

ARQUEOLOGÍA MOLECULAR: ALCANCE Y LIMITACIONES DE LOS ANÁLISIS DE ADN EN RESTOS ARQUEOLÓGICOS

Daniel Corach

Andrea Sala*

La obtención de ADN a partir de restos arqueológicos permite remontarse en el pasado y estudiar las relaciones genéticas entre las diferentes poblaciones humanas que habitaron el planeta en los diversos periodos históricos. La biología molecular, de esta manera, brinda una nueva herramienta que permite vislumbrar perspectivas alternativas sobre las migraciones que condujeron al poblamiento del globo. Sin embargo, este nuevo campo de la ciencia es susceptible de fracasos técnicos, haciéndose imperiosos los criterios más restrictivos que permitan asegurar la confiabilidad de los resultados, muy en particular cuando el material de estudio lo constituyen restos humanos.

Desde la aparición de las técnicas que permiten una rápida secuenciación del ADN, los estudios evolutivos que se basan en la comparación de secuencias de ADN se han generalizado. No obstante, debemos considerar que las secuencias de ADN contemporáneas proveen solamente evidencias indirectas del proceso histórico que ha tenido lugar a lo largo de un periodo muy extenso de tiempo. De esta manera podríamos considerar que el campo de la arqueología molecular se halla atrapado por el tiempo. El estudio de ADN obtenido a partir de cadáveres antiguos ofrece una salida parcial a este planteo. Sin embargo, se deben prevenir y evitar numerosos errores técnicos para permitir al arqueólogo molecular viajar en el tiempo y detectar en forma eficiente y precisa los eventos que tuvieron lugar entonces.

¿Por qué el ADN se degrada? ¿Cuáles son los límites de la preservación del ADN? En este breve trabajo presentaremos algunas respuestas a los interrogantes

* Servicio de Huellas Digitales Genéticas y Cátedra de Genética y Biología Molecular. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina. Junín 956, 1113-Buenos Aires. E-mail: sshdg@ffyb.uba.ar

planteados. Tomaremos además el análisis de la Momia del Chuscha como ejemplo de los posibles problemas metodológicos que limitan el éxito de un estudio de arqueología molecular. A modo de revisión, analizaremos algunos aspectos técnicos de gran importancia para la obtención de muestras de ADN antiguo. Sólo bajo condiciones experimentales estrictamente controladas se podrán obtener resultados que puedan ser considerados creíbles y permitan así ser empleados como datos válidos.

Degradación Post-mortem del ADN

Al morir un organismo, normalmente su ADN es degradado por enzimas nucleolíticas endógenas. Bajo ciertas condiciones, tales como la desecación rápida, las temperaturas muy bajas o la concentración salina elevada, las nucleasas pueden ser destruidas o al menos inactivadas antes que los ácidos nucleicos sean reducidos a nucleótidos. Si esto sucede, la velocidad de degradación se reduce pero el proceso de degradación implacablemente afectará al ADN. La oxidación, así como los efectos directos e indirectos de las radiaciones de fondo ambientales de diferente naturaleza (UV, ionizantes, etc.), modificarán las bases nitrogenadas y el esqueleto azúcar-fosfato del ADN. Además, la deaminación, depuración y otros procesos hidrofílicos conducirán a la desestabilización y ruptura en la molécula de ADN. Todos estos procesos crean problemas al momento de recuperar secuencias antiguas de ADN. Así una proporción elevada de residuos de Citosina y Timina obtenidos de extractos de tejidos antiguos se encuentran modificados por procesos oxidativos transformándose en hidantoínas, que bloquean a las enzimas polimerizantes empleadas en el proceso de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), imposibilitando la amplificación del material rescatado. Además, los productos de la deaminación de la citosina, por ejemplo, son frecuentes en muestras de ADN antiguo y causan la inserción de bases incorrectas durante la PCR.

Luego de un tiempo suficientemente largo, los efectos acumulativos de cambios introducidos en el ADN se hacen tan extensivos que no quedan moléculas útiles disponibles en una muestra determinada. Si suponemos que una muestra presenta una concentración fisiológica de sal, pH neutro y una temperatura de 15°C, podrían requerirse unos 100.000 años para que se produzca daño hidrofílico tal que destruya todo el ADN que podría ser razonablemente recuperado de una muestra (1,2). Ciertas condiciones ambientales, tales como bajas temperaturas (3), podrán extender el límite de tiempo, en

tanto que otras condiciones lo reducirán. Sin embargo, considerar posible la amplificación de ADN de más de un millón de años de antigüedad sería optimista en excés.

Recuperación de ADN Antiguo

Para especímenes de plantas y animales que fueron recolectados bajo condiciones controladas y guardados en museos en los últimos 200 años, la técnica de la PCR ha logrado la recuperación de secuencias de ADN en forma casi rutinaria. Comenzando con el estudio de las ratas canguro del Desierto de Mojave que fueron recolectados hacia los inicios del siglo XX (4), muchos estudios emplearon colecciones de museos para investigar poblaciones a lo largo del tiempo (5,6), así como las relaciones filogenéticas de especies extinguidas en periodos recientes (7-10). No obstante, para especímenes arqueológicos y paleontológicos la recuperación de secuencias de ADN antiguo está muy lejos de ser una práctica rutinaria, ya que los investigadores deberán luchar con el hecho de que muy poco, y a menudo nada, de ADN sobrevive en los tejidos antiguos, en tanto que el ADN contemporáneo es omnipresente, en el ambiente, tanto dentro como fuera del laboratorio. Por lo tanto, se deben tomar medidas de precaución extremas para evitar la presencia de ADN extraño en las reacciones de amplificación por PCR. Por ejemplo, la extracción y purificación del ADN, así como la preparación de la PCR deberán llevarse a cabo en un laboratorio que esté rigurosamente separado de los lugares en los que se trabaje con ADN moderno. El tratamiento con lavandina del equipo de laboratorio, la irradiación con UV, de todo el ambiente, junto con otras precauciones como ropa protectora y máscaras faciales constituyen otras precauciones (11,12.). Además diversos criterios de autenticidad son esenciales para ofrecer credibilidad acerca de que las secuencias de ADN son antiguas. A pesar de estas precauciones, la contaminación es una amenaza continua, si por ninguna otra causa el espécimen en sí mismo pudiera estar contaminado con ADN moderno. Las mayores dificultades se plantean al estudiar restos humanos. La razón es que el ADN es particularmente prevaleciente en el ambiente de los laboratorios y los museos y no resulta fácil distinguir este ADN endógeno de aquél obtenido de restos humanos antiguos. De hecho, debido a que las secuencias del ADN pueden ser recuperadas a partir de restos de animales antiguos podría creerse que muchos artículos publicados que informan sobre secuencias de ADN humano antiguo no son confiables. El estudio de restos de animales antiguos presenta menos problemas, si nos

referimos a la autenticidad, ya que las secuencias rescatadas constituyen "*per se*" testimonio de su autenticidad y origen al ser diferentes, aunque relacionadas, a las especies actuales pertenecientes al mismo grupo taxonómico. La posibilidad de recuperar ADN analizable, a partir de especímenes antiguos, se verá incrementada si intentamos obtener secuencias que se encuentran en copias múltiples en el genoma, probablemente debido a que éstas son más numerosas en cada célula. Tal afirmación se encuentra sustentada por el hecho de que las secuencias recuperadas a partir de los restos más antiguos provienen de las mitocondrias en animales y de cloroplastos en plantas.

Asegurando la Preservación.

Sólo una proporción muy limitada de especímenes antiguos que han sido analizados contiene ADN amplificable por PCR. Por lo tanto es necesario disponer de métodos que permitan un relevamiento rápido para identificar la gran fracción de muestras conservadas pobremente en las que no se justifica el intento de extracción de ADN. En particular, el análisis de aminoácidos que permiten determinar la cantidad total de aminoácidos conservados en un espécimen, la composición de estos y el grado de racemización que algunos aminoácidos han experimentado. Esta estrategia ha sido exitosamente empleada para evaluar la preservación del ADN (13). Si cualquiera de estos parámetros excede ciertos niveles, el intento de rescatar ADN de estas muestras será inútil. Por otro lado, el análisis de aminoácidos permitirá asegurar la autenticidad de las secuencias ADN recuperadas a partir de especímenes al exhibir que las condiciones de preservación han sido tales que resulta concebible la recuperación de macromoléculas. Otro método que puede ser de utilidad para este fin, pero que no ha sido usado extensivamente, es la pirólisis acoplada con cromatografía gaseosa y espectrometría de masa (14).

Cuantificación.

La estimación del número de moléculas de templado de ADN antiguo a partir de la cual comienza la reacción en cadena de la polimerasa, es otra forma aplicable para asegurar la calidad de las secuencias del ADN antiguo. Si el proceso de amplificación comienza con muy pocas o cadenas únicas de ADN, entonces los errores de

polimerización que podrían ocurrir en los primeros ciclos se incorporarán en todas las moléculas presentes en el producto final de PCR. Tales errores podrán ser abundantes si el grado de daño en el ADN es grande. Además, si las amplificaciones han sido realizadas a partir, por ejemplo de un locus microsatélite localizado en un cromosoma autosómico, entonces uno de los dos alelos fallará en amplificar si el proceso comienza con una molécula única, determinando que se considere erróneamente al individuo analizado como homocigota. Por lo que resulta necesaria la amplificación de numerosas muestras del mismo espécimen para prevenir estas circunstancias. Resulta evidente la importancia de la determinación del número de moléculas de templado a partir de las cuales comienza la PCR. Si una reacción de PCR comienza con 1,000 o más moléculas, entonces no resulta necesaria la repetición para verificar que la incorporación incorrecta no influye en el resultado (15). Si en cambio, la reacción comienza con un número menor de moléculas, serán necesarias varias repeticiones del experimento. Además el clonado de los productos de amplificación y la posterior secuenciación de varios clones será esencial para detectar problemas. Por ejemplo, si en el producto de amplificación de una PCR se detectan varias secuencias diferentes esto podrá indicar la presencia de contaminación o bien de una mala incorporación de nucleótidos durante los primeros ciclos de amplificación.

Análisis Molecular de la Momia del CHUSCHA.

La Historia detallada disponible sobre la Momia del Chuscha se halla profundamente analizada en el presente volumen. Desde el momento mismo de su descubrimiento han pasado muchos años y durante ese prolongado periodo y en manos de diferentes dueños el material arqueológico necesariamente sufrió un constante proceso de contaminación tanto a través del contacto con arqueólogos o simplemente curiosos ansiosos por conocer la textura de la piel de la momia. Esta situación describe la situación opuesta a la ideal, planteada en los párrafos anteriores. La contaminación con ADN exógeno era inevitable. Por otro lado, además de la no deseada contaminación involuntaria con material genético humano, el material momificado sufrió una paulatina contaminación con microorganismos. Resulta muy difícil prevenir este tipo de infecciones si el material de colección se encuentra expuesto a condiciones inadecuadas de preservación y, entre los organismos de la flora microbiana más activos, los hongos suelen ser los primeros colonizadores. El panorama del material a analizar resultaba "*ab*

initio" desalentador. Sin embargo se procedió a analizar el material empleando las metodologías rutinarias disponibles en el laboratorio del Servicio de Huellas Digitales Genéticas de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires. En este laboratorio se realizan análisis de muestras con interés forense y se aplican las mismas metodologías analíticas empleadas por los arqueólogos moleculares. Dado que tanto los trabajos de Arqueología molecular como Genética Forense tienen en común que el material a ser investigado posee rastros mínimos de material genético y que es susceptible de contaminación con otros ADN humanos omnipresentes, se maximizan las condiciones de aislamiento para llevar a cabo todas las manipulaciones (16).

Los pequeños fragmentos óseos remitidos para el análisis se sometieron a una meticulosa limpieza y decontaminación, con el objeto de evitar poner de manifiesto restos de ADN proveniente de manipulaciones previas. Tal decontaminación puede lograrse mediante el exhaustivo lavado del material en agua corriente, hipoclorito de sodio diluido (10% V/v), agua corriente, agua destilada, alcohol absoluto y finalmente secado en estufa a 37°C. Con el objeto de asegurar la extracción de material genético de estos restos se emplearon diferentes procesos de extracción basados en diferentes agentes químicos: sales de amonio cuaternario (17), tiocianato de Guanidina y Silica (18), proteinasa K /SDS (19).

Los procesos de purificación incluyeron sistemas de precipitación con diversas sales (Acetato de Sodio, Acetato de Amonio y Cloruro de Sodio) y alcohol (Etilico e Isopropílico), como también mediante diálisis reversa (Centricon/Microcon). Todas las muestras extraídas exhibían fluorescencia al ser irradiadas con luz ultravioleta luego de haberse separado electroforéticamente los fragmentos de ADN en geles de agarosa al 2% (el colorante intercalar empleado fue el Bromuro de Etidio). El ADN rescatado era de muy bajo peso molecular.

A los efectos de comprobar la presencia de material genético humano se procedió a amplificar por PCR las regiones variables I y II (HPVR I y II) del ADN mitocondrial. De las muestras extraídas y purificadas mediante las diferentes metodologías usadas no resultó posible poner de manifiesto secuencias mitocondriales humanas. Con el objeto de determinar la presencia de ADN contaminante amplificable se efectuaron amplificaciones del gen del citocromo b de ADNmt. Tampoco en este caso fue posible la amplificación de estos fragmentos, concluyéndose que el material genético presente en la momia del Chuscha probablemente se halla modificado por procesos

semejantes a los arriba descritos por lo que no es posible obtener información genética aplicable a la investigación.

Este caso particular es uno más de aquellos en los que no es posible realizar inferencias de arqueología molecular debido a la imposibilidad de obtención de material genético.

Bibliografía:

1. Pääbo, S. & Wilson, A. C. Miocene DNA sequences — a dream come true? *Curr. Biol.* 1, 45–46 (1991).
2. Lindahl, T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362, 709–715 (1993).
3. Collins, M. Neanderthal DNA: not just old but old and cold. *Nature* (in the press).
4. Thomas, W. K., Pääbo, S., Villablanca, F. X. & Wilson, A. C. Spatial and temporal continuity of kangaroo rat populations shown by sequencing mitochondrial DNA from museum specimens. *J. Mol. Evol.* 31, 101–112 (1990).
5. Groombridge, J. J., Jones, C. G., Bruford, M. W. & Nichols, R. A. 'Ghost' alleles of the Mauritius kestrel. *Nature* 403, 616 (2000).
6. Cooper, A. *et al.* Ancient DNA and island endemics. *Nature* 381, 484 (1996).
7. Thomas, R. H., Schaffner, W., Wilson, A. C. & Pääbo, S. DNA phylogeny of the extinct marsupial wolf. *Nature* 340, 465–467 (1989).
8. Krajewski, C., Driskell, A. C., Baverstock, P. R. & Braun, M. J. Phylogenetic relationships of the thylacine (Mammalia: Thylacinidae) among dasyuroid marsupials: evidence from cytochrome *b* DNA sequences. *Proc. R. Soc. Lond. B* 250, 19–27 (1992).
9. Christidis, L., Leeton, P. R. & Westerman, M. Were bowerbirds part of the New Zealand fauna? *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 93, 3898–3901 (1996); erratum 93, 14992 (1996).
10. Krajewski, C., Buckley, L. & Westerman, M. DNA phylogeny of the marsupial wolf resolved. *Proc. R. Soc. Lond. B* 264, 911–917 (1997).
11. Handt, O., Höss, M., Krings, M. & Pääbo, S. Ancient DNA: methodological challenges. *Experientia* 50, 524–529 (1994).
12. Höss, M., Handt, O. & Pääbo, S. in *The Polymerase Chain Reaction* (eds Mullis, K., Ferre, F. & Gibbs, R.) 257–264 (Birkhauser, Boston, Massachusetts, 1994).
13. Poinar, H. N., Höss, M., Bada, J. L. & Pääbo, S. Amino acid racemization and the preservation of ancient DNA. *Science* 272, 864–866 (1996). Presents amino-acid analysis as a tool to substantiate claims that DNA can (or cannot) survive in ancient organic remains.
14. Poinar, H. N. & Stankiewicz, B. A. Protein preservation and DNA retrieval from ancient tissues. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96, 8426–8431 (1999).
15. Handt, O., Krings, M., Ward, R. H. & Pääbo, S. The retrieval of ancient human DNA sequences. *Am. J. Hum. Genet.* 59, 368–376 (1996).
16. Corach, D., Penacino, G., Sala, A., Iannucci, N., Berardi, P., Doretti, M., Fondebrider, L., Ginarte, A., Inchaurregui, A., Somigliana, C., Turner, S., Hagelberg, E. Additional Approaches to DNA Typing of Skeletal Remains: The Search for Missing Persons Killed During the Last Dictatorship

In Argentina.. *Electrophoresis* (1997).18(9):1608-1612.

17-Corach D., Penacino G. and Sala A. Cadaveric DNA Extraction Protocol Based on Cetyl Trimethyl Amonium Bromide (CTAB). *Acta Medicinae Legalis* Vol XLIV 1994, P. Mangin and B. Ludes Eds.Springer Verlag, pp:35-36.(1995).

18- Boom R., Sol CJA., Salimans M., Jansen C., Wertheim-van Dillen ., van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of Nucleic Acids. *Journal of Clinical Microbiology*, 28 (3), 495-503. (1990) .

19- Maniatis T., Sambrook J., Fritsch E. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.