

## Utilización del ADN antiguo en estudios bioarqueológicos

Isabel Rey Fraile<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Colección de Tejidos y ADN. Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC), José Gutiérrez Abascal, 2. 28006, Madrid, España. E-mail: mcnr3g@mncn.csic.es

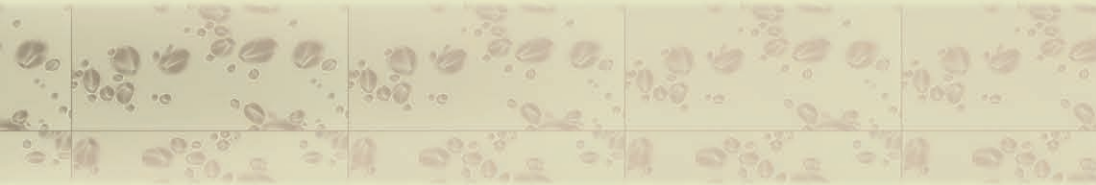
Fuente: Revista NATURE|Vol 442|20 July 2006

Existen diferentes definiciones para lo que se denomina “ADN antiguo” (aDNA, abreviado del inglés, “ancient DNA”) hay quien entiende como tal: “ácido desoxirribonucleico que ha sido copiado y secuenciado a partir de especímenes de poblaciones o especies extintas”. En la web encontramos otra definición ([http://en.wikipedia.org/wiki/Ancient\\_DNA](http://en.wikipedia.org/wiki/Ancient_DNA)): “es ADN recuperado de muestras biológicas que no han sido específicamente conservadas para posteriores análisis de ADN. Los ejemplos incluyen el análisis de ADN recuperado de material esquelético arqueológico o histórico, tejidos momificados, especímenes de colección no congelados, especímenes médicos, muestras de herbarios y restos congelados en hielo y ‘permafrost’”.

De común acuerdo, todas las revisiones sobre el tema establecen que el primer artículo con amplia difusión sobre ADN antiguo fue publicado en *Nature* por Higuchi y colaboradores en noviembre

de 1984. La especie con que se trabajó fue la *quagga*, un équido sudafricano extinto a finales del siglo XIX (Higuchi et al, 1984), y el ADN se obtuvo de una muestra de músculo seco de un espécimen del Museo de Historia Natural de Mainz (Alemania). Este nuevo uso de la biología molecular mostró rápidamente su utilidad en el campo de la arqueología, y al año siguiente Svante Pääbo publicó sendos artículos sobre momias egipcias (Pääbo 1985a, 1985b), todo un reto en un momento en que la amplificación de secuencias de ADN sólo era posible por clonación, puesto que el descubrimiento de la técnica conocida como reacción en cadena de la polimerasa (“Polymerase Chain Reaction”, abreviada como PCR) no tubo lugar hasta 1987 (Mullis y Faloona 1987; Saiki et al, 1988).

El uso de ADN en estudios de bioarqueología se vio impulsado gracias a la utilización de la PCR, que aún necesitó unos años para ser considerada rentable y de uso popular. En la actualidad dicha



técnica ha evolucionado, tanto a nivel de instrumentación como de reactivos, hacia una eficacia impensable hace 20 años.

Pero, a pesar de ello, no son muchos los trabajos de investigación de este tipo publicados, debido a las dificultades ocasionadas por la conservación, siempre casual, del ADN contenido en las muestras utilizadas: huesos, semillas u otros restos orgánicos, tanto vegetales como animales, arqueológicos o históricos, ejemplares de museo, biopsias y fósiles. Las principales dificultades a las que nos enfrentamos al trabajar con este tipo de ADN son: la fragmentación de las moléculas de los ácidos nucleicos, por su exposición a agentes físicos y químicos (humedad, temperatura, radiaciones luminosas, entre otras), y la

contaminación producida por ADN exógeno o por sustancias inhibitoras de la PCR.

Por otro lado, durante estos años se han encontrado multitud de marcadores moleculares en los

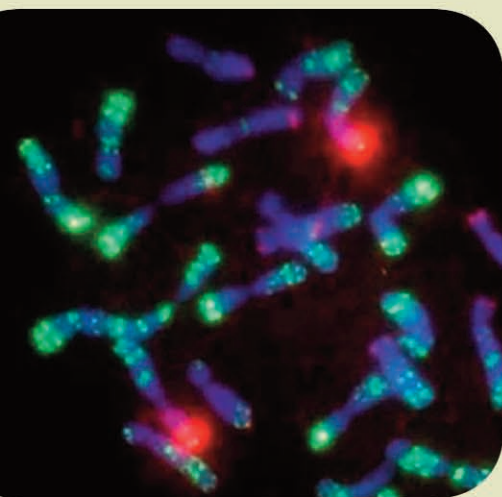
distintos genomas celulares, mitocondrial, nuclear o cloroplástico, que se han ido incorporando en multitud de disciplinas científicas y que proporcionan diferentes respuestas por su grado variable de velocidad evolutiva. Los primeros marcadores moleculares utilizados se localizaban siempre sobre el genoma mitocondrial (cytb, d-loop, 16S), pero poco a poco se fueron incorporando nuevos marcadores, como minisatélites y microsatélites (STR), localizados casi exclusivamente sobre el genoma nuclear. Todos ellos han resultado útiles no sólo para estudios filogenéticos o de identificación taxonómica, sino también para resolver cuestiones relacionadas con la conservación de la diversidad genómica, realizar estudios de genética de poblaciones, determinación de paternidades, poblaciones y sexo, estima de rutas de migración,

composición de las dietas e incidencia y origen de enfermedades, entre otras.

Poco a poco todos estos marcadores citados se han ido incorporando a los estudios de aDNA. Los marcadores de ADN mitocondrial, como tRNA-Glu y citocromo b (Austin y Arnold, 2001), obtenidos de un espécimen de colección de 200 años de antigüedad, han permitido identificar las distintas especies de tortugas gigantes de las islas del Norte de Madagascar (se extinguieron en el siglo XVIII, entre 1725 y 1795) y desvelar su historia de especiación. Otro marcador del genoma mitocondrial, como el D-loop o región control, ha posibilitado establecer las relaciones de parentesco filogenético entre *Bos primigenius* y *Bos taurus*, en base a muestras datadas entre 500 y 10000 años.

Marcadores localizados sobre el genoma cloroplástico, como por ejemplo fragmentos localizados entre los genes Trn (Petit et al, 2002, Deguilloux et al, 2003), han sido utilizados en muestras de madera de roble procedentes de yacimientos arqueológicos y datadas desde el neolítico hasta el siglo XVII, para explicar la estructura génica de esta especie con tanta importancia en la actividad humana a lo largo de un gran periodo de tiempo. Este tipo de estudio representa un significativo interés, en primer lugar para la genética de la conservación y en segundo lugar porque constituye un mecanismo eficaz para la identificación de maderas a nivel de especie, que suele ser complicada cuando utilizamos sólo caracteres morfológicos.

Los microsatélites son marcadores moleculares idóneos debido a dos de sus características principales: su elevada tasa de polimorfismo y la posibilidad de poder trabajar con reducidas cantidades de ADN, por lo que resultan muy interesantes en estudios con aDNA, son muy útiles para medir el flujo génico entre poblaciones o detectar hibridación, cuellos de botella, determinar paternidades o asignar individuos a una población de origen (González, 2003). Un ejemplo de este uso lo podemos encontrar en Edwards et al, (2003), quienes han utilizado muestras óseas de ganado bovino de la época de los vikingos para



comparar con las razas actuales; las conclusiones son interesantes, puesto que se obtuvieron resultados en 11 muestras arqueológicas para 2 o 3 microsatélites. También se ha ensayado la amplificación de microsatélites procedentes de huevos de resistencia de invertebrados (Limburg et al, 2002), concretamente de crustáceos del género *Daphnia*, extraídos de sedimentos lacustres con dataciones que oscilan desde 159-195 años, los más modernos, hasta 4400 años de antigüedad y en los cuales la conservación de las cubiertas protectoras fue decisiva a la hora de conseguir amplificaciones positivas.

El genoma localizado en los cloroplastos de las plantas también presenta microsatélites. Parducci et al, (2005), por ejemplo, analizaron con ellos polen de pino, extraído de sedimentos de lagos conservados en condiciones anaeróbicas y datados desde 100 a 10000 años. En dicho trabajo se obtuvieron amplificaciones positivas con diferente porcentaje de éxito para distintos periodos de tiempo.

Para determinar el sexo de aves y mamíferos se usan genes localizados sobre los cromosomas sexuales. En mamíferos el más habitual se denomina gen de la amelogenina y ha sido utilizado en numerosos estudios: Faerman et al, (1997) y Mays y Faerman (2001), por ejemplo, han intentado comprobar la proporción de machos y hembras en enterramientos arqueológicos, para esclarecer la posible existencia de infanticidios.

Por último, son numerosos los fragmentos de ADN que se han localizado y que están siendo utilizados para identificar patógenos que afectan a los seres humanos. Estos mismos marcadores han podido también ser amplificados en tejido seco y hueso de momias pertenecientes a diferentes épocas. Por ejemplo, con la extracción y amplificación de ADN de *Trypanosoma cruzi*, procedente de muestras de hasta 4000 años de antigüedad (Guhl et al, 1999), se ha podido demostrar que las epidemias de Chagas ya afectaban a los antiguos pobladores peruanos.

Por lo tanto, el gran número de marcadores moleculares descubiertos y la mejora de las

técnicas del trabajo con ADN, extracción, purificación y amplificación, asumiendo todas sus limitaciones y riesgos (Cooper y Poinar, 2000), ha permitido trabajar con cantidades de ADN pequeñas y fragmentadas, características intrínsecas del aDNA, tal como se puede apreciar en la figura 1. Además, dicha figura permite observar cómo se han ido agregando publicaciones a lo largo de las últimas dos décadas, y destaca además que es en la actualidad cuando se está alcanzando un número más elevado; podemos asumir por lo tanto que su uso se ha popularizando y consolidado como técnica de estudio. Esta característica, unida al aumento del número de bases nucleotídicas secuenciadas (Green et al, 2006), así como el incremento de rigor y veracidad, mejoran la calidad de los resultados y abren el camino al estudio de la arqueogenómica.

Se hace patente que la información que facilita el ADN antiguo interesa a cientos de investigadores. Muchos de ellos, por ejemplo, han participado en 8 Conferencias Internacionales sobre el tema (la última celebrada en octubre del 2006 en Lodz, Polonia: <http://csk.umed.lodz.pl/~dmb/DNA8/doc/?plik=about>) y han publicado numerosas revisiones sobre aDNA desde finales de los 80 (Pääbo, 1987). Interesa destacar la revisión realizada por Brown y Brown (1994), donde se puede encontrar una amplia disertación sobre los usos de este ADN en arqueología, además de presentar una interesante tabla que refleja los tipos de muestras orgánicas utilizadas para obtener ADN y su máxima datación; o la efectuada por Cipollaro et al, (2005), útil para obtener una idea general de las numerosas disciplinas en que puede ser utilizado. Son decenas las paginas web dedicadas exclusivamente a aDNA, pero desde el punto de vista de las revisiones bibliográficas, son muy interesantes dos portales: el primero, localizado en el Banco de Datos de ADN de Japón (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/aDNA/index.html>), almacena una base de datos sobre el tema, lamentablemente actualizada sólo hasta el año 2004; y el segundo es una página personal de Jan Kiesslich, quien junto con Odile Loreille presenta una revisión de hasta 1425 referencias, tanto de aDNA como de técnicas y teorías básicas de

biología molecular (<http://www.comic.sbg.ac.at/staff/jan/ancient/titel.htm>), aunque de igual forma sólo actualizado hasta 1999. Para concluir y que el lector interesado pueda hacerse una idea más completa, en el apéndice se incluye, a modo de ejemplo, una muestra seleccionada de artículos publicados que utilizan aDNA en diferentes disciplinas (bioarqueología, antropología física, zoología) y que han producido resultados que, por su temática o por su localización temporal, pueden ser un referente en

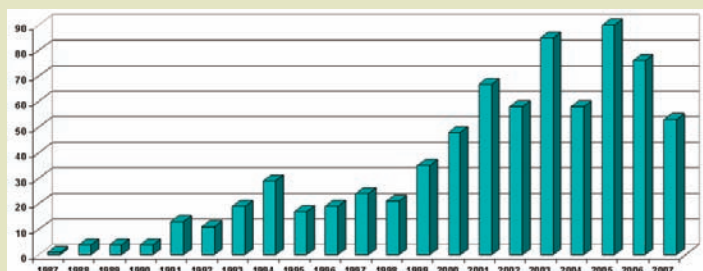


Figura 1: En la gráfica se han representado un total de 736 artículos publicados sobre aDNA por años. En ellos se incluye cualquier tipo de trabajo con aDNA, conteniendo técnicas, métodos, revisiones, notas o replicas. Esta información forma parte de una base de datos obtenida, entre otras de las siguientes fuentes: "Ancient Genome Encyclopedia DNA Data Bank of Japón" (DDBJ) <<http://www.ddbj.nig.ac.jp/aDNA/index.html>>; "Zoological Record" y "PubMed" <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>>.

nuevos estudios bioarqueológicos; en la misma no se han incluido trabajos sobre técnicas o métodos como tampoco estudios exclusivamente paleontológicos.

### Referencias Bibliográficas:

- Austin JJ, Arnold EN (2001): Ancient mitochondrial DNA and morphology elucidate an extinct island radiation of Indian Ocean giant tortoises (*Cylindraspis*). *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences Series B* 268(1485): 2515-2523.
- Brown TA, Brown KA (1994): Ancient DNA: using molecular biology to explore the past. *Bioessays* 16(10): 719-726
- Cipollaro M, Galderisi U, Di Bernardo G (2005) Ancient DNA as a Multidisciplinary Experience. *Journal of Cellular Physiology* 202: 315-322.
- Cooper A, Poinar HN (2000): Ancient DNA: Do It Right or Not at All. *Science* 289 (5482), 1139b. Faerman M, Kahila G, Smith P, Greenblatt C, Stager L, Filon D, Oppenheim A. 1997. DNA analysis reveals the sex of infanticide victims. *Nature* 385(6613): 212-213.
- Deguillou MF, Pemonge MH, Bertel L, Kremer A, Petit RJ (2003): Checking the geographic origin of oak wood: molecular and statistical tools. *Molecular Ecology* 12: 1629-1636.

- Edwards CJ, Connellan J, Wallace PF, Park SDE, McCormick FM, Olsaker I, Eythórsdóttir E, MacHugh DE, Bailey JF, Bradley DG (2003): Feasibility and utility of microsatellite markers in archaeological cattle remains from a Viking Age settlement in Dublin. *Animal Genetics* 34(6): 410-416.
- Faerman M, Kahila G, Smith P, Greenblatt C, Stager L, Filon D, Oppenheim A (1997): DNA analysis reveals the sex of infanticide victims. *Nature* 385(6613): 212-213.
- González EG (2003): Microsatélites: sus aplicaciones en la Conservación de la biodiversidad. *Graellsia* 59(2-3): 377-388.
- Green RE, Krause J, Ptak SE, Briggs AW, Ronan MT, Simons JF, Du L, Egholm M, Rothberg JM, Paunovic M, Pääbo S (2006): Analysis of one million base pairs of Neanderthal DNA. *Nature* 444: 330-336.
- Guhl F, Jaramillo C, Vallejo GA, Yockteng R, Cardenas-Arroyo F, Fornaciari G, Arriaza B, Aufderheide AC (1999): Isolation of *Trypanosoma cruzi* DNA in 4,000-Year-Old Mummified Human Tissue From Northern Chile. *American Journal of Physical Anthropology* 108: 401-407.
- Higuchi R, Bowman B, Freiberger M, Ryder OA, Wilson, AC (1984): DNA sequence from the quagga, an extinct member of horse family. *Nature* 312: 282-284.
- Limburg PA, Weider LJ. 2002 'Ancient' DNA in the resting egg bank of a microcrustacean can serve as a palaeolimnological database. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences Series B* 269(1488): 281-287.
- Mays S, Faerman M (2001): Sex Identification in Some Putative Infanticide Victims from Roman Britain Using Ancient DNA. *Journal of Archaeological Science* 32: 703-713.
- Mullis KB, Faloona FA (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155: 335-350.
- Pääbo S (1985a): Molecular cloning of Ancient Egyptian mummy DNA. *Nature* 314: 644-645.
- Pääbo S (1985b): Preservation of DNA in ancient Egyptian mummies. *Journal of Archaeological Science* 12: 411-417.
- Pääbo S (1987): Molecular genetic methods in archaeology - a prospect. *Anthropologischer Anzeiger* 45: 9-17.
- Parducci L, Suyama Y, Lascoux M, Bennett KD (2005): Ancient DNA from pollen: a genetic record of population history in Scots pine. *Molecular Ecology* 14: 2873-2882.
- Petit RJ, Brewer S, Bordács S, Burg K, Cheddadi R, Coart E, Cottrell J, Csaikl UM, van Dam B, Deans JD, Espinel S, Fineschi S, Finkeldey R, Glaz I, Goicoechea PG, Jensen JS, König AO, Lowe AJ, Madsen SF, Mátyás G, Munro RC, Popescu F, Slade D, Tabbener H, de Vries SGM, Ziegenhagen B, de Beaulieu J-L, Kremer A (2002): Identification of refugia and postglacial colonisation routes of European white oaks based on chloroplast DNA and fossil pollen evidence. *Forest Ecology and Management* 156: 49-74.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239(4839): 487-491.