

MUNIBE (Antropología - Arkeologia)	Supl. nº 8	209-212	SAN SEBASTIAN	1992	ISSN 1132 - 2217
-------------------------------------------	------------	---------	---------------	------	------------------

Extracción y caracterización del DNA procedente de hueso esponjoso reciente y de los siglos XVI y XVII.

Extraction and characterization of DNA from both recent Spongy Bone and from that of the XVI and XVII Centuries.

PALABRAS CLAVE: DNA óseo antiguo, Población Vasca.
KEY WORDS: Bone DNA, Ancient DNA, Basque Population.

Marian MARTINEZ DE PANCORBO *
Azucena CASTRO * **Santos ALONSO ***
Josu ORUE *** **Africa GARCIA-ORAD ***
Paz ARIZTI * **Germán TAMAYO ****
Francisco ETXEBERRIA ** **Concepción DE LA RUA *****

RESUMEN

El análisis del DNA de 10 individuos de los siglos XVI y XVII del País Vasco, ha puesto de manifiesto que la cantidad de DNA que puede extraerse obtiene un rendimiento entre el 12% y el 50%. El tamaño de los fragmentos de DNA es en el mayor número de los casos pequeño, no observándose en estos individuos los fragmentos intermedios que aparecen en el DNA de sujetos recientes. La contaminación bacteriana aparece con mayor frecuencia. Otro factor observado en las características del DNA obtenido es la influencia de la edad de los individuos, ya que el estudio del DNA de un individuo juvenil demostró mayor rendimiento, tal y como ocurre en el DNA de células nucleadas de la sangre de sujetos vivos. En conclusión, la extracción de DNA a partir de material óseo con cuatro siglos de antigüedad es posible mediante el procedimiento desarrollado en este trabajo, y su rendimiento es suficiente para proceder a posteriores análisis del polimorfismo de esta molécula en poblaciones antiguas.

SUMMARY

The analysis of DNA in the individuals from the 16th and 17th centuries in the Basque Country, has given rise to the conclusion that the quantity of DNA that can be extracted is between 12 and 50%. In most cases the size of the DNA fragments is small, the intermediate-sized fragments obtainable from recent individuals not being observed in these subjects. Bacterial contamination appears with a greater frequency.

Another characteristic factor observed in the DNA obtained is the influence of the age of individuals given that the DNA of a young individual gives a higher yield similar to that from nucleated blood cells from a living individual.

In conclusion, the extraction of DNA from bone material of four centuries antiquity is possible using the procedure developed during this investigation. Its yield is sufficient to proceed to the subsequent analysis of the polymorphism of this molecule in past populations.

LABURPENA

Euskal Herriko XVI eta XVII. mendeko 10 gizabanakoren DNAREN analisiak agerian utzi du atera daitekeen DNA kopuruak %12 eta %50aren arteko errendimendua lortzen duela. DNA-zatien tamaina txikia da kasu gehienetan, gizabanako hauengan subjeto berrien DNAN agertzen diren tamaina ertaineko zatiak somatzen ez direlarik. Bakteriazko kutsadura sarriago agertzen da. Lorturiko DNAREN ezaugarrietan behatutako beste faktore bat da gizabanakoen adinaren eragina, gizabanako gazte baten DNAREN azterketak errendimendu handiago agertu bait zuen, subjeto bizien odoleko zelula nukleodunen DNAN gertatzen den bezalaxe. Ondorezta daiteke, beraz, lau mendeko antzinatasuna duen hezurgaitik DNA atera egin daitekeela lan honetan garatutako prozeduraren bitartez, eta honen errendimendua nahikoa dela molekula honen polimorfismoaren ondoko analisisiei ekiteko antzinako populazioetan.

1. INTRODUCCION

Los estudios del genoma humano han experimentado un gran avance en los últimos años, gracias a la tecnología del DNA. El análisis de los polimorfismos de DNA constituye actualmente el método más resolutivo para la caracterización individual, de lo que se deriva que tiene múltiples aplicaciones en Antropología y Biología Forense. Asimismo, ha expe-

Servicio de Diagnóstico de la paternidad Biológica del País Vasco.
 Universidad del País Vasco:

* Departamento de Biología Celular y Ciencias Morfológicas.

** Departamento de Especialidades Médico-Quirúrgicas Legal.

*** Departamento de Biología Animal y Genética.

rimentado un gran auge el diagnóstico de las enfermedades hereditarias, los procesos tumorales y la detección de agentes infecciosos tales como HIV, virus de la hepatitis y citomegalorivirus, entre otros.

Todos estos avances son aplicables directamente a los tejidos vivos. Sin embargo, su aplicación en el campo de la Paleobiología, o concretamente en el campo de la Paleopatología, implica mayor dificultad. Para tratar de solucionar este problema se ha intentado el estudio del DNA en tejidos antiguos. Antes de proceder a cualquier tipo de análisis es necesario extraer y purificar el DNA. Si bien la extracción de DNA de tejidos frescos puede realizarse mediante diversas técnicas bien establecidas, la extracción a partir de tejidos post mortem ofrece numerosas dificultades, principalmente debidas a la degradación y contaminación bacteriana que sufre la molécula de DNA con el paso del tiempo. Pese a todo ello, la investigación del DNA en tejidos antiguos es de gran interés para aquellos casos en los que no es posible disponer de muestras recientes, tal como ocurre en el estudio de poblaciones antiguas. Por otro lado, aunque el DNA sufre cambios a lo largo del tiempo, su grado de conservación es muy superior al de otras moléculas, tales como proteínas y enzimas, y constituye, por tanto, el material biológico de elección.

Debido a que el tiempo destruye la gran mayoría de los tejidos orgánicos, se ha elegido el material óseo, cuyo grado de conservación es elevado, para proceder a la extracción de DNA. Con el fin de obtener mayor rendimiento, se ha seleccionado el hueso esponjoso, dado que en sus cavidades estuvo alojada la médula ósea, y por ello quedan en este tejido numerosos restos celulares cuyos núcleos contenían el DNA objeto de nuestro estudio. El tejido óseo esponjoso estudiado ha sido el correspondiente a la cabeza del fémur, ya que presenta una capa de hueso compacto que ayuda a su conservación y a una mayor protección contra la contaminación bacteriana del hueso esponjoso que se aloja en su interior.

Los objetivos perseguidos en este trabajo fueron: analizar la repetitividad en cuanto a la cantidad de DNA obtenible, y estimar los efectos del tiempo sobre la integridad del DNA mediante la determinación del tamaño de los fragmentos extraídos.

2. MATERIALES Y METODOS

Se ha analizado una muestra de 11 individuos, 3 de ellos recientes, inhumados en Derio (Vizcaya) hace 15 años, y 8 inhumados hacia finales del siglo XVI y comienzos del XVII (7) en San Agustín de Elorrio y (1) en la iglesia de Rigoitia. Los fémures más recientes mostraban un alto grado de conservación y en uno de los sujetos ha sido posible comparar los DNAs extraídos de sus dos fémures, ya que había plenas garantías de que pertenecían al mismo individuo. En el caso de los más antiguos, las condiciones

de conservación son también buenas, ya que todos fueron inhumados en el interior de una iglesia, de forma que han estado a salvo de las influencias negativas de la vegetación que puede considerarse como el primer principal factor de destrucción.

La metodología utilizada para la extracción del DNA fue como se describe a continuación:

2.1. Preparación de la muestra.

Se extrae mecánicamente el tejido óseo esponjoso hasta obtener 3 g. Se tritura el tejido en un mortero de porcelana. Se añaden 5 ml de una disolución EDTA disódico 2% y EDTA trisódico 5%, y se deja toda la noche en agitación a Tª ambiente. Centrifugar 10 min a 3.500 r.p.m., recuperar el sobrenadante y volver a centrifugar 10 min a 4.500 r.p.m.; recuperar de nuevo el sobrenadante. El volumen aproximado es de 3 ml. Filtración en gel Sephadex G-25, en columna de Vo = 25 ml. Se utiliza azul dextrano como marcador del frente de elución. El eluyente es agua con merthiolato (1:10.000). El volumen a recuperar es función de la dilución de la columna y de la muestra depositada. Concentración por vacío, en frío, hasta obtener un volumen final de 400 µl. Adición de 7 µl de Proteinasa K (10 µg./ml.).

La técnica de extracción, consistente en un procedimiento no tóxico –basado en altas concentraciones de sales– fue puesta a punto modificando el método descrito por MILLER *et al.* (1988) para el caso de células nucleadas humanas, procediendo de la siguiente manera:

2.2. Extracción de DNA.

Se añaden de nuevo 10 µl de Proteinasa K, 375 µl de acetato sódico 0,2 M, y 25 µl de SDS 20% y se incuba a 56°C durante 1 h. A continuación se añaden 405 µl de NaCl 6 M, y se agita enérgicamente, durante 15 sg. Se centrifuga a 5.000 r.p.m. durante 15 min. Se recupera la fase intermedia del sobrenadante (= 500 µl). Se añade 1 ml de etanol 100% frío, y se deja precipitar durante 1 a 3 h a –80°C. Centrifugar 20 min a 13.000 r.p.m. Eliminar el sobrenadante y dejar secar a la luz de una lámpara de 100w durante 5-10 min. Se resuspende en 10 µl de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,8) durante una noche.

2.3. Purificación del DNA extraído.

Se añaden 2,5 µl de acetato sódico 3M y 40 µl de etanol 100% frío y se deja a –80°C varias horas. Centrifugar 20 min a 13.000 r.p.m. y eliminar el sobrenadante, y dejar secar a la luz de la lámpara durante 5-10 min. Disolver en 10 µl de TE.

2.4. Cuantificación.

La cuantificación del DNA no pudo realizarse por espectrofotometría en la mayoría de los casos, ya que las concentraciones de DNA procedentes del tejido óseo estaban por debajo del límite de resolución del aparato, por lo cual fue necesario efectuar las

cuantificaciones mediante un método capaz de estimar entre 0,1 y 10ng./µl (Dipstick, Invitrogen).

2.5. Estimación del tamaño en pares de bases (pb) del DNA extraído del tejido óseo esponjoso.

Se migró el DNA purificado en un gel de agarosa al 7 % en TBE, utilizando DNA del fagó cortado con el enzima Hind III como marcador. Se aplicaron 5 V/cm. y se dejó migrar hasta que la distancia recorrida por el fragmento de 3.000 pb fué de 20 mm.

3. RESULTADO

La Tabla 1 muestra la cantidad en ng de los DNAs extraídos de cada uno de los individuos que componen la muestra. Como puede observarse, se extrajo mayor cantidad de DNA en los individuos que fueron inhumados recientemente. Solamente en dos de ellos (06/91 y 08/91) fue posible estimar el DNA mediante métodos espectrofotométricos, dado que la cantidad de DNA fue elevada; en los otros casos hubo que recurrir a un método más sensible. Para estimar la repetitividad de la técnica se practicaron extracciones de DNA en ambos fémures del mismo individuo (09/91). Las muestras 09/91 (a1) y 09/91 (a2) proceden de la cabeza proximal del mismo fémur; las muestras (b1) y (b2) proceden de la porción proximal y distal del otro fémur. En todos los casos, la cantidad de DNA obtenida fue la misma

El DNA extraído de los individuos 13/91 al 20/91 corresponde a tejido óseo esponjoso de mayor antigüedad (ss. XVI-XVII). En todos los casos las cantidades obtenidas fueron menores.

Con el fin de conocer el tamaño en pb de los DNAs se sometieron a electroforesis, utilizando DNA del fagó cortado con Hind III como control. La Tabla

2 recoge las clases de fragmentos observados. Se consideraron fragmentos grandes aquéllos cuyo tamaño en pb pudo estimarse de aproximadamente 23.000, por coincidir su posición con el fragmento mayor del fago Hind III. Los fragmentos mostrados en la Tabla 2 como pequeños fueron los que tenían un tamaño que los situaba en una región próxima a la de la banda de 560 pb de Hind III. Se denominó con el término intermedio a los fragmentos que se detectaron en regiones intermedias entre la de 23.000 pb y 560 pb. Los DNAs obtenidos de tejido con 15 años de antigüedad mostraron presencia de fragmentos pequeños, fragmentos intermedios y sólo en un caso de fragmentos grandes. En los casos de tejido óseo esponjoso, de 300-400 años de antigüedad, se pudo detectar en todos los casos presencia de grandes fragmentos y pequeños, mientras que sólo uno de ellos (16/91) mostraba también fragmentos intermedios.

4. DISCUSION

La cuantificación del DNA extraído mediante el método espectrofotométrico tradicional y el método de alta sensibilidad (Dipstick) fue posible en el caso del individuo 06/91. La utilización simultánea de estos métodos pone de manifiesto que ambas técnicas rinden resultados similares, por lo cual la técnica Dipstick parece ser un método altamente fiable. Asimismo, cabe decir que esta técnica de cuantificación se convierte en imprescindible en la mayoría de los casos de DNA extraído de tejido óseo, dado el reducido rendimiento en DNA de este tejido, que por otro lado es similar en nuestros casos al que describen PÁABO *et al.* (1989). Hay que señalar, sin embargo, la importancia de realizar cuantificaciones mediante el método espectrofotométrico siempre que sea posible, dado que la relación entre las absorbancias a 260/280 nm es un factor importante para valorar si el

Antigüedad	Ident.	Metodo de valoración	ng de DNA
15 años	06/91	Espectrofotometría	2300
		Dipstick	2500
15 años	08/91	Espectrofotometría	1500
15 años	09/91 (a1)	Dipstick	400
15 años	09/91 (a2)	Dipstick	400
15 años	09/91 (b1)	Dipstick	400
15 años	09/91 (b2)	Dipstick	400
S. XVI-XVII	13/91	Dipstick	50
S. XVI-XVII	14/91	Dipstick	50
S. XVI-XVII	15/91	Dipstick	60
S. XVI-XVII	16/91	Dipstick	100
S. XVI-XVII	17/91	Dipstick	25
S. XVI-XVII	18/91	Dipstick	200
S. XVI-XVII	19/91	Dipstick	100
s XVI-XVII	20/91	Dipstick	100

Tabla 1.- DNA de tejido óseo: Antigüedad y rendimiento.

Antigüedad	Ident.	Fragmentos		
		Grandes	Intermedios	Pequeños
15 años	09/91 (a1)	-	+	+
15 años	09/91 (a2)	+	+	+
15 años	09/91 (b1)	+/-	+	+
15 años	09/91 (b2)	+/-	+	+
S.XVI-XVII	13/91	+	-	+
S.XVI-XVII	14/91	+	-	+
S.XVI-XVII	16/91	+	+	+
S.XVI-XVII	18/91	+	-	+
S.XVI-XVII	19/91	+	-	+
S.XVI-XVII	20/91	+	-	+

Tabla 2.- Estima del tamaño de los fragmentos de DNA obtenido de tejido óseo esponjoso.

DNA extraído está suficientemente purificado y libre de contaminantes químicos.

La cantidad de DNA obtenido es muy variable entre diferentes individuos pertenecientes a la misma época reciente –15 años de antigüedad–. Sin embargo, la cuantificación del DNA obtenido a partir del mismo individuo muestra alta repetibilidad –muestras 09/91 (a1) a (b2)–, de tal manera que la variabilidad observada entre diferentes sujetos no cabe ser atribuida a la metodología de extracción, sino probablemente a diferencias en el grado de preservación del DNA en el tejido óseo esponjoso de los distintos individuos, sumadas a la variabilidad que es habitual encontrar incluso en tejidos vivos.

La misma variabilidad fue observada en el rendimiento de DNA procedente de los sujetos con mayor antigüedad. Sin embargo, el largo período de tiempo transcurrido desde la inhumación hizo descender notablemente la cantidad de DNA obtenido. En estos casos, pudo ponerse en evidencia que las condiciones de conservación fueron similares en todos ellos, excepto el individuo 16/91, procedente de la iglesia de Rigoitia. Esto podría significar que, si bien las condiciones del medio que rodea a los restos es importante, los factores que afectan a la preservación del DNA deben ser además otros, entre los que podríamos citar factores internos del propio sujeto, tales como actividad y concentración de endo- y exonucleasas internas, factores patológicos asociados, así como contaminación bacteriana focal. Cualquiera que sea la combinación de factores que afectan a la preservación del DNA, podría decirse que, aunque en cantidades muy bajas, éste persiste en el tejido esponjoso de manera detectable.

Otro factor de importancia en el estudio del DNA antiguo es el tamaño de éste. Los análisis de tamaño realizados mediante electroforesis indican que en todos los casos se obtienen fragmentos próximos a las 500 pb, que coincide con lo descrito por PÄABO en 1990. La obtención de fragmentos de tal tamaño resulta importante para proceder a estudios de diversos fragmentos del genoma por medio de la reacción en cadena de la polimerasa. El DNA extraído a partir de tejidos vivos se caracteriza por tener un tamaño igual o superior a 23.000 pb. A medida que este DNA se degrada por la acción de las endo- y exonucleasas celulares se produce una fragmentación. Este parece ser el caso de los DNAs de los individuos con 15 años de antigüedad, donde se observa una graduación de fragmentos comprendidos entre 23.000 y 500 pb.

En uno de estos individuos (09/91) se puede observar también una banda, difusa de gran tamaño, lo que podría significar que queda todavía algún resto de DNA sin fragmentar. Por el contrario, en los individuos de más antigüedad, se puede detectar la presencia de una banda de 23.000 pb, mientras que no aparecen los fragmentos de tamaño intermedio excepto en el caso 16/91. La interpretación más proba-

ble de tal hecho puede residir en que la ausencia de fragmentos intermedios indica que la degradación del DNA pudo producirse en los primeros años posteriores a la inhumación, tal como aparece en los individuos con 15 años de antigüedad, y que este fenómeno condujo a la reducción del DNA original a fragmentos de aproximadamente 500 pb o menores. De haber quedado inconcluso el proceso de la fragmentación sería todavía observable la presencia de fragmentos de tamaño intermedio. El análisis del DNA procedente de tejido óseo con mayor antigüedad podrá poner de manifiesto si la degradación del DNA se para cuando se llega a fragmentos de este tamaño, lo que sería explicable por un agotamiento de la actividad enzimática de las nucleasas, o bien sigue progresando hasta degradar el DNA en fragmentos todavía menores. Sin embargo, a la vista del tamaño de los fragmentos del DNA obtenidos en otros tejidos con gran antigüedad (PÄABO *et al.*, 1989), cabría pensar que el proceso de degradación se frena notablemente al llegar a los fragmentos de alrededor de 500 pb.

El DNA de gran tamaño detectado en las muestras más antiguas estudiadas, alrededor de 23.000 pb, está en concordancia con lo observable en el caso de tejidos vivos. La ausencia de estos fragmentos en algunos individuos más recientes, junto con la ausencia de fragmentos intermedios en los individuos antiguos, permite suponer que se trata de DNA exógeno, probablemente de origen bacteriano. Para comprobar este punto, nos proponemos efectuar en breve una hibridación con sondas de DNA que reconocen de manera específica DNA eucariótico.

La posibilidad de extraer DNA en el tejido óseo esponjoso, en cantidades superiores a 0,1 µg ó 0.1 microgramos, y con tamaños de aproximadamente 500 pb, abre interesantes expectativas, ya que la amplificación de este DNA mediante PCR permitirá obtener conocimientos de interés en cuanto a la determinación del sexo de los restos óseos, las relaciones de parentesco entre determinados restos, la paleogenética y evolución, la paleopatología de enfermedades de transmisión genética y de los procesos tumorales y la presencia de infecciones virales, entre otras muy diversas posibilidades a estudiar en las poblaciones antiguas.

BIBLIOGRAFIA

- MILLER, S.A., DYKES, D.D. & POLESKY, H.
1988 A simple procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl. Acid. Res.* 16, 121-5.
- PÄABO, S.
1989 Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning and enzymatic amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1939-1943.
- PÄABO, S.
1990 *Amplifying ancient DNA en PCR Protocols*. Innis et al. Academic Press New York, 159-166.