

Nota sobre el estudio de ADN antiguo en restos óseos de macromamíferos cuaternarios de Galicia

Note about ancient DNA studies in fossil bones from Galicia quaternary large mammals

VILA TABOADA, M.

ABSTRACT

New biomolecular methods allow us to reach the ancient DNA preserved in fossil bones. This paper shows first extractions of this genetic material in cave bear bones (*Ursus spelaeus*) from Galicia (NW Iberian Peninsula). The sequence of mtDNA that we have got is similar to published data from French fossils (HÄNNI, 1994), although future studies will let us determinate how different the populations of this extint species are.

Key words: ancient DNA, Quaternary, *Ursus spelaeus*, ursids, Galicia.

VILA TABOADA, M. (Instituto Universitario de Xeoloxía. Universidade da Coruña. 15071. A Coruña).

INTRODUCCION

La extracción de biomoléculas en materiales fósiles y subfósiles ha mejorado considerablemente su metodología a lo largo de la década de los 90, siendo la extracción de ADN (ácido desoxirribonucleico) a partir de huesos, dientes, tejidos congelados, momificados etc. un campo que proporciona información básica tanto a nivel forense como poblacional y específico.

Este trabajo presenta los primeros resultados de extracción de material genético (ADN antiguo, ADN_a) a partir de restos óseos de *Ursus spelaeus* ROSEN-MÜLLER-HEINROTH 1794 (Mammalia, Carnivora, Ursidae) (GRANDAL, 1993) recuperados con tal objetivo en el yacimiento de Liñares Sur (Lugo, Galicia) (LOPEZ-GONZALEZ, 1996). Asimismo se empleó como control del estado de conservación del material recuperado en este yacimiento un hueso de *Cervus elaphus* L. procedente de la misma excavación.

Conjugando las técnicas paleontológicas con las empleadas por la biología molecular pretendemos sacar un mayor partido de la información proporcionada por los restos fósiles. En el caso del material genético de los mismos, es preciso un mínimo conocimiento del comportamiento *post mortem* del ADN, así señalaremos que el extraído a partir de restos antiguos es fundamentalmente de origen mitocondrial (HILLIS, 1998) debido a la protección que estos orgánulos proporcionan a la molécula dentro de la propia célula y a que cada mitocondria posee un número variable de copias idénticas de la misma molécula. Una característica del mtADN —que lo hace especialmente interesante para estu-

dios evolutivos— es su «mayor tasa de mutación», esto se explica por la menor eficiencia de la maquinaria de reparación del ADN en la mitocondria. Así, si una mutación no es detectada, tiene mayor probabilidad de fijarse.

Presentamos pues la recuperación de parte de la secuencia de la región control (D-loop) del genoma mitocondrial de *Ursus spelaeus* (HÄNNI, 1994).

El D-loop, o bucle de desplazamiento, es una región del genoma mitocondrial de mamíferos que contiene las regiones de control para la replicación y transcripción de dicho mtADN. Se le llama bucle de desplazamiento porque durante la replicación, las dos cadenas de esta región son desplazadas una respecto a la otra por una tercera cadena naciente. En esta región control existe normalmente un conjunto de secuencias conservadas que son las supuestamente importantes para regir los citados procesos. Dispersas entre esta zona del genoma están las secciones no codificantes que son las que parecen variar libremente. Estas regiones contienen lugares polimórficos y son, por ello, el objetivo de los estudios de variabilidad intra e interespecíficos. (HILLIS; 1998). Otra zona del genoma mitocondrial intensamente estudiada desde el punto de vista evolutivo ha sido el Citocromo b (IRWIN et al., 1991).

Debido a que el material genético conservado en restos fósiles suele estar fraccionado y en bajas concentraciones, el desarrollo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha supuesto un increíble avance en Biología Molecular permitiendo la posibilidad de analizar el ADN_a. (PÄÄBO, 1989b). La PCR (HILLIS; 1998) ha hecho posible analizar esos

pequeños fragmentos de ADN (100-400 pb), que se conservan en materiales fósiles y subfósiles. Dicho ADN muestra daños por procesos de oxidación (PÄÄBO, 1989a) estimándose una productividad de 1-200 µg de ADN por gramo de material de partida (hueso, diente...). Además, se constató que las muestras extraídas a partir de tejidos blandos tendían a ser menores que aquellas recuperadas a partir de hueso o diente (HILLIS, 1998).

Uno de los mayores problemas en los estudios de ADN es, junto con la conservación del material, la contaminación con otras moléculas de ADN, tanto antiguo como moderno (otros especímenes o taxones del yacimiento, microorganismos, el propio investigador...). Este problema puede ocurrir en cualquier fase del proceso, por ello se realizan controles rutinarios y se sigue un protocolo estricto referente a condiciones de trabajo. (YANG, 1998).

La extracción se ha de realizar en recintos separados a los de la amplificación y secuenciación, además de poseer instrumental propio para evitar cualquier tipo de contaminación con los siguientes procesos. Debido a que la temperatura alcanzada por la esterilización en autoclave no destruye totalmente el ADN, el material ha de ser tratado con hipoclorito sódico. Se emplea material desechable (guantes, mascarillas...) así como puntas de pipeta con filtro para evitar contaminación por aerosol dentro de la misma micropipeta.

MATERIAL Y METODOS

Una de las novedades de este estudio consiste en la minuciosidad de la recupe-

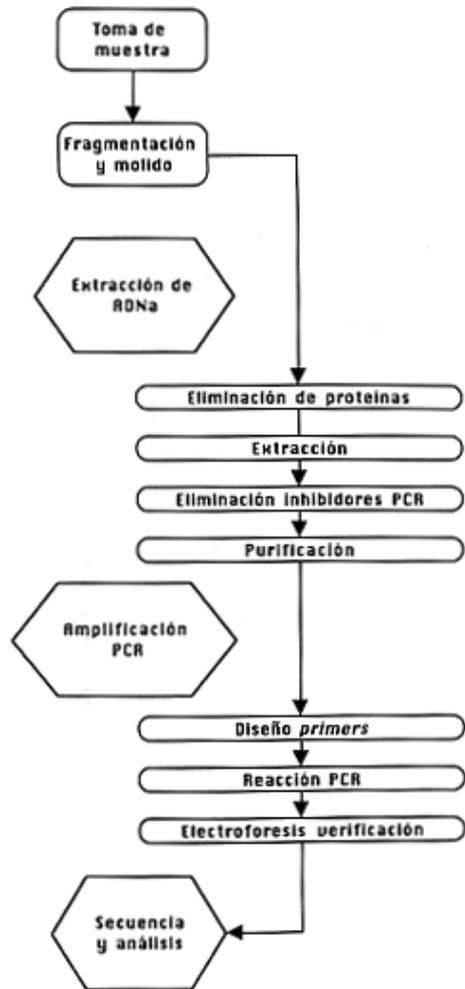


Fig. 1. Serie de procesos seguidos para la recuperación de material genético a partir de restos fósiles.

ración del material a analizar, así, la excavación se ha llevado a cabo del modo más aséptico posible con el fin de evitar los consabidos problemas de contaminaciones por manipulación indebida. Por ello, el grupo empleó guantes desechables y mas-

carillas protectoras que impidieran en todo momento el contacto de piel, mucosas... con el hueso. Asimismo, a cada resto, inventariado *in situ*, fue introducido en bolsas herméticas con gel de sílice para evitar que la humedad pudiera facilitar el crecimiento de microorganismos y el daño por hidrólisis.

De los doce huesos recuperados específicamente para la extracción de su ADN han sido analizados tres de ellos, resultados de los cuales presentamos en este trabajo. Asimismo se ha realizado la datación, por ^{14}C AMS, de uno de los huesos analizados.

TABLA 1. Restos empleados en el análisis de ADN en este trabajo.

Especie	Hueso	Referencia	Edad
<i>Ursus spelaeus</i>	Metápodo	L-1011	> 38.000 años BP
<i>Ursus spelaeus</i>	Vértebra	L-1006	
<i>Cervus elaphus</i>	Metatarso	L-1008	

El análisis del metatarso de *Cervus elaphus* responde —en principio— a la necesidad de un control del yacimiento, con el fin de verificar el estado de conservación del ADN distintas muestras y detectar contaminaciones cruzadas interespecíficas en yacimientos con varios taxones. (YANG, 1998; HAGELBERG, 1994).

Otra de las premisas de este tipo de estudios es la reproducibilidad de los mismos, y la verificación del análisis del mismo resto por dos laboratorios distintos. En nuestro caso, esto ha sido posible al duplicar la Dra. Hänni el análisis del Metápodo L-1011 realizado en el

laboratorio del Dr. Taberlet. Así pues, la extracción del material genético de la misma muestra (L-1011) fue realizada, en cada laboratorio, por un método distinto.

Como ya se apuntó en la introducción, la fragmentación inicial del hueso se realiza del modo más aséptico posible, empleándose para el molido del granulado resultante morteros manuales conteniendo N_2 líquido. El polvo obtenido (1-2 g) será el material de partida. La muestra que no se analice queda almacenada a -20°C . Como hemos comentado se han seguido dos métodos de extracción independientes:

1. Extracción con preparados comerciales QIAMP Tissue (QIAGEN) —ya proporciona tubos, columnas y reactivos.
2. Extracción clásica con fenol-cloroformo, modificada de Hagelberg. (HAGELBERG, E., 1994) empleando Fenol-Cloroformo-Isoamil-Alcohol (GIBCO BRL Life Tech.).

El primer paso de la extracción (comercial o no) consiste en una incubación de la muestra en una solución tampón que desnaturalice las proteínas y decalcifique el hueso. Para su preparación se requiere EDTA pH 8.00, Proteínasa K y Sarcosil. Dicha incubación requiere agitación vertical a fin de evitar la decantación del hueso.

Tras la extracción del ADN, se procede a la purificación de dicho material. En el primer caso se realizó también con un *kit* comercial (*Kit* purificación pre-PCR, QIAGEN). Paralelamente, la otra purifi-

cación se llevó a cabo con microcolumnas Centricon-30 (Amicon) con el fin de retirar las sales de la fase acuosa y concentrar la muestra por centrifugación. Esto precisa sucesivos lavados, así como la precaución previa de tomar la fase acuosa sin contaminarla con el fenol, inhibidor de la PCR.

El siguiente paso es amplificar el ADN —extraído y purificado— mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), técnica biomolecular para la que se emplean preparados comerciales (en nuestro caso Perkin Elmer) conteniendo:

—Taq GOLD polimerasa (enzima con mejores resultados para ADN).

—MgCl₂.

—dNTPs (desoxinucleótidos).

—Solución tampón.

—Agua.

—Primers L-15995, H-16299, L-16164. Ver Tabla 2.

—Seroalbúmina bovina. BSA. (Desactivadora de los inhibidores de la PCR).

Las condiciones de amplificación se fijan en función de la marcha del proceso. Así, aunque las condiciones de PCR típicas para el ADN mitocondrial son 35 ciclos de amplificación con desnaturalización a 94°C (1 min.), anillamiento a 55°C (1 min.) y extensión a 72 °C (1 min), estas temperaturas y tiempos se

ajustan en función de los parámetros que interesan optimizar (HAGELBERG; 1994). De este modo, al emplear Taq Gold —enzima que ha proporcionado mejores resultados en ADN— se debe programar en el termociclador una desnaturalización previa al proceso con la cual (debido a la alta temperatura) la enzima arranca correctamente. Asimismo es fundamental realizar un control negativo de la PCR con el fin de detectar contaminaciones.

La verificación del proceso de amplificación se lleva a cabo mediante una electroforesis en gel de agarosa (2 %), visualizándose las bandas —tinción con Bromuro de Etidio— en un transiluminador con luz UV. Los fragmentos de interés se determinan por su tamaño (comparación con un marcador «*ladder*» comercial). Ver Fig. 2.

Tras determinar cuáles son las bandas adecuadas se procede a la secuenciación de la muestra correspondiente siguiendo para ello los protocolos de secuenciación directa —sin clonaje previo— empleados para el secuenciador automático de Applied Biosystems (ABI). El programa empleado para alinear la secuencia fue el Sequence Navigator (ABI).

TABLA 2. Secuencia de los primers empleados para la amplificación de la región control (D-loop) de *Ursus spelaeus*.

Primer	Secuencia	Tamaño (pb)	Referencia
H-16299	5'-GGAGCGAGAAGAGGTACACGT-3'←	21	Taberlet et al. 1994
L-15995	5'-CTCCACTATCAGCACCCAAAG-3'⇒	21	
L-16164	5'-GCCCATGCATATAAGCATG-3'⇒	20	Taberlet et al. 1994.

FABLA.3. Secuencias alineadas del D-loop mitocondrial de distintos úrsidos, fósiles y actuales. (1) Metatarso de *Ursus spelaeus*. Hänni *et al.*, 1994. (2) Metápodo L-1011 de *Ursus spelaeus* procedente del yacimiento de Liñares Sur (Lugo, Galicia).

(3) Secuencia *Ursus arctus* subfósil TAB7 (Hänni *et al.*, 1994) (4) *Ursus arctos* actual (Cordillera Cantábrica) Taberlet & Bouvet, 1994.

Nota: Sólo se muestra completa la secuencia 1, las restantes sólo señalan las diferencias con la primera.

	10	20	30	40
1	TAAGCATGTA	CATATTATGC	TTGGTCTTAC	ATGAGGACCT
2				
3		G	T	T
4		G		T
	50	60	70	80
1	ACATTTTCGAA	AGTTTATTTTC	AAGTGTATAG	TCTGTAAGCA
2	XX X			
3	G			
4		C		
	90	100	110	120
1	TGTATTTAC	TTAGTCCGGG	AGCTTAATCA	CCAGGCCTCG
2		X		
3				
4				
	130	140		
1	AGAAACCAGC	AACCCTTGC		
2				
3				
4				

RESULTADOS

Algo que corrobora el excelente estado de conservación de los restos hallados en este yacimiento es —simplemente— el hecho de que, aún empleando huesos tradicionalmente «difíciles» para la extracción de ADN, como son las vértebras o costillas, constatamos que una apófisis de la vértebra L-1006 presenta

bandas en el gel de electroforesis tan claras como el metápodo L-1011. Asimismo, la literatura al respecto habla de zonas preferentes para el análisis del ADN antiguo. Así, en los huesos largos se suele preferir la diáfisis, por la concentración de tejido óseo compacto —se supone que la densa red de trabéculas actúa como protectora del material mitocondrial—. A pesar de todo, del L-

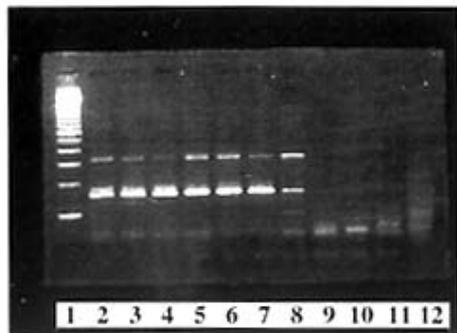


Fig. 2. Fotografía de un gel de electroforesis. (1) *Ladder* comercial. Cada banda marca fragmentos de 100 pb. (2-4) Bandas correspondientes a la amplificación del mtDNA de la vértebra L-1006. (5-7) Bandas de amplificación correspondientes al metápodo L-1011. (8) Control del yacimiento, metatarso de *Cervus elaphus* (9) Blanco de PCR. La ausencia de bandas supone una amplificación correcta sin contaminación. (10-12) Controles de PCR. La ausencia de bandas corroboran la no contaminación por reactivos (10), condiciones del recinto (11) y micropipetas (12).

1011 se han analizado fragmentos correspondientes a la epífisis obteniéndose resultados positivos.

Presentamos en la Tabla 3 la secuencia obtenida alineada con la de otros úrsidos actuales y fósiles (HÄNNI;

1994. GenBank/EMBL Data Library con código de acceso X80259 para *Ursus spelaeus*).

Podemos constatar la similitud entre la secuencia publicada y la obtenida a partir del metápodo L-1011. Parecen existir dos lugares de mutación (pb 45-48 y 98) respecto a la secuencia publicada a partir de los ejemplares franceses. Posteriores estudios verificarán si estas mutaciones son relevantes a nivel poblacional y desde el punto de vista paleoecológico.

Este trabajo forma parte de la Tesis Doctoral de la autora.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido subvencionado con cargo a los fondos de investigación proporcionados por el proyecto (XUGA10308A97) y realizado bajo la supervisión del Dr. Pierre Taberlet (Université Joseph Fourier. Grenoble. Francia) y Dra. Catherine Hänni (Université Lyon-1. Lyon. Francia). Deseo agradecer la ayuda y ánimos manifestados por el Dr. J. R. Vidal Romaní, Dra. Aurora Grandal d'Anglade, Fernando López González y Odile Loreille, así como al Dr. Miguel Maestro Saavedra (SXAIN, Universidade da Coruña) y al grupo del Dr. Ángel Carracedo (Universidade de Santiago de Compostela).

BIBLIOGRAFIA

- DERENKO, M.; MALYARCHUK, B. & SHIELDS, G. F. (1998). Mitochondrial Cytochrome b sequence from a 33000 year-old woolly mammoth (*Mammuthus primigenius*). *Ancient Biomolecules*. Vol. 2, pp: 149-153.
- GRANDAL D'ANGLADE, A. (1993) *Estudio paleontológico de los restos de Ursus spelaeus ROSENMÜLLER-HEINROTH 1794 (Mammalia, Carnivora, Ursidae) de Cova Eirós (Triacastela, Lugo, NW de la Península Ibérica)*. Tesis Doctoral. Universidade da Coruña, pp: 256.
- GRANDAL D'ANGLADE, A.; LOPEZ-GONZALEZ, F. & VIDAL ROMANI, J. R. (1997). Condicionantes en la distribución de macromamíferos en Galicia (NW Península Ibérica) durante el Cuaternario superior. *Cad. Lab. Xeol. de Laxe*. Vol. 22, pp: 43-66.
- HAGELBERG, E. (1994). Mitochondrial DNA from Ancient Bones. In: *Ancient DNA*. Herrmann, B.; Hummel, S.(Eds). Springer-Verlag, New York.
- HÄNNI, C. (1994). *Archeologie et Paleontologie moléculaires: applications a l'étude des gisements*. Tesis Doctoral. Université Montpellier II. 149 pp.
- HÄNNI, C.; LAUDET, V.; STEHELIN, D.; TABERLET, P. (1994). Tracking the origins of the cave bear (*Ursus spelaeus*) by mitochondrial DNA sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* . Vol. 91, pp: 12336-12340.
- HILLIS, D. M.; MORITZ, C.; MABLE, B.K. (1998). *Molecular Systematics*. 2nd edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, MA, USA.
- IRWIN, D. M.; KOCHER, T. D. & WILSON, A. C. (1991). Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *J. Mol. Evol.* Vol. 32, pp: 128-144.
- LOPEZ-GONZALEZ, F. (1996). *Estudio geomorfológico y paleontológico del endocarst de Liñares S (Lugo)*. Tesis de Licenciatura. Universidade da Coruña, 90 pp. Inédita.
- PÄÄBO, S. (1989a). Ancient DNA: Extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 86, pp: 1939-1943.
- PÄÄBO, S.; HIGUCHI, R. G. & WILSON, A.C.(1989b). Ancient DNA and the polymerase chain reaction. *J. Biol. Chem.* Vol. 264, pp:9709-9712.
- PÄÄBO, S. (1990). Amplifying Ancient DNA. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, Inc.
- TABERLET, P.; BOUVET, J. (1994). Mitochondrial DNA polymorphism, phylogeography, and conservation genetics of the brown bear *Ursus arctos* in Europe. *PROC. R. SOC. LONDON B*. VOL. 255, pp: 195-200.
- TALBOT, S. L.; SHIELDS, G. F. (1996). A phylogeny of the Bears (Ursidae) inferred from complete sequences of three mitochondrial genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. Vol. 5, nº 3, pp: 567-575.
- THOMAS, R. H.; SCHAFFNER, W.; WILSON, A. C.; PÄÄBO, S. (1989). DNA Phylogeny of the extinct marsupial wolf. *NATURE*. Vol. 340, pp: 465-467.
- YANG, H. (1998). Ancient DNA from Pleistocene fossils: preservation, recovery, and utility of ancient genetic information for quaternary research. *Quaternary Science Reviews*. Vol. 16, pp: 1145-1161.