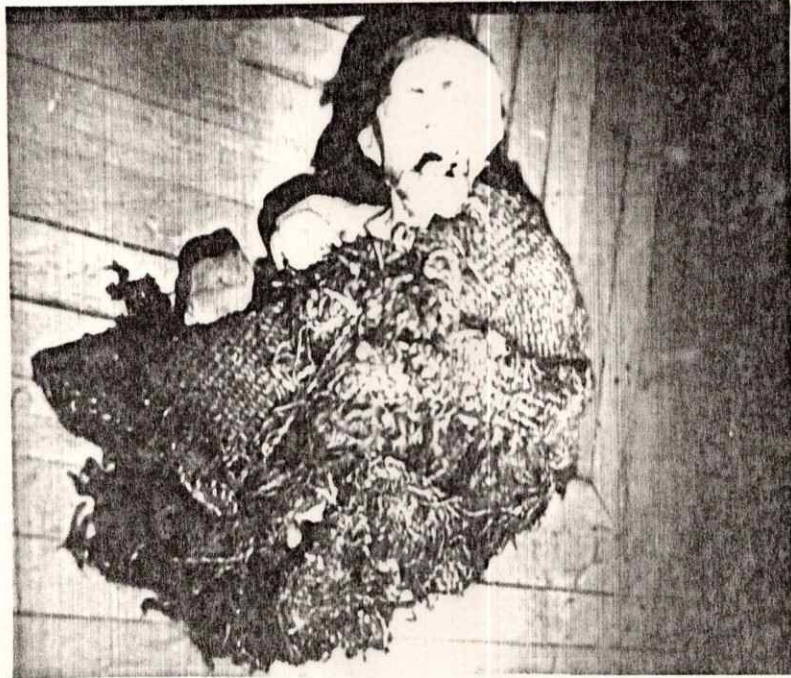


Figura 5: Momia de la colección del Museo de Historia Natural de Santiago, procedente del Valle de Azapa. Período Agrícola. (Foto J. E. Lira).

T A B L A IV

SITIOS ARQUEOLOGICOS, PERIODOS CULTURALES, FECHADOS Y NUMERO DE INDIVIDUOS (N)
DE LAS POBLACIONES PREHISTORICAS ESTUDIADAS

SITIO ARQUEOLOGICO	PERIODO CULTURAL	FECHADO*	N
Morro de Arica	Arcaico	5000 - 3500 A.C. (R)	4
El Laucho	Agricultores tempranos	530 A.C. (A)	13
Alto Ramfrez	Agricultores tempranos	490 A.C. (A)	3
Maitas Chiribaya	Agricultores medios	730 - 1000 D.C. (A)	13
Azapa 3	Agricultores medios	800 D.C. (R)	3
Playa Miller 3, 4	Agricultores tardios	1140 - 1370 D.C. (A)	12
Azapa 8	Agricultores tardios	1100 D.C. (A)	6
Total	Precolombinos	5000 A.C. - 1300 D.C.	54

* (A) = cronología absoluta (C¹⁴)

(R) = cronología relativa (basada en evidencia arqueológica)

Ramírez ubicado en el Valle con un fechado de 490 A.C. estuvo representado por 3 momias (36).

El tercer período cultural estudiado es el período Agricultores Medios. De este período se estudiaron 13 momias del sitio Maitas Chiribaya ubicado en el Valle, que tiene un fechado de 730-1000 D.C. (37,38) y 3 momias del sitio Azapa 3 también ubicado en el Valle con un fechado de 800 D.C. (39).

Finalmente, del período Agricultores Tardios se estudiaron 12 momias de los sitios Playa Miller 3, 4, ubicados en la costa con un fechado de 1140-1370 D.C. (35,40) y 6 momias del sitio Azapa 8 ubicado en el Valle con un fechado de 1100 D.C. (41). El total estudiado correspondió por lo tanto a 54 individuos. Estos especímenes se obtuvieron del Museo Arqueológico de San Miguel de Azapa y del Museo Nacional de Historia Natural de Santiago. Este material ha sido exhumado y estudiado desde un punto de vista arqueológico y antropológico físico por varios especialistas nacionales y extranjeros (34,35,36,38,42).

2. TIPIFICACION DEL GRUPO SANGUINEO ABO DE LOS ESPECIMENES DE MUSCULO DE MOMIA. TECNICA INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION.

Para la tipificación del sistema de grupo sanguíneo ABO se han utilizado diferentes técnicas entre las cuales cabe señalar la técnica de inhibición de la hemaglutinación, de aglutinación mixta e inducción de anticuerpos en conejos (véase por ejemplo 17,23,24). De las técnicas citadas, la más comúnmente empleada ha sido la técnica de inhibición de la hemaglutinación desarrollada inicialmente por Boyd y Boyd en el año 1933 (29) y que ha sufrido numerosas modificaciones a través del tiempo. Se eligió esta técnica para tipificar las momias debido a su factibilidad y debido a que en comparaciones realizadas por Allison et al. (24) de las tres técnicas citadas anteriormente no fue posible encontrar diferencias importantes en los resultados obtenidos con cada una de ellas.

En términos generales, la técnica de inhibición de la hemaglutinación consiste en inhibir la aglutinación que se produce al poner en contacto eritrocitos con sus correspondientes anticuerpos por medio de la in-

cubación previa del antisuero con tejido de momia. La inhibición se produce si el tejido tiene el antígeno correspondiente.

Al aplicar la técnica, se utilizó como fuente de antígeno músculo de momia, por lo tanto se obtuvo especímenes de músculo de cada una de las momias a estudiar. Cada espécimen de músculo fue molido en un Omni Mixer Sorval por 5 segundos 3 veces consecutivas. Como fuente de anticuerpos se utilizó antisuero anti A para identificar el antígeno A y antisuero anti B para identificar el antígeno B. Ambos antisueros fueron adquiridos en laboratorios Gamma y fueron monoespecíficos para el sistema ABO. Para identificar el antígeno O se utilizó lectina anti H, la cual se obtuvo a partir de semillas de *Ulex europeus*. Para esto, se recolectaron estas semillas durante 1981 en la localidad de Los Ulmos, Valdivia. La lectina fue preparada en el laboratorio al 10% de acuerdo a la técnica de Boyd y Shapleigh (43).

Los siguientes pasos se siguieron en la preparación de la lectina anti H a partir de 1 gr. de semillas de *Ulex europeus*.

- Moler las semillas en un mortero.

- Agregar 10 ml. de NaCl 0.9%.
- Vaciar a un tubo de ensayo y agitar durante 2 horas como mínimo.
- Centrifugar a 3.000 r.p.m. durante 5 minutos.
- Extraer el sobrenadante.
- Filtrar el sobrenadante 2 veces.
- Ajustar pH 7.0.

Cabe hacer notar que la lectina anti H reconoce la molécula de sustancia H responsable de la especificidad de grupo sanguíneo O, sin embargo esta molécula está también presente aunque en cantidad menor en células de grupo sanguíneo A, B y AB. De esta forma la lectina anti H reacciona con mayor intensidad con eritrocitos O y con intensidad decreciente con eritrocitos A, B y AB. Para los efectos de nuestro trabajo utilizamos la lectina anti H con eritrocitos O solamente como se verá posteriormente.

Los dos tipos de antisuecos y la lectina mencionados deben utilizarse con una concentración de anticuerpos adecuados. Para esto se titularon los antisuecos anti A, anti B y lectina anti H con eritrocitos A, B

y 0 respectivamente. La titulación es un procedimiento semi-cuantitativo que mide la cantidad de anticuerpos presentes en un antisuero. Para titular los antisueros se utilizaron diluciones seriadas de estos en solución salina. Posteriormente la adición de eritrocitos correspondientes a cada antisuero nos permitió apreciar la mayor dilución de cada antisuero en la cual se obtuvo aglutinación visible a la cual se le asignó el valor +. El valor recíproco de esta dilución correspondió al título de ese antisuero. Así por ejemplo, si la última dilución positiva fue 1/512 el título de ese antisuero fue 512 (44).

La titulación se realizó de acuerdo al siguiente procedimiento (24):

- Para cada antisuero (anti A, anti B y lectina anti H) tomar una batería de 10 tubos, numerados de 1 a 10.
- Agregar a cada tubo 100 ul. de solución salina 0.9% más EDTA 1.5%.
- Agregar al primer tubo de cada serie 100 ul. del antisuero a titular, con el objeto de obtener una dilución del antisuero de 1:2 y mezclar.

- Tomar 100 ul. del tubo 1 de cada serie y llevarlos al tubo 2. Repetir lo mismo del 2 al 3 y así sucesivamente hasta el tubo 10 de cada batería con el objeto de tener diluciones seriadas de los antisueros desde 1:2 a 1:1024, teniendo cuidado de mezclar cada dilución.
- Agregar 1 gota de eritrocitos A, B y O suspendidos al 4% en solución salina al 0.9% más EDTA al 1.5% a las series de antisuero anti A, anti B y lectina anti H respectivamente.
- Mezclar. Dejar 5 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar 1 minuto a 1.000 r.p.m.
- Leer aglutinación y asignar el título de anticuerpos a cada antisuero.

Los títulos de los antisueros fueron de 512 para el anti A, 512 para el anti B y 256 para la lectina anti H como se puede apreciar en la Tabla V.

Con el objeto de diluir los sueros apropiadamente se utilizó una concentración de 16 veces la dilución correspondiente al título del antisuero. Así por ejemplo, si el título de un antisuero fue 512 la dilu-

T A B L A V

TITULACION DE LOS ANTISUEROS ANTI A, ANTI B Y LECTINA ANTI H
CON ERITROCITOS A, B Y O RESPECTIVAMENTE

ANTISUERO	DILUCION DEL ANTISUERO									
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
anti A	++++	++++	++++	+++	++++	+++	+++	++	+	-
anti B	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	-
lectina anti H	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	-	-

NOTA: El número de cruces indica intensidad de aglutinación.

ción de trabajo fue 1:32. Se utilizó este criterio siguiendo a Allison (24) y en base a pruebas previas realizadas en nuestro laboratorio.

Las diluciones usadas en cada caso fueron por lo tanto las siguientes:

<u>Antisuero</u>	<u>Título</u>	<u>Dilución a usar</u>
anti A	512	1 : 32
anti B	512	1 : 32
anti H (con eritrocitos O)	256	1 : 16

El procedimiento utilizado para la tipificación del grupo sanguíneo ABO de cada espécimen de músculo de momia (17,24) fue el siguiente:

- Para cada momia, poner por separado en cada uno de tres tubos marcados A, B y H respectivamente, 200 mgr. de músculo de momia previamente molido en la forma descrita anteriormente.
- Lavar 2 veces el polvo muscular en solución salina al 0.9%. Centrifugar a 2.500 r.p.m. durante 20 minutos en cada caso.

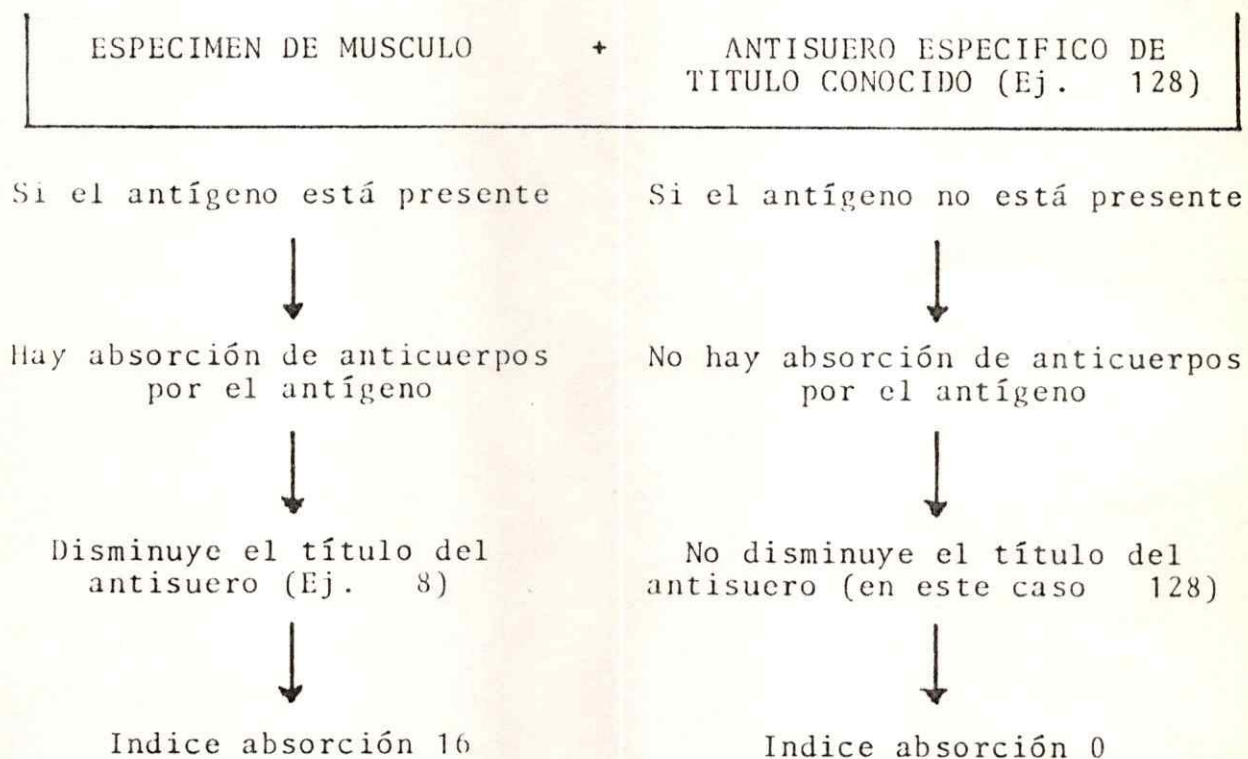
- Retirar cuidadosamente el sobrenadante después del primero y segundo lavado con el objeto de dejar el polvo muscular en cada tubo.
- Agregar 0.5 ml. de antisuero anti A, anti B y lectina anti H a la dilución deseada, a los tubos A, B y H respectivamente, y mezclar cuidadosamente.
- Incubar durante 12 - 24 horas a temperatura ambiente
- Centrifugar a 2.500 r.p.m. durante 20 minutos.
- Separar el sobrenadante de cada tubo y volver a centrifugarlo durante 10 minutos a 2.500 r.p.m. con el objeto de obtener un sobrenadante libre de residuos de músculo.
- Titular el sobrenadante de los tubos anti A, anti B y anti H (de la misma forma descrita para los antisuecos pre-dilución) y los correspondientes antisuecos diluidos usados para el test en forma previa a realizarlo, con eritrocitos A, B y O según corresponda.
- Comparar los títulos de los sobrenadantes de cada tubo con los correspondientes títulos de los antisuecos anti A, anti B y anti H diluidos usados para el test.

En cuanto a la interpretación de los resultados (ver figura 4), cabe señalar que si el antígeno está presente hay absorción de anticuerpos por parte del antígeno y por lo tanto disminuye la concentración de anticuerpos en el sobrenadante. De este modo al titular el sobrenadante con eritrocitos testigos, el título de este disminuye en relación al título del mismo antisuero antes de realizar el test. Por ejemplo, si el título inicial de un antisuero fue 128 y después del test fue 8 hubo una disminución del título. Esta disminución del título se cuantificó con un índice de absorción que correspondió al número de veces que el título original disminuyó (22) en este caso el índice de absorción sería 16.

Si el antígeno no está presente, no hay absorción de anticuerpos por el antígeno y por lo tanto al titular el sobrenadante con eritrocitos testigos no disminuye la concentración de anticuerpos en el sobrenadante y el título se mantiene. En este caso se mantendría un título de 128 y el índice de absorción sería 0.

Un índice de cuatro o más se considera positivo. Para asignar un resultado se realiza el test al

F I G U R A 4

ESQUEMA DEL PRINCIPIO GENERAL DE LA TECNICA
DE INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION

menos dos veces. Los índices de absorción se promedian y un índice promedio de cuatro o más se considera positivo en tanto un índice promedio de tres a cero se considera negativo (19,22).

Debido a que la lectina anti H reconoce la molécula H presente en células de grupo sanguíneo O, pero también A, B y AB, se utilizó el siguiente criterio para asignar las muestras a sus respectivos grupos sanguíneos. Aquellas muestras que presentaron un índice de absorción promedio de 4 a 16 con anti A, de 0 a 3 con anti B y de 0 a 16 con anti H fueron asignadas a grupo sanguíneo A. Muestras con índices de absorción de 0 a 3 con anti A, de 4 a 16 con anti B y de 0 a 16 con anti H se clasificaron como grupo B. Muestras con índices de absorción de 0 a 3 con anti A y con anti B y de 4 a 16 con anti H, se clasificaron como O y finalmente muestras con índices de absorción de 4 a 16 con anti A y anti B y de 0 a 16 con anti H, se asignaron a grupo sanguíneo AB.

Como control de la técnica se utilizó especímenes de músculo de cadáveres frescos de grupo sanguíneo conocido. Para esto se obtuvieron muestras de músculo y sangre de una misma persona sometida a autopsia en la

sección Anatomía Patológica del Hospital José Joaquín Aguirre. Se tipificó cada muestra de sangre con el objeto de conocer el grupo sanguíneo del músculo correspondiente. Enseguida se procedió a liofilizar las muestras de músculo con el objeto de tratarlas de la misma forma que las muestras de músculo de momia para tipificar sus grupos sanguíneos.

Se tipificaron en duplicado 7 muestras control 3 de grupo sanguíneo A, 3 de grupo sanguíneo O y 1 de grupo sanguíneo B.

3. DETERMINACION DE LA CONTAMINACION BACTERIANA

3.1. Procedimiento usado para microscopía óptica y tinción de Gram

Para determinar la contaminación bacteriana presente en nuestros especímenes de músculo, realizamos una tinción de Gram en cortes para microscopía óptica de los mismos especímenes usados para la tipificación de grupo sanguíneo ABO (23,24). El estudio histológico se realizó en 30 especímenes de los 54 estudiados. La selección de los especímenes

se realizó al azar dentro de cada período cultural de modo de contar con 10 ejemplares de cada período, excepto del período arcaico del cual no se hizo estudio histológico debido a la escasez de material con que se contó.

La distribución de especímenes estudiados con el método de Gram para microscopía óptica fue la siguiente:

Período agricultores tempranos

Sitio El Laucho : 8 especímenes
 Sitio Alto Ramírez : 2 especímenes

Período agricultores medios

Sitio Maitas Chiribaya : 9 especímenes
 Sitio Azapa 3 : 1 espécimen

Período agricultores tardios

Sitio Playa Miller 3 y 4 : 7 especímenes
 Sitio Azapa 8 : 3 especímenes

Para el estudio de microscopía óptica los especímenes de músculo de momia fueron fijados en Bouin alcohólico durante 15 días a temperatura ambiente. Se utilizó este tiempo de fijación largo, con el objeto de hidratar los especímenes en base a

pruebas realizadas en nuestro laboratorio. Una vez fijados e hidratados los trozos de tejido muscular se sometieron a una deshidratación en alcoholes etílicos en graduación ascendente y se incluyeron en parafina de acuerdo a procedimientos estandard para luego obtener cortes de 4-5 um en un micrótomo Minot rotatorio, los cuales se montaron sobre portaobjetos con albúmina de Mayer (45). La tinción de los cortes se realizó de acuerdo a la técnica de Gram para identificación de bacterias en cortes de tejido (46) con algunas modificaciones de los tiempos de tinción y diferenciación basados en pruebas previas realizadas en nuestro laboratorio.

El procedimiento de tinción de Gram utilizado fue el siguiente:

- Desparafinar los cortes en xilol e hidratarlos en etanoles en concentraciones decrecientes hasta llevarlos al agua destilada.
- Colocar los cortes 20 segundos en solución de cristal Violeta de Hucker-Conn.
- Lavar brevemente en agua destilada.

- Colocar los cortes 20 segundos en solución de Yodo de Weigert.
- Decolorar con acetona hasta que el tejido se observe casi sin color (realizar un control riguroso al microscopio).
- Lavar en agua.
- Tinción de contraste con safranina por 20 segundos.
- Diferenciar y deshidratar por goteo con acetona hasta que el tejido se observe con una coloración de fondo suave (realizar control riguroso al microscopio).

El hallazgo de ciertas estructuras en los cortes histológicos estudiados por el método de Gram, nos motivó a intentar identificarlas. Con este fin los seis especímenes siguientes números 11 y 15 del sitio El Laucho, números 92 y 97 del sitio Maitas Chiribaya, la número 82 del sitio Azapa 81 y la número 42 del sitio Playa Miller 3 y 4 pertenecientes a los 3 períodos estudiados para contaminación bacteriana fueron sometidas a otros procedimientos que se describen a continuación.

3.2. Tinción para esporas de acuerdo al método de Schaeffer y Fulton (47).

Para realizar esta tinción se utilizaron cortes histológicos fijados, incluidos y cortados de acuerdo a la técnica descrita para microscopía óptica. A continuación los cortes se desparafinaron en xilol e hidrataron en etanoles en concentraciones decrecientes hasta llevar los cortes al agua destilada. Luego se colocaron al vapor de un matraz hirviendo, con el lado del corte hacia arriba; cuando se reunieron gotas grandes en la parte inferior del portaobjetos se agregó solución acuosa de verde de malaquita al 5% durante 30 segundos. Se lavaron los cortes brevemente en agua fría y luego se realizó una tinción de contraste de safranina al 0.5%, fucsina 0.05% durante 15 segundos.

NOTA: Los tiempos de coloración con ambos colorantes corresponden a modificaciones de la técnica original debido a pruebas realizadas por nuestro laboratorio.

3.3. Tinción para hongos de acuerdo al método de Gomori
(45).

Para realizar esta tinción se utilizaron cortes histológicos fijados, incluidos y cortados de acuerdo a la técnica descrita para microscopía óptica. Posteriormente para teñir los cortes se desparafinaron e hidrataron en etanoles en concentraciones decrecientes hasta llevar los cortes al agua destilada. Luego se oxidaron en ácido crómico al 5% por una hora, se lavaron por 10 minutos en agua corriente y se trataron con bisulfito de sodio al 1% por un minuto. Después de lavar los cortes por 5 minutos en agua corriente se lavaron en agua destilada (3 cambios) y se incubaron en una solución de metanamina al 1.5%, nitrato de plata al 0.1% y borato al 0.5% durante 1 hora a 45-50°C. Luego se lavaron en agua destilada 3 veces y se pasaron por cloruro de oro al 0.1% por 5 minutos para volver a lavar en agua destilada. A continuación los cortes se trataron con tiosulfito de sodio al 2% durante 2 minutos y se lavaron cuidadosamente en agua. Finalmente se deshidrataron y montaron en resina sintética.

3.4. Estudio de microscopía electrónica de transmisión

Para el estudio ultraestructural, las muestras de músculo esquelético fueron fijadas en glutaraldehído al 3.5% en tampón cacodilato de sodio 0.1 M pH 7.3 a 4°C durante 24 horas. Se utilizó este tiempo de fijación con el objeto de permitir que las muestras se hidrataran simultáneamente. Una vez fijados e hidratados los tejidos se lavaron en tampón cacodilato de sodio 0.1 M pH 7.3. Posteriormente se fijaron en tetróxido de Osmio al 1% y se incluyeron en Epón 812 según la técnica de Luft (48).

Cortes semifinos (de $\approx 1 \mu\text{m}$) teñidos con azul de toluidina y cortes ultrafinos de $\approx 700 \text{ \AA}$ contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo según Reynolds (49) se observaron en un fotomicroscopio Leitz y en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM 109 a 80 KV, respectivamente. (El estudio de microscopía electrónica de transmisión se realizó en colaboración con el Laboratorio de Microscopía Electrónica del Departamento de Biología Celular y Genética, División de Ciencias Médicas Norte, Facultad de Medicina, Universidad de Chile).

3.5. Estudio por cultivo

Para el estudio por cultivo se siguió el siguiente esquema. Cada espécimen de tejido muscular de momia fue separado en dos porciones, una porción fue sometida a un procedimiento especial para cultivar esporas que consistió en calentarla a una temperatura de 80°C por 30 minutos con el objeto de desencadenar el proceso de la germinación y además de destruir toda la flora contaminante vegetativa (50), la otra porción no fue sometida al calor. Los procedimientos que se describirán a continuación fueron idénticos para ambas porciones de cada espécimen y se realizaron en duplicado.

En primer lugar los especímenes se trituraron en morteros estériles para obtener una emulsión. Estas emulsiones se sembraron en los siguientes medios de cultivo:

- Aerobios: Agar Lactosado, Agar Sangre, Agar Saboureaud.
- Tensión CO₂: Agar Sangre.
- Anaerobios (Cámara Gaspack) (51): Caldo de Carne Anaeróbico, Thioglicolato y Agar Sangre (Vitamina K y Hemina).

Posteriormente las lecturas de las observaciones se hicieron a las 48 horas (Aerobios y Tensión de CO_2) y a las 72 horas en Anaerobios. Todos los cultivos se dieron por negativos a la semana de observación. El estudio por cultivo se realizó en la Unidad de Microbiología del Departamento de Microbiología y Parasitología, División de Ciencias Médicas Norte, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

4. ANALISIS DE CORRELACION ENTRE CONTAMINACION BACTERIANA Y GRUPO SANGUINEO ABO

Finalmente se calculó el coeficiente de correlación no paramétrico de Spearman (r_s) (52) entre cantidad de microorganismos contaminantes de los tejidos y presencia o ausencia de grupo sanguíneo detectable.

R E S U L T A D O S

GRUPO SANGUINEO ABO

En las próximas Tablas se presentan los resultados obtenidos en la tipificación del grupo sanguíneo ABO de los especímenes de músculo de cadáveres y momias. En primer lugar presentamos algunos resultados individuales. En la Tabla VI se pueden observar los títulos e índices de absorción obtenidos en el espécimen control de cadáver número 1, cuyo grupo sanguíneo tipificado en sangre fue A. Como se puede apreciar da un índice de absorción de 16 con anti A, de 0 con anti B y de 8 con anti H. Por lo tanto el espécimen se puede asignar a grupo sanguíneo A. En la Tabla VII se describe la tipificación del espécimen control de cadáver número 7 de grupo sanguíneo B conocido, con sus correspondientes índices de absorción. Este puede asignarse al grupo sanguíneo B. En la Tabla VIII el espécimen de cadáver número 4 de grupo sanguíneo O de acuerdo a la tipificación en sangre, da un índice de absorción significativo sólo con anti H. En la Tabla IX aparece el espécimen de músculo de momia número 99, el cual no presenta absorción significativa con ningún antisuero y por lo tanto no puede ser determinado

T A B L A VI

TITULOS, INDICES DE ABSORCION Y GRUPO SANGUINEO ABO DEL
 ESPECIMEN DE MUSCULO DE CADAVER NUMERO 1 TIPIFICADO
 PREVIAMENTE COMO GRUPO SANGUINEO A

Antisuero	Dilución del antisuero						
	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
anti A pre absorción		++++	++++	+++	++	+	-
anti A post absorción		-	-	-	-	-	-
anti B pre absorción		++++	++++	+++	++	+	-
anti B post absorción		++++	++++	+++	++	+	-
anti H pre absorción	++++	++++	+++	++	+	-	-
anti H post absorción	++	+	-	-	-	-	-

Indices de absorción

anti A = 16
 anti B = 0
 anti H = 8

Grupo sanguíneo

A

NOTA: El número de cruces indica intensidad de aglutinación.

T A B L A VII

TITULOS, INDICES DE ABSORCION Y GRUPO SANGUINEO ABO DEL
 ESPECIMEN DE MUSCULO DE CADAVER NUMERO 7 TIPIFICADO
 PREVIAMENTE COMO GRUPO SANGUINEO B

Antisuero	Dilución del antisuero						
	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
anti A pre absorción		++++	++++	++++	++	+	-
anti A post absorción		++++	+++	++	+	-	-
anti B pre absorción		++++	++++	+++	++	+	-
anti B post absorción		+	-	-	-	-	-
anti H pre absorción	++++	++++	+++	++	+	-	-
anti H post absorción	++++	+++	++	+	-	-	-

Indices de absorción

anti A = 2
 anti B = 16
 anti H = 2

Grupo sanguíneo

B

NOTA: El número de cruces indica intensidad de aglutinación.

T A B L A VIII

TITULOS, INDICES DE ABSORCION Y GRUPO SANGUINEO ABO DEL
 ESPECIMEN DE MUSCULO DE CADAVER NUMERO 4 TIPIFICADO
 PREVIAMENTE COMO GRUPO SANGUINEO O

Antisuero	Dilución del antisuero						
	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
anti A pre absorción		++++	++++ _{1/2}	+++	++	+	-
anti A post absorción		++++	++++	+++	++	+	-
anti B pre absorción		++++	++++	+++	++	+	-
anti B post absorción		++++	++++	++	+	-	-
anti H pre absorción	++++	++++	++++	+++	+	-	-
anti H post absorción	++	+	-	-	-	-	-

Indices de absorciónGrupo sanguíneo

anti A = 0
 anti B = 2
 anti H = 8

0

NOTA: El número de cruces indica intensidad de aglutinación.

T A B L A IX

TITULOS, INDICIS DE ABSORCION Y GRUPO SANGUINEO ABO
DEL ESPECIMEN DE MUSCULO DE MOMIA NUMERO 99

	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
anti A pre absorción		++++	++++	+++	++	+	-
anti A post absorción		++++	+++	++	+	-	-
anti B pre absorción		++++	++++	+++	++	+	-
anti B post absorción		++++	+++	++	+	-	-
anti H pre absorción	++++	++++	+++	++	+	-	-
anti H post absorción	++++	+++	++	+	-	-	-

Indices de absorción

anti A = 2

anti B = 2

anti H = 2

Grupo sanguíneo

(-)

NOTA: El número de cruces indica intensidad de aglutinación.

su grupo sanguíneo.

A continuación presentamos los índices de absorción y los respectivos grupos sanguíneos de las muestras estudiadas. En primer lugar en la Tabla X se pueden apreciar los resultados obtenidos en los 7 especímenes control estudiados, los cuales pueden ser asignados inequívocamente a su grupo sanguíneo correspondiente.

En la Tabla XI aparecen los resultados obtenidos en la población más antigua estudiada que corresponde al sitio Morro de Arica. Los cuatro ejemplares estudiados de este sitio resultaron ser de grupo sanguíneo O. En la Tabla XII tenemos los resultados obtenidos en dos sitios arqueológicos del período cultural agricultores tempranos. En primer lugar en el sitio El Laucho, se estudiaron 13 momias, en 3 de estas no se logró determinar el grupo sanguíneo ABO. De los 10 ejemplares que presentaron especificidad antigénica, 9 fueron grupo sanguíneo O y 1 grupo sanguíneo A. Las 3 momias estudiadas del sitio Alto Ramírez resultaron grupo O. En la Tabla XIII aparecen los resultados obtenidos en 2 sitios arqueológicos del período cultural agricultores medios. En el sitio Maitas Chiribaya de 13 ejemplares estudiados, 12 fueron de grupo sanguíneo O y 1 sin grupo sanguíneo detectable, en tanto en el sitio Azapa 3 estudiamos 3 ejemplares,

T A B L A X

INDICES PROMEDIO DE ABSORCION Y GRUPO SANGUINEO ABO
DE LOS ESPECIMENES DE MUSCULO DE CADAVERES CONTROL

N°	Indices promedio de Absorción			Grupo Sanguíneo
	anti A	anti B	anti H	
1 (A)	16	0	8	A
2 (A)	16	0	6	A
3 (A)	16	0	8	A
4 (O)	0	0	16	O
5 (O)	2	1	12	O
6 (O)	2	2	16	O
7 (B)	2	16	8	B

1) Grupo sanguíneo tipificado en sangre.

T A B L A X I
 INDICES PROMEDIO DE ABSORCIÓN Y GRUPO SANGUINEO ABO
 ABORIGENES DE ARICA
 PERIODO CULTURAL ARCAICO
 (5000 - 3500 A.C.)

Sitio Morro de Arica (Costa)

N°	Indices promedio de Absorción			Grupo Sanguíneo
	anti A	anti B	anti H	
58	0	0	4	0
63	2	1	16	0
73	0	0	16	0
78	2	2	4	0

T A B L A X I I
 INDICES PROMEDIO DE ABSORCION Y GRUPO SANGUINEO ABO
 ABORIGENES DE ARICA
 PERIODO CULTURAL AGRICULTORES TEMPRANOS
 (530 - 490 A.C.)

Sitio El Laucho (Costa)

N°	Indices Promedio de Absorción			Grupo Sanguíneo
	anti A	anti B	anti H	
6	1	0	2	-
7	0	0	4	0
11	0	0	16	0
12	2	0	16	0
13	0	0	2	-
14	0	0	4	0
15	8	2	16	A
16	0	0	8	0
17	3	2	4	0
21	0	0	1	-
22	2	0	8	0
23	0	2	4	0
24	0	0	8	0

Sitio Alto Ramírez (Valle)

26	2	2	16	0
90	0	0	8	0
91	2	0	8	0

T A B L A X I I I
 INDICES PROMEDIO DE ABSORCION Y GRUPO SANGUINEO ABO
 ABORIGENES DE ARICA
 PERIODO CULTURAL AGRICULTORES MEDIOS
 (730 - 1000 D.C.)

Sitio Maitas Chiribaya (Valle)

N°	Indices promedio de Absorción			Grupo Sanguíneo
	anti A	anti B	anti H	
92	2	0	8	0
93	2	0	8	0
94	2	2	16	0
95	0	0	6	0
96	0	0	16	0
97	0	0	8	0
98	0	2	6	0
99	2	2	3	-
100	0	0	12	0
101	0	0	4	0
102	0	0	8	0
103	0	0	16	0
110	0	0	16	0

Sitio Azapa 3 (Valle)

27	2	2	12	0
85	0	0	16	0
86	2	0	16	0

los 3 de grupo sanguíneo O. Finalmente, en la Tabla XIV se pueden observar los resultados obtenidos en el período cultural agricultores tardíos. De este período se estudiaron dos sitios arqueológicos. El sitio Playa Miller 3, 4 incluyó 12 momias, en 4 de estas no se logró determinar el grupo sanguíneo, en tanto las 8 restantes fueron grupo O. El sitio Azapa 8 comprendió 6 ejemplares, todos de grupo sanguíneo O.

En la Tabla XV se pueden apreciar las frecuencias fenotípicas del grupo sanguíneo ABO en las poblaciones estudiadas. Se encontró una momia de grupo sanguíneo A en el sitio El Laucho por lo tanto, la frecuencia de este grupo sanguíneo en este sitio alcanza un 10% siendo el 90% restante de grupo sanguíneo O. En el resto de los sitios arqueológicos estudiados sólo se encontró momias de grupo sanguíneo O. Si consideramos el total de momias estudiadas veremos que un 2.17% de estas pertenecen a grupo sanguíneo A, un 0% a grupo B y AB y un 97.83% pertenecen a grupo sanguíneo O. Por otra parte en relación a la frecuencia de momias sin grupo sanguíneo detectable vemos que oscila entre un 0% encontrado en los sitios Morro de Arica, Alto Ramírez, Azapa 3 y Azapa 8 y un 33.3% encontrado en Playa Miller 3, 4. No se encontró una relación entre antigüedad del sitio arqueológico y porcentaje de individuos sin grupo sanguíneo

T A B L A X I V
 INDICES PROMEDIO DE ABSORCION Y GRUPO SANGUINEO ABO
 ABORIGENES DE ARICA
 PERIODO CULTURAL AGRICULTORES TARDIOS
 (1100 - 1370 D.C.)

Sitio Playa Miller 3, 4 (Costa)

N°	Indices Promedio de Absorción			Grupo Sanguíneo
	anti A	anti B	anti H	
30	0	0	4	0
31	0	0	2	-
35	0	0	4	0
38	2	2	4	0
39	0	0	2	-
40	3	0	4	0
42	0	2	4	0
44	2	0	6	0
45	0	0	2	-
46	2	2	8	0
113	2	2	4	0
114	0	0	0	-

Sitio Azapa 8 (Valle)

30	2	0	8	0
81	2	2	16	0
82	0	2	12	0
85	2	1	8	0
34	2	2	4	0
117	2	2	16	0

T A B L A X V
 FRECUENCIAS FENOTIPICAS DE GRUPO SANGUINEO ABO (EN PORCENTAJES) EN LAS POBLACIONES ESTUDIADAS

SITIO ARQUEOLOGICO	PERIODO CULTURAL	FECHADO	N	GRUPO SANGUINEO (%)*												
				AB		A		B		O		(-)				
				n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
Morro de Arica	Arcaico	5000	-3500 A.C.	4	0	0.0	0	0.0	0	0.0	4	100.0	0	0.0	0	0.0
El Laucho	Agricultores tempranos	530	A.C.	13	0	0.0	1	10.0	0	0.0	9	90.0	3	23.1		
Alto Ramfrez	Agricultores tempranos	490	A.C.	3	0	0.0	0	0.0	0	0.0	3	100.0	0	0.0		
Maitas Chirihaya	Agricultores medios	730	-1000 D.C.	13	0	0.0	0	0.0	0	0.0	12	100.0	1	8.3		
Azapa 3	Agricultores medios	800	D.C.	3	0	0.0	0	0.0	0	0.0	3	100.0	0	0.0		
Playa Miller 3, 4	Agricultores tardios	1140	-1370 D.C.	12	0	0.0	0	0.0	0	0.0	8	100.0	4	33.3		
Azapa 8	Agricultores tardios	1100	D.C.	6	0	0.0	0	0.0	0	0.0	6	100.0	0	0.0		
Total	Precolombinos	3500 A.C.-1300 D.C.		54	0	0.0	1	2.17	0	0.0	45	97.83	8	14.8		

* Los porcentajes de grupos sanguíneos fueron obtenidos en base a los especímenes con especificidad antigénica ABO.
 N = Número de individuos estudiados.
 n = Número de individuos de cada grupo sanguíneo.

detectable. Si consideramos la población total tenemos un 14.8% de individuos sin especificidad antigénica detectable.

CONTAMINACION BACTERIANA

Con respecto a la contaminación bacteriana presente en nuestras momias, el estudio de microscopía óptica y tinción de Gram puso en evidencia la presencia de estructuras de forma ovoide y tamaño aproximado de 1-2 μm en todas las momias estudiadas. Algunas de estas estructuras no se colorearon en absoluto con el método de Gram pudiendo observarse sólo por contraste, en tanto en otras se produjo una coloración tipo Gram (-) en la parte externa de estas estructuras presentando el centro sin tinción (figura 5a). La morfología y tamaño de estas estructuras sugirió que probablemente correspondían a esporas de origen bacteriano. La tinción de Schaeffer y Fulton para esporas realizada dió por resultado una coloración positiva. Las estructuras se observaron teñidas de verde tenuemente en su interior y presentaron el borde teñido más intensamente (ver figura 5b).

La tinción realizada para identificación de hongos de acuerdo al método de Gomori dió un resultado nega-

Figura 5: Microfotografías de cortes histológicos a microscopía óptica de músculo esquelético de momia.

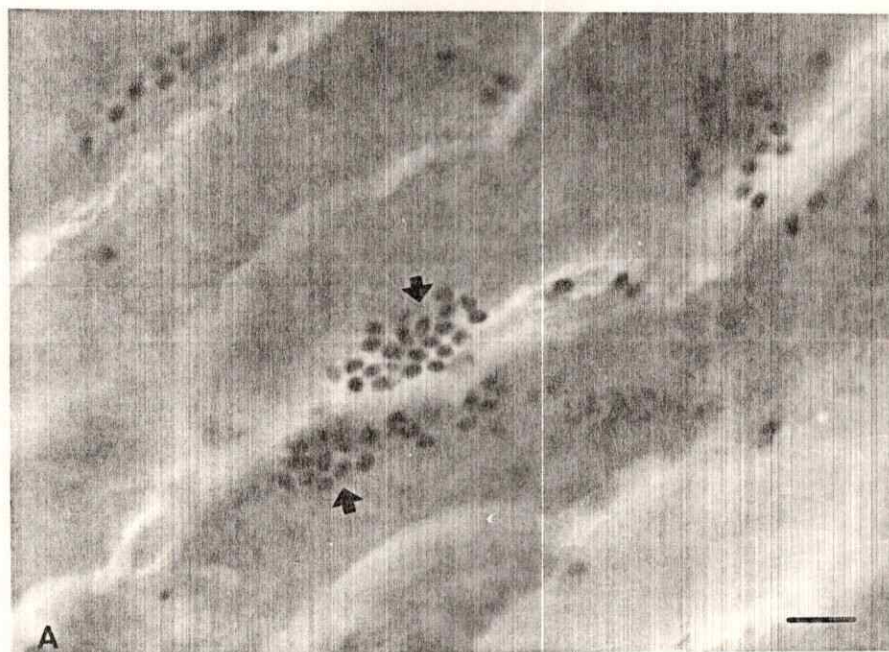
a) Momia número 97. Tinción de Gram para identificación de bacterias en cortes de tejidos, de acuerdo al método de Lillie.

Las flechas señalan las estructuras Gram (-).

b) Momia número 97. Tinción de Schaeffer y Fulton para esporas.

Las flechas señalan las estructuras positivas para esta tinción.

La barra corresponde a 5 um. para las dos fotografías de la figura.



tivo no observándose estas estructuras con tinción positiva. Finalmente al observar los cortes sin tinción con el microscopio de contraste de fase se pudo apreciar que estas estructuras presentaban un aspecto refringente muy característico de las esporas bacterianas (ver figura 6).

Por otra parte, el estudio ultraestructural permitió observar en los tejidos estructuras de morfología compleja, muy similar a la descrita para esporas bacterianas, de un tamaño aproximado de 1-2 μm . en las seis muestras estudiadas (figura 7). Estas estructuras presentaron un centro electrón denso, luego una zona electrón lúcida de aspecto muy similar al del córtex de una endospora bacteriana. En la región más externa se pudo apreciar una cubierta electrón densa, que en algunos casos se podía resolver en varias láminas o capas concéntricas que corresponderían a la región de la cutícula de la endospora. Ocasionalmente, por fuera de esta zona electrón densa externa, se observó una zona clara rodeada de una cubierta fina, que correspondería al exosporio de la espora como se puede apreciar en la figura 7b. Llama la atención el hallazgo en el espécimen número 15 del sitio El Laucho, de una espora parcialmente destruida dentro del bacilo (ver figura 7d).

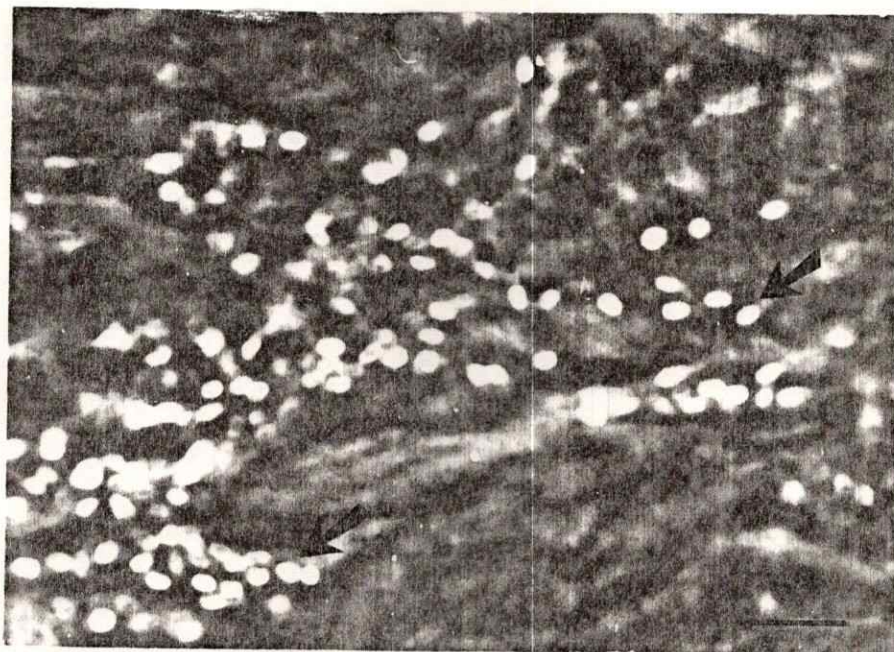


Figura 6: Microfotografía de un corte histológico de músculo esquelético de la momia número 97, observado al microscopio de contraste de fase. Las flechas señalan las estructuras refringentes. La barra corresponde a 5 μm .

Figura 7: Microfotografías electrónicas de cortes de músculo esquelético de momias en las cuales se observan esporas bacterianas.

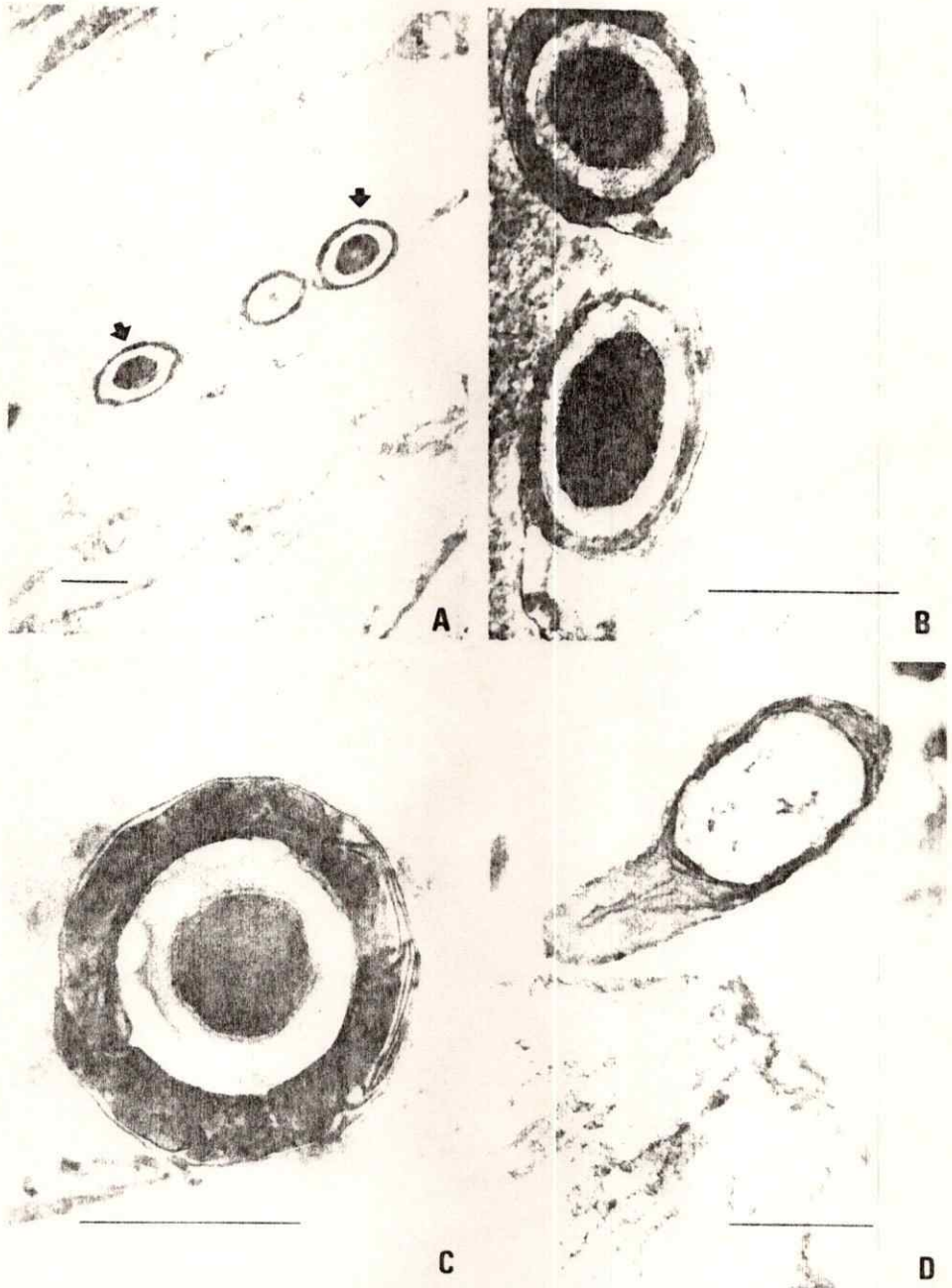
a) Momia número 97. Las flechas señalan esporas bacterianas.

b) Momia número 92.

c) Momia número 82.

d) Momia número 15: Se observa una espora bacteriana, parcialmente destruida dentro del cuerpo bacteriano.

La barra corresponde a 1 um. para todas las fotografías de la figura.



La observación realizada de estas estructuras ovoideas, en los 6 especímenes estudiados por microscopía óptica y microscopía electrónica, nos permitió concluir que se trataba de esporas probablemente bacterianas. Como estas mismas estructuras se observaron en las 30 momias estudiadas por la tinción de Gram, podemos extrapolar que estas 30 momias contenían esporas bacterianas como contaminantes.

Por otra parte el estudio de cultivo reveló que los cultivos fueron negativos para la porción de muestra sometida a calentamiento, en las 6 momias. En la porción de la muestra no calentada, se obtuvo desarrollo positivo en un sólo caso de los 6. Los gérmenes que se desarrollaron fueron un *Bacillus* sp en la momia 92 y una *Cocácea* Gram (+) tipo micrococus en el duplicado de la misma. Este hecho nos indicó que sólo se trató de gérmenes contaminantes, no relacionados con las esporas observadas. Por lo tanto, podemos concluir que no nos fue posible cultivar las esporas contaminantes de los especímenes de músculo de momia estudiados.

La momia número 15 tipificada como grupo sanguíneo A presentó las mismas características de contaminación bacteriana que el resto de los especímenes. En cortes histológicos para microscopía óptica de esta momia se identificaron esporas bacterianas en regular cantidad, a microscopía electrónica, sólo se encontró esporas contaminantes y finalmente no se logró cultivar estas esporas.

ANALISIS DE CORRELACION ENTRE CONTAMINACION BACTERIANA Y GRUPO SANGUINEO ABO

Finalmente se intentó cuantificar la cantidad de esporas contaminantes de las 30 momias estudiadas con tinción de Gram, con el objeto de relacionar la cantidad de contaminación existente con presencia o ausencia de grupo sanguíneo detectable. Para esto se clasificaron las 30 muestras estudiadas con tinción de Gram en tres clases, denominadas 3, 2, y 1 en orden decreciente de contaminación.

La categoría caracterizada por una contaminación de 3 correspondió a aquellos especímenes con esporas presentes en todos los campos del microscopio en cantidad superior a 10 estructuras por campo. La segunda categoría grado 2 de contaminación incluyó aquellos especímenes con esporas al menos cada 3 ó 4 campos y en cantidad inferior a 10 estructuras en esos campos. La tercera categoría con una contaminación de 1 incluyó aquellos especímenes que presentaron esporas sólo ocasionalmente en algunos campos del microscopio (el campo del microscopio considerado corresponde al lente de 100 X).

En la Tabla XVI se puede apreciar la distribución de contaminantes de los especímenes de músculo estu-

T A B L A XVI

GRADO DE CONTAMINACION DE ESPORAS BACTERIANAS DE
LOS ESPECIMENES ESTUDIADOS CON TINCION DE
GRAM SEGUN PLRIODO CULTURAL

PERIODO CULTURAL	ESPECIMEN NUMERO	GRADO CONTAMINACION
Agricultores tempranos	11	2
	13	1
	15	2
	17	1
	21	2
	22	1
	23	1
	24	1
	26	1
	91	1
Agricultores medios	86	2
	92	2
	93	1
	94	2
	95	3
	96	3
	97	3
	98	3
	99	2
		102
Agricultores tardios	40	2
	42	2
	44	2
	45	2
	46	2
	80	2
	81	2
	82	2
	113	2
114	2	

diados, en las 3 categorías mencionadas. Llama la atención que los especímenes más contaminados pertenecen al período agricultores medios, en tanto los especímenes del período agricultores tempranos presentan en promedio un grado menor de contaminación.

El coeficiente de correlación no paramétrico de Spearman (r_s) calculado entre grado de contaminación (según las categorías mencionadas) y presencia o ausencia de grupo sanguíneo detectable resultó ser no significativo.

D I S C U S I O N

En la presente tesis se tipificó el grupo sanguíneo ABO de 54 momias Precolombinas del Valle de Azapa, Chile. Se eligió esta zona debido a que las condiciones particulares del clima y la composición del suelo, han permitido la conservación de seres humanos momificados durante cientos o miles de años. Este hecho unido por una parte a la valiosa y extensa labor arqueológica desarrollada por el Departamento de Antropología de la Universidad de Tarapacá en el Valle y su desembocadura y por otra a la existencia de una secuencia cronológica comprobada que cubre un período de aproximadamente 6.000 años, ha permitido contar con material de gran calidad por su grado de conservación, su fechado y su asignación precisa a una localidad o sitio arqueológico.

CONSIDERACIONES ACERCA DE LA TECNICA DE INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION

La tipificación del grupo sanguíneo ABO en momias mediante la técnica de inhibición de la hemaglutinación ha sido utilizada por numerosos investigadores con an-

terioridad y cada uno de ellos ha introducido variaciones menores. En el presente trabajo fue igualmente necesario introducir variantes que guardaron relación con la cantidad de tejido muscular de momia a usar, la concentración de los antisueros y los índices de absorción que serían considerados significativos para asignar una muestra a un grupo sanguíneo determinado.

En relación a la cantidad de tejido muscular a usar, los diferentes autores han utilizado entre 50 y 400 mgr. para cada antisuero. Nosotros realizamos pruebas con 50, 100, 200 y 400 mgr. de músculo de momia encontrando que con 200 y 400 mgr. se obtenían idénticos resultados, en tanto que con 50 y 100 mgr. no se lograba tipificar un 10% de los especímenes que se tipificaron con 200 y 400 mgr. Por esta razón se decidió utilizar 200 mgr. de músculo de momia para cada antisuero. La concentración de los antisueros utilizada de acuerdo a las técnicas descritas en la literatura, es también variada. Es así como algunos autores utilizan antisueros con un alto título de anticuerpos (aproximadamente 512) (17), en tanto otros autores prefieren utilizar antisueros diluídos a concentraciones similares a las utilizadas en el presente trabajo (24). La concentración de anticuerpos en los antisueros es importante puesto que al

utilizar antisueros muy concentrados se tiene un exceso de anticuerpos con lo cual disminuye la sensibilidad de la técnica y por otra parte antisueros de título muy bajo no permiten tener índices de absorción significativos. Nosotros estudiamos 30 especímenes en duplicado con antisueros diluidos de acuerdo al criterio descrito en el presente trabajo y con los antisueros sin diluir, es decir con títulos de 512 para anti A y anti B y de 256 para la lectina anti H. Los resultados de estas pruebas demostraron que con los antisueros concentrados no se lograba tipificar un 6.5% de los especímenes que tenían especificidad antigénica demostrable con los antisueros diluidos.

Los índices de absorción considerados como significativos de especificidad antigénica es otro punto importante de la técnica. Nosotros consideramos un índice de absorción mínimo de 4 como significativo siguiendo a Etcheverry (17); Suárez-Morales y Linares (22); Gilbey y Lubran (19). Es importante considerar que los tejidos momificados tienen un contenido menor de determinantes antigénicos que los tejidos de cadáveres recientes, como ha sido demostrado por Pardini (53). Este autor estimó que el contenido de hexosaminas, glucosa y galactosa de tejidos de momias corresponde a un 25% del contenido de los tejidos frescos.

Por esta razón en general no es posible obtener índices de absorción muy altos con los tejidos momificados. Por otra parte, titulaciones repetidas de un mismo antisuero nunca dieron variaciones por azar mayores que un índice de 2; este hecho nos permitió considerar que un índice de absorción mínimo de 4 sería indicador de la existencia del respectivo antígeno y no de error experimental.

Los resultados obtenidos de la tipificación de grupo sanguíneo ABO de las 54 momias fue 1 momia grupo A, 45 grupo O y 8 sin especificidad ABO detectable con nuestros métodos. Ahora bien, debido a las dificultades técnicas que el procedimiento de tipificación presenta, se requiere ser especialmente crítico con los resultados obtenidos. En primer lugar se podría pensar que la técnica sólo sirve para determinar un tipo antigénico determinado, por ejemplo el grupo O, sin embargo los resultados obtenidos en las diferentes poblaciones de momias estudiadas demuestran lo contrario. Numerosos trabajos se han realizado en momias egipcias, europeas y americanas, en los cuales se ha tipificado grupo sanguíneo ABO. Los resultados obtenidos por los diferentes autores concuerdan en general bastante bien con aquellos correspondientes a las poblaciones vivientes que ocupan las áreas geográficas respectivas. Es así como en

estudios realizados en momias egipcias, alemanas, israelies y del área sub-ártica, se ha encontrado grupo sanguíneo A, B, AB y O en frecuencias similares a las de las respectivas poblaciones actuales (18,54,55,23). En momias de Norteamérica se ha detectado grupo sanguíneo A y O (20,23), en cambio en momias sudamericanas se han encontrado los grupos sanguíneos A y/o B en frecuencias bajas o ausentes (Tabla I). Estos resultados indican que la técnica permite detectar los diferentes tipos antigénicos en las momias cuando estos están presentes. Por otra parte los controles realizados con muestras de músculo de cadáveres de grupo sanguíneo conocido, corroboran el hecho de que la técnica permite identificar inequívocamente el antígeno presente en las células musculares como ha sido demostrado por varios autores, incluyendo el presente trabajo.

POSIBLE EFECTO DE LA CONTAMINACION BACTERIANA

Se ha postulado repetidamente que los resultados podrían estar sesgados por la posible contaminación bacteriana de las muestras de músculo de momia a tipificar, contaminación que podría alterar los resultados ya sea por la existencia de antígenos de especificidad ABO en las bac-

terras mismas o bien por la transformación con que puedan haber producido las enzimas bacterianas al actuar sobre los determinantes antigénicos ABO del músculo de momia en estudio. En la presente tesis se intentó evaluar la contaminación bacteriana existente en una muestra significativa de los especímenes estudiados. Los resultados nos permitieron concluir que los únicos contaminantes correspondieron a esporas bacterianas. Llama la atención la reacción de estas esporas frente a la tinción de Gram. Como es sabido las esporas en general no se tiñen con el método de Gram, sin embargo en este caso algunas de ellas se colorearon tipo Gram (-). Creemos que esto se debe a que algunas esporas estaban parcialmente destruidas perdiendo su impermeabilidad y permitiendo el paso del colorante.

Las esporas en general no poseen antígenos de grupo sanguíneo ABO descritos, además las esporas bacterianas son producidas por los géneros bacterianos *Bacillus* y *Clostridium*, géneros en los cuales no se han descrito determinantes antigénicos de grupo sanguíneo ABO (Tabla II). Por esta razón podemos descartar el hecho de que los contaminantes bacterianos de nuestras muestras hayan tenido antígenos de grupo ABO que hayan alterado nuestros resultados. No podemos, sin embargo excluir la posibilidad de que estos

contaminantes hayan producido un sesgo en nuestros resultados, puesto que en las formas vegetativas de algunas especies de los géneros bacterianos que esporulan, se han descrito enzimas que producen transformaciones de los grupos sanguíneos ABO de las células que invaden como se vió en la Tabla III. De esta forma durante la invasión bacteriana en su forma vegetativa pueden haberse producido transformaciones de las especificidades antigénicas ABO existentes en los especímenes estudiados. Desgraciadamente, como las esporas no pudieron cultivarse no fue posible identificar la especie bacteriana contaminante y por consiguiente conocer el tipo de enzima que pudieron haber tenido. Sin embargo como hemos visto, las transformaciones de los grupos sanguíneos por efecto de las diferentes enzimas bacterianas siempre ocurren en el sentido $A \rightarrow O$ o \emptyset , $B \rightarrow O$ o \emptyset y $O \rightarrow \emptyset$. En consecuencia el hecho de haber obtenido un espécimen de grupo sanguíneo A, puede considerarse un hecho real pudiendo haber existido un número mayor de individuos A o incluso B, los cuales perdieron su especificidad antigénica por degradación y no fuimos capaces de detectarlos. El haber encontrado en el espécimen tipificado como grupo sanguíneo A, un índice de absorción mayor con anti H que con anti A, podría ser indicador de que parte del antígeno A ha sido degradado a través del tiempo. Sin embargo, el hecho de que posea un índice de

absorción significativo con anti A, indica que efectivamente posee especificidad antigénica de grupo sanguíneo A. Cabe hacer notar que esta muestra se estudió en quintuplicado con el objeto de tener mayor seguridad acerca de los índices de absorción obtenidos. Llama la atención también que en el período agricultores tempranos, al cual pertenece este espécimen A, se encuentra en promedio una menor contaminación bacteriana por muestra que en los períodos posteriores como se vió en la Tabla XVI. Específicamente la muestra número 15 presentó una contaminación grado 2.

RELACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS CON HALLAZGOS PREVIOS

El hallazgo de grupo sanguíneo A en el presente trabajo es corroborado por resultados de trabajos previos obtenidos por otros autores (19,20,25) quienes también encontraron antígenos de grupo sanguíneo A y/o B en momias sudamericanas (ver Tabla I) y chilenas (Tabla XVII). En la Tabla XVII aparecen las frecuencias génicas para el gen A (p), B (q) y O (r) en diferentes estudios de momias realizados en poblaciones chilenas que se encuentran fechados y bien asignados a una localidad geográfica o sitio arqueológico. Como se puede apreciar, en momias precolombinas estu-

T A B L A XVII

FRECUENCIAS GENICAS DE GRUPO SANGUINEO ABO EN POBLACIONES PREHISTORICAS CHILENAS

POBLACIONES PREHISTORICAS	FECHADO	REFERENCIA	FRECUENCIAS GENICAS*		
			p	q	r
Atacameños	263 D.C.	Etcheverry et al. 1970 (17)	0.00	0.00	1.00
Atacameños	200 - 300 D.C.	Allison et al. 1978 (25)	0.04	0.00	0.96
Atacameños	1000 D.C.	Etcheverry et al. 1970 (17)	0.00	0.00	1.00
Atacameños	1550 - 1600 D.C.	Allison et al. 1978 (25)	0.05	0.00	0.95
Aborígenes Arica (Costa)	5000 - 3500 A.C.	Presente Trabajo	0.00	0.00	1.00
Aborígenes Arica (Costa)	530 A.C.	Presente Trabajo	0.05	0.00	0.95
Aborígenes Arica (Valle)	490 A.C.	Presente Trabajo	0.00	0.00	1.00
Aborígenes Arica (Valle)	730 - 1000 D.C.	Presente Trabajo	0.00	0.00	1.00
Aborígenes Arica (Valle)	800 D.C.	Presente Trabajo	0.00	0.00	1.00
Aborígenes Arica (Costa)	1140 - 1370 D.C.	Presente Trabajo	0.00	0.00	1.00
Aborígenes Arica (Valle)	1100 D.C.	Presente Trabajo	0.00	0.00	1.00

* p = frecuencia del gen A; q = frecuencia del gen B; r = frecuencia del gen O.

diadas por Etcheverry et al. (17), en San Pedro de Atacama sólo se detecta grupo sanguíneo O. En cambio, Allison et al. (25), encuentran el gen A en una frecuencia de 0.04 en una población precolombina de la misma localidad fechada en 200-300 D.C. Los resultados obtenidos por estos autores se aproximan a nuestro hallazgo del sitio El Laucho fechado en 530 A.C. Estando concientes que resulta aventurado generalizar a partir de un solo espécimen A tipificado por nosotros, nos inclinamos a postular que el sistema ABO era polimórfico en los valles costeros del Norte de Chile. Esta decisión se basa fundamentalmente en el hecho que Allison (56) al igual que nosotros, encontró grupo A en momias de varios sitios arqueológicos del Valle de Azapa.

Es sabido que algunos investigadores postularon que el sistema ABO era polimórfico en América Precolombina (19,20,25), sin embargo, otros científicos estudiando poblaciones aborígenes históricas, generalizaron la hipótesis de que los aborígenes sudamericanos precolombinos carecían de los alelos A y B para el sistema ABO (10,16,17). Es cierto que las poblaciones actuales de la foresta tropical son monomórficas para el gen O del sistema ABO (13,15), sin embargo las poblaciones andinas no lo son, presentando en general genes A y B en bajas frecuencias. Por ejemplo, en

la población de habla Aymará de las Provincias de Arica, Parinacota y General Lagos se han estimado frecuencias génicas de 0.0306 para el gen A, de 0.0064 para el gen B y de 0.9622 para el gen O (2). Para el sistema Rh en cambio los mismos autores encuentran una frecuencia de 0.0 para el haplotipo cde también indicador de mezcla caucasoide. De esta forma, si uno calcula el porcentaje de mezcla caucasoide de estos indígenas de acuerdo a la fórmula de Bernstein de 1931 (en 1), encuentra que el porcentaje de mezcla para el gen A es de 0.1851, para el gen B es de 0.2388 y para el gen O es de 0.2348 en cambio para el haplotipo cde es de 0.0. Como podemos apreciar, el porcentaje de mezcla caucasoide de estos indígenas es mayor al ser calculado utilizando el sistema ABO que el sistema Rh. Es preciso destacar que la presencia de d solamente es detectable cuando el gen se presenta en frecuencias tales que se pueda originar un homocigoto. De modo que no es aconsejable excluir la posibilidad que se encuentren presentes en esta población heterocigotos Dd no detectados. Sin embargo, Acuña y Valenzuela (57) encuentran el mismo fenómeno en la población urbana de Santiago. Cabría suponer entonces que la diferencia se deba a que la población Aymará efectivamente tenía genes A y B antes de la invasión europea, los cuales mantuvieron a través del tiempo una baja frecuencia.

EVOLUCION DEL SISTEMA ABO

Los genes A y B tienen frecuencias considerables en las poblaciones mongoloides que dieron origen a las poblaciones amerindias. Según Cavalli-Sforza y Bodmer, (1), en estas poblaciones la frecuencia del gen A es de 0.19 y del gen B es de 0.17. ¿Qué explicación se puede dar a la disminución de frecuencia o desaparición de estos genes en Sudamerica?. Se ha postulado como factores posibles la selección natural y la deriva genética.

Si suponemos que el hombre llegó a Sudamerica hace 15.000-20.000 años aproximadamente (58), uno teóricamente podría calcular el número promedio de generaciones necesarias para cambiar la frecuencia de un gen, dados ciertos coeficientes de selección en contra de los diferentes genotipos y conociendo el tamaño poblacional efectivo. Desafortunadamente, como se desconocen estos parámetros fundamentales, en la práctica este cálculo no tiene mayor significación. Nos parece difícil postular que los genes A y B hayan disminuido apreciablemente su frecuencia por selección, ya que esto implicaría explicar por qué no ha ocurrido lo mismo en las poblaciones que actualmente presentan el polimorfismo. Sin embargo se han postulado múltiples asociacio-

nes entre grupo sanguíneo ABO y enfermedades tendientes a explicar la evolución de este sistema, entre estas cabe señalar la incompatibilidad materno-fetal ABO, algunas enfermedades crónicas como úlcera gástrica, úlcera duodenal, cáncer al estómago y algunas enfermedades infecciosas como la peste bubónica y la viruela. De estas asociaciones, las postuladas entre grupo ABO y enfermedades infecciosas tal vez hayan jugado algún rol en la distribución mundial de este grupo sanguíneo. En efecto Vogel et al. en 1960 (en 1) han sugerido que la actual distribución del grupo sanguíneo ABO en el mundo podría reflejar la historia pasada de las plagas. Es así como estos autores describen una asociación entre el grupo sanguíneo O y la peste bubónica. El agente responsable de la enfermedad, *Pasteurella pestis* posee un antígeno que tiene reacción cruzada con la sustancia H responsable de la especificidad de grupo sanguíneo O, de esta forma los individuos de este grupo sanguíneo tendrían una mayor susceptibilidad a la enfermedad, por consiguiente el grupo O sería más frecuente en áreas que no han tenido epidemias importantes de peste bubónica. Una sugerencia similar fue hecha por estos autores en relación a grupo A y viruela, por lo tanto el grupo A sería frecuente en áreas que no han tenido epidemias importantes de viruela. Cabe hacer notar que estudios posteriores de Azevedo et al. (59) no han

logrado confirmar estas asociaciones. En todo caso es posible que diferencias selectivas entre los grupos sanguíneos ABO asociadas con resistencia diferencial a enfermedades infecciosas hayan jugado un rol en la actual distribución del sistema ABO, aunque estas asociaciones no sean claramente detectables en el mundo actual.

Una explicación más satisfactoria parece ser que los grupos de cazadores y recolectores nómades que llegaron a América a través del Estrecho de Behring hayan sido portadores de bajas frecuencias de los genes A y B debido a efecto de fundador. Luego, al continuar migrando hacia el sur del Continente a través de Norteamérica y el Istmo de Panamá para luego ascender por el cauce de los ríos Cauca y Magdalena al altiplano colombiano, hayan perdido paulatinamente por deriva los genes A y B. Según Bennett y Bird (60), la foresta tropical fue una de las últimas zonas eco-geográficas en ser habitada por las dificultades de supervivencia que ofrecía y es precisamente en los aborígenes de esta zona que los genes A y B están ausentes. Uno de los argumentos más sólidos que habla en favor de la hipótesis del efecto de fundador es que los indígenas sudamericanos no solamente presentan menor variación genética en el locus ABO en comparación con las poblaciones mongoloides, sino también

para el sistema mayor de histocompatibilidad HL-A y para un conjunto de cerca de 22 enzimas eritrocitarias que han sido tipificadas hasta el momento (61,62).

Hemos mencionado que Allison (56), al igual que nosotros, encontró momias de grupo sanguíneo A en poblaciones prehistóricas del Valle de Azapa. Es así que en un sitio arqueológico datado en 1.200 D.C., este autor encontró una frecuencia del gen A de 0.067. Es difícil suponer que sí en el año 1.200 D.C. las poblaciones del Valle de Azapa aún tenían esta frecuencia del gen A, este desapareciera completamente antes de la llegada de los conquistadores españoles. Nos parece lícito concluir en consecuencia que al menos algunas poblaciones andinas presentaban el gen A (y quizá el gen B) en el momento del contacto con los invasores europeos. Esta conclusión tiene como consecuencia que será necesario revisar la mayoría de los estimadores de mezcla indígena obtenidos en poblaciones mixtas sudamericanas, especialmente en las andinas, basados en la frecuencia de los antígenos del sistema ABO. Sería tal vez importante a futuro utilizar las frecuencias génicas obtenidas en poblaciones prehistóricas para realizar este cálculo, lo que implica naturalmente ampliar los estudios de paleogenética de poblaciones.

C O N C L U S I O N E S

Antes de enumerar las conclusiones de esta tesis es conveniente recordar que los objetivos de esta fueron tipificar el grupo sanguíneo ABO de momias Precolombinas del Valle de Azapa, Chile, intentar evaluar el posible efecto de la contaminación bacteriana en la determinación de este grupo sanguíneo y finalmente tratar de explicar los resultados obtenidos en términos evolutivos.

Realizando un esfuerzo de síntesis, podemos concluir que tanto nuestros resultados, como los hallazgos de otros autores, nos llevaron a concluir que las poblaciones Precolombinas del Valle de Azapa eran con probabilidad bastante alta, polimórficas para el sistema ABO, presentando posiblemente el gen A, frecuencias cercanas a 0.01.

El estudio de la contaminación de los especímenes de músculo de momia, reveló la presencia de esporas posiblemente bacterianas en todas las muestras estudiadas. Como las esporas no poseen antígenos ABO, la especificidad de grupo sanguíneo A detectada no puede atribuirse a contaminación bacteriana. Sin embargo, si las esporas son de

origen bacteriano, es concebible que las bacterias hayan producido en su forma vegetativa enzimas que a su vez hayan degradado los antígenos ABO de las momias. Naturalmente este inconveniente podría haber llevado a una subestimación de especificidades A y/o B. Pensamos que tal vez la ausencia de especificidades A y B descrita por algunos autores pueda deberse en parte a esta causa.

Creemos que es razonable atribuir las bajas frecuencias de los genes A y B del sistema de grupo sanguíneo ABO descritas en general para las poblaciones aborígenes sudamericanas, a efecto de fundador, debido a que estas poblaciones presentan menor variación para la mayoría de los marcadores genéticos estudiados en comparación con las poblaciones mongoloides que supuestamente les dieron origen.

B I B L I O G R A F I A

- (1). Cavalli-Sforza, L. and Bodmer, W., (1971). The Genetics of human populations. W.H. Freeman and Company. San Francisco.
- (2). Rothhammer, F. and Spielman, R., (1972). Anthropometric variation in the Aymara: genetic, geographic and topographic contributions. Am. J. Hum. Genet. 24: 371 - 380.
- (3). Neel, J. and Salzano, F., (1966). Prospectus for genetic studies on the American Indians. The Biology of Human Adaptability. P.T. Baker and J. S. Weiner Eds. Oxford: Clarendon Press.
- (4). Neel, J., (1973). Diversity within and between South American Indian tribes. Israel Journal of Medical Sciences. 9: 1216 - 1224.
- (5). Neel, J., (1976). Applications of multiple variable analysis to questions of Amerindian relationships. Intercience. 1: 147 - 154.

- (6). Chakraborty, R., Blanco, R., Rothhammer, F. and Llop, E., (1976). Genetic variability in Chilean Indian populations and its association with geography, language and culture. *Social Biology*. 23: 73 - 81.
- (7). Cruz-Coke, R., (1977). A genetic description of high altitude populations. The biology of high altitude peoples. International Biological Programme 14 Cambridge University Press.
- (8). Kirk, R., Mc Derrnid, E., Blake, M., Gajdusek, D., Leyshon, W. and Mac Lennan, R., (1974). Blood group, serum protein and red cell enzyme groups of Amerindian populations in Colombia. *Am. J. Phys. Anthrop.* 41: 301 - 316.
- (9). Ferrelli, E., Bertin, T., Young, R., Barton, S., Murillo, F. and Schull, W., (1978). The Aymara of western Bolivia. IV Gene frequencies for eight blood groups and 19 protein and eritroci-te enzyme systems. *Am. J. Hum. Genet.* 30: 539-549.

- (10). Post, R., Neel, J. and Schull, W., (1968). Tabulation of phenotype and gene frequencies for 11 different genetic systems studied in American Indians. In: Biomedical Challenges presented by the American Indian. Washington, Pan American Health Organization. Publ. 165: 141 - 185.
- (11). Amos, B. and Kostyu, D., (1980). HLA - A central immunological agency of man. Advances in Hum. Genet. 10: 137 - 207.
- (12). Layrisse, Z., Layrisse, M., Dieter, H. and Welbert, J., (1976). The histocompatibility system in the Warao Indians of Venezuela. Science. 194: 1135 - 1138.
- (13). Gershowitz, H., Junqueira, P., Salzano, F. and Neel, J., (1967). Further studies on the Xavante Indians. III Blood groups and ABH-Le^a secretor types. In: the Simoes Lopes and Sao Marcos Xavantes. Am. J. Hum. Genet. 19: 502 - 513.

- (14). Garruto, R., Hoff, C., Baker, P. and Jacobi, H., (1975). Phenotypic variation in ABO and Rh blood groups, PTC tasting ability and lingual rotation among Southern Peruvian Quechua Indians. *Hum. Biol.* 47: 193 - 199.
- (15). Neel, J., Layrisse, M. and Salzano, F., (1977). Man in the tropics: The Yanomama Indians. Population structure and human variation. International Programme. Vol. II. Cambridge University Press.
- (16). Boyd, W., (1959). A possible example of the action of selection in human blood groups?. *J. Med. Educa.* 34: 398 - 399.
- (17). Etcheverry, R., Guzmán, C., Regonesi, C., Tonkin, V., Urra, R. y Durán, N., (1970). Grupos sanguíneos ABO en las momias precolombinas de los indígenas atacameños. *Rev. Med. Chile.* 98: 277 - 282.

- (18). Matson, A., (1936). Blood grouping of mummies. A procedure for the serological determination of blood relationship of ancient and modern peoples with special reference to the American Indians. *J. Immunol.* 30 (6): 459 - 470.
- (19). Gilbey, B. and Lubran, M., (1952). Blood groups of South American Indian mummies. *Man.* 52: 159 - 162.
- (20). Boyd, W. and Boyd, L., (1937). Blood grouping on 300 mummies, with notes on the precipiten test. *Immunol.* 32: 307 - 319.
- (21). Otten, C. and Flory, L., (1963). Blood typing of Chilean mummy tissue: A new approach. *Am. J. Phys. Anthrop.* 21: 283 - 285.
- (22). Suárez-Morales, O. and Linares, E., (1967). Grupos sanguíneos en momias del altiplano boliviano. *Academia Nacional de Ciencias de Bolivia.* 14: 7 - 19.

- (23). Lippold, L., (1971). The mixed cell agglutination method for typing mummified human tissue. *Am. J. Phys. Anthrop.* 34: 377 - 384.
- (24). Allison, M., Hossaini, A., Castro, N., Munizaga, J. and Pezzia, A., (1976). ABO Blood groups of Peruvian mummies I. An Evaluation of Techniques. *Am. J. Phys. Anthrop.* 44: 55 - 62.
- (25). Allison, M., Hossaini, A., Munizaga, J. and Fung, R., (1978). ABO Blood groups in Chilean and Peruvian mummies. *Am. J. Phys. Anthrop.* 49: 139 - 142.
- (26). Race, R. and Sanger, R., (1968). *Blood groups in Man.* Blackwell Scientific Publications. Oxford and Edinburgh.
- (27). Stastny, P., (1974). HL-A antigens in mummified Pre-Columbian tissues. *Science.* 183: 864 - 866.
- (28). Hossaini, A. and Allison, M., (1976). Paleoserologic studies: ABO and histocompatibility antigens in mummified American Indians. *MCV Quarterly.* 12: 67 - 73.

- (29). Boyd, W. and Boyd, L., (1933). Blood grouping by means of preserved muscle. *Science*. 78: 578.
- (30). Springer, G., Williamson, P. and Brandes, W., (1961). Blood group activity of Gram negative bacteria. *J. Exp. Med.* 113: 1077 - 1093.
- (31). Hart, G., Kvas, Y., Soots, M. and Badaway, B., (1979). Blood group testing of ancient material. Presented at Royal Society of Medicine - Academy of Medicine, Toronto. Meeting - Disease in ancient man. London, England.
- (32). Lengyel, Y., (1975). Paleoserology. Blood typing with the fluorescent antibody method. *Akademiai Kiadó. Budapest.*
- (33). Iseki, S., (1962). Blood group specific decomposing enzymes from bacteria. *Proc. 8th. Congr. Int. Soc. Blood Transf. Tokio.* 215 - 218.
- (34). Uhle, M., (1919). La arqueología de Arica y Tacna. *Boletín de la Sociedad Ecuatoriana de Estudios Históricos Americanos.* Quito.

- (35). Focacci, G., (1974). Excavaciones en el cementerio Playa Miller 7, Arica. Chungará. 3: 23 - 74.
- (36). Focacci, G. y Erices, S., (1973). Excavaciones en tumulos de San Miguel de Azapa. Actas del IV Congreso de Arqueología Chilena. Num. Especial. Universidad de Chile. 47 - 55.
- (37). Focacci, G., (1981). Nuevos fechados para la época de Tiahuanaco en la arqueología del Norte de Chile. Chungará. 8: 63 - 77.
- (38). Ulloa, L., (1981). Evolución de la industria textil prehispánica en la zona de Arica. Chungará. 8: 97 - 108.
- (39). Quevedo, S., (1983). Excavación del sitio AZ-3. Datos no publicados.
- (40). Erices, S., (1974). Estudio de tres sitios arqueológicos: Playa Miller 7, Azapa 6 y Playa Miller 4. Arica. Memoria para optar al título de Antropólogo. Universidad de Concepción.

- (41). Focacci, G., (1980). Síntesis de la arqueología del extremo Norte de Chile. Chungará. 6: 3 - 23.
- (42). Rothhammer, F., Cocilovo, J., Quevedo, S. and Llop, E., (1982). Microevolution in prehistoric Andean populations: I Chronologic craniometric variation. Am. J. Phys. Anthrop. 58: 391 - 396.
- (43). Boyd, C. and Shapleigh, E., (1954). Diagnosis of subgroups of blood groups A and AB by use of plant agglutinins (Zeclins). J. Lab. Clin. Med. 44 (2): 235 - 237.
- (44). Armanet, L., Correa, N., Islas, E. y Lyng, C., (1982). Manual de inmunohematología y banco de sangre. Universidad de Chile, Facultad de Medicina, Escuela de Tecnología Médica, Santiago Norte.
- (45). López, M., Leyton, C. y Graf, M., (1982). Técnicas de Histología y Citología. Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.
- (46). Lillie, R., (1954). Histopathologic technic and practical histochemistry. Mc Graw-Hill Book Co.

- (47). Ashby, G., (1938). Simplified Schaeffer spore stain. Science. 87: 443 - 445.
- (48). Luft, J., (1961). Improvements in epoxy resin embedding methods. J. Biophys. Biochem. Cytol. 9: 409.
- (49). Reynolds, E., (1963). The use of lead citrate at high pH as electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell. Biol. 17: 208.
- (50). Gould, G. and Hurst, A., (1961). The bacterial spore. Academic Press. London and New York.
- (51). Dowell, V. y Hawkins, T., (1975). Métodos de laboratorio en bacteriología anaeróbica. Centro Regional de Ayuda Técnica. Agencia para el Desarrollo Internacional. México, Buenos Aires.
- (52). Siegel, S., (1956). Non parametric statistics for the behavioral Science. Mc Graw-Hill Book Company. New York.

- (53). Pardini, E., (1968). Determinazione del contenuto in N-acetilglucosio e galattosamine in ossa umane antiche e recente. Atti. Soc. Tosc. Sci. Nat. Mem. Serie B. 75: 1.
- (54). Kellermann, G., (1971). Methodological investigations on the ABO typing of ancient bones. Humangenetik. 14: 50 - 55.
- (55). Micle, S., Kobilyansky, M., Nathan, M., Arensburg, B. and Nathan, H., (1977). ABO typing of ancient skeletons from Israel. Am. J. Phys. Anthrop. 47: 89 - 92.
- (56). Allison, M., (1982). Datos no publicados.
- (57). Acuña, M. y Valenzuela, C.Y., (1982). Marcadores genéticos y estimación de mezcla en una población de Santiago. Arch. Biol. Med. Exp. 15: 169. (Resumen).
- (58). Cruxent, J., (1968). Theses for the meditation on the origin and dispersion of man in South America. In: Biomedical Challenges. Presented by the American Indian. Washington, Pan American Health Organization. Publ. 165: 141 - 185.

- (59). Azevedo, E., (1964). Smallpox and the ABO blood groups in Brazil. *Am. J. Hum. Genet.* 16 (4): 451 - 454.
- (60). Bennett, W. and Bird, J., (1964). Andean culture history. The Natural History Press. Garden City, New York.
- (61). Neel, J., (1978). Rare variants, private polymorphisms and locus heterozygosity in Amerindian Populations. *Am. J. Hum. Genet.* 30: 465 - 490.
- (62). Black, F., Berman, L. and Gabbay, Y., (1980). HL-A antigens in South American Indians. *Tissue Antigens.* 16: 368 - 376.