

Amplificación del gen de la amelogenina y de una secuencia repetitiva alfoide del cromosoma-Y en restos arqueológicos del País Vasco

(Amplification of the amelogenine gene and of a repetitive alphoid sequence of the Y-chromosome in archaeological remains in the Basque Country)

Bizcarra, Nilda de; Alzualde, Ainhoa; Alonso, Santos; Izagirre, Neskuts; Rúa, Concepción de la
Univ. del País Vasco
Fac. de Ciencias
Dpto. Biología Animal y Genética
Apartado 644
48080 Bilbo

La aplicación de técnicas de biología molecular (amplificación del gen de la amelogenina y un fragmento de la secuencia DYZ1), nos ha permitido estimar el sexo de los restos esqueléticos en muestras de diversa cronología de una forma más directa y objetiva. Aplicando esta metodología a la necrópolis de Aldaieta (Alava, s. VI-VII), se puede tratar de correlacionar el "género cultural" con el "sexo genético".

Palabras Clave: ADN antiguo. Estimación del sexo. Amelogenina. DYZ1. Restos humanos.

Biología molekularren tekniken (amelogeninaren genearen eta DYZ1 sekuentziaren zati baten aplikazioa) aplikazioak hezur aztarnen sexua zehaztea bideratu digu, era zuzenago eta objektiboagoz kronologia desberdineko laginetan. Metodologia hori Aldaietako nekropoliari aplikatuz (Araba, VI-VII mendeak), "genero kulturala" eta "sexu genetikoa" lotzen saiatu ahal da.

Giltza-Hitzak: Antzinako ADN. Sexua zehaztea. Amelogenina. DYZ1. Giza hondakinak.

L'application de techniques de biologie moléculaire (amplification du gène de l'amelogénine et un fragment de la séquence DYZ1), nous a permis d'estimer le sexe des restes squelettiques dans des échantillons de chronologie diverse d'une façon plus directe et objective. En appliquant cette méthodologie à la nécropole d'Aldaieta (Alava, VI-VIIe siècles), on peut essayer de relier le "genre culturel" avec le "sexu génétique".

Mots Clés: ADN ancien. Estimation du sexe. Amélogénine. DYZ1. Restes humains.

1. INTRODUCCIÓN

El modelo utilizado tradicionalmente para la asignación del sexo de los esqueletos recuperados en contextos arqueológicos se ha basado, tanto en el análisis morfométrico, como en la asociación con determinados elementos del ajuar

El análisis morfométrico permite la estimación del sexo en los restos esqueléticos adultos, principalmente mediante el estudio del cráneo y de la pelvis (Acsády & Nemeskery, 1970; St. Hoyme & Iscan, 1989). Sin embargo, la mayoría de los rasgos sexuales secundarios se desarrollan a partir de la pubertad, por lo que la estimación del sexo en individuos infantiles y juveniles es prácticamente imposible. El mismo problema surge cuando los restos están fragmentados o se carece de los huesos más informativos (cráneo y pelvis).

Un análisis bibliográfico de la asignación del género en yacimientos de distinta procedencia, ha puesto de manifiesto que este parámetro puede variar en relación a la cronología e incluso a la localización geográfica (Stig Sorensen, 1991) o también en función de factores tales como la edad, etnicidad y estatus social, variando con ello los atributos ligados al género como resultado de las funciones ideológicas de las costumbres mortuorias (Halsall, 1995).

Por todo ello, resulta muy interesante disponer de alguna técnica para estimar el sexo de los individuos de un modo más objetivo, e independiente de análisis morfométricos esqueléticos o del ajuar asociado con el material objeto de estudio. Actualmente se encuentra al alcance de nuestra mano una técnica que nos permite identificar el sexo de los esqueletos de un modo objetivo: el análisis molecular del ADN recuperado de restos esqueléticos.

2. METODOLOGÍA

En este trabajo, la identificación del sexo se ha realizado mediante la amplificación de un pequeño fragmento homólogo del intron 1 del gen de la amelogenina en los cromosomas XY y mediante la amplificación de un pequeño fragmento de una secuencia repetitiva alfoide, específica del cromosoma Y (DYZ1).

La ventaja del análisis de un fragmento de la secuencia alfoide del cromosoma Y radica en que se analiza un fragmento altamente repetitivo del cromosoma Y, hecho que facilita la amplificación con éxito del ADN de restos antiguos. No obstante, aunque la presencia del producto de amplificado indicaría que el resto analizado perteneciera a un individuo masculino, la ausencia de amplificación no indicaría necesariamente que el individuo fuera femenino; existe una alta probabilidad de falsos negativos, causados por la baja cantidad y mala calidad del ADN (Cooper, 1994; Hagelberg & Clegg, 1991; Pääbo *et al.*, 1988). En este trabajo hemos diseñado unos *primers* (JR25 y JR26) para

amplificar un fragmento de 154 pb de longitud (Véresi *et al.*, 1999) (figura 1b).

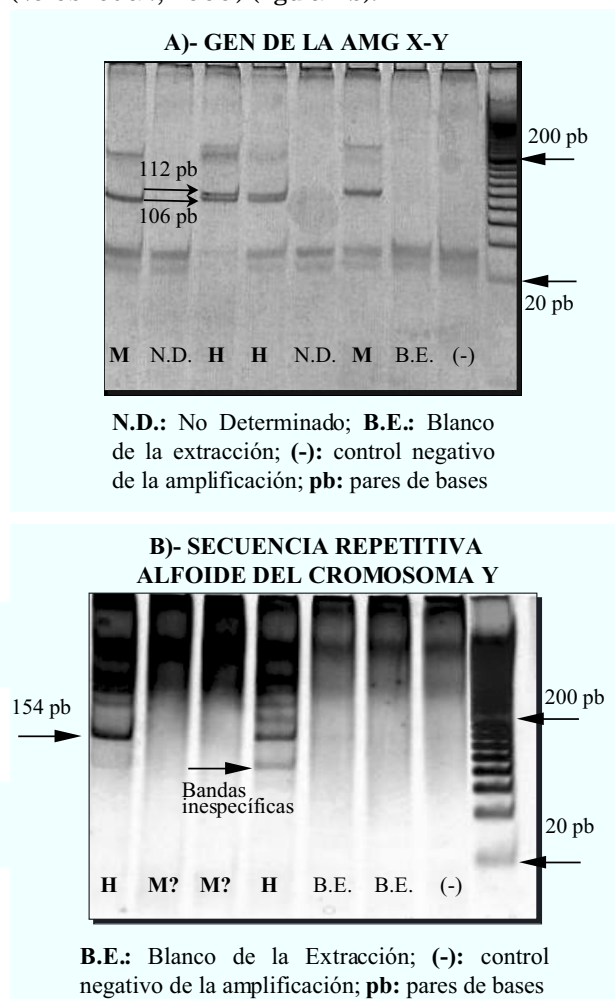


Figura 1: Comprobación de los amplificados del gen de la amelogenina (a) y la secuencia alfoide (b) en un gel de poliacrilamida al 12% y tinción con plata.

El *primer* intron del gen de la amelogenina exhibe dimorfismo de longitud, es decir; este gen presenta tamaños diferentes según este localizado en el cromosoma X o Y (Nakahory *et al.*, 1991). El fragmento génico en el cromosoma X presenta una delección de 6 pares de bases (pb). La ventaja de este sistema consiste en que se obtienen productos de amplificado tanto en los individuos masculinos como en los femeninos. Así en el caso del ADN se han diseñado unos *primers* (Aml1 y Aml2) que amplifican un fragmento de 106 pb de longitud en el cromosoma X, mientras que el fragmento amplificado en el cromosoma Y es de 112 pb (Lassen *et al.*, 1996). El pequeño tamaño de los fragmentos amplificados es una ventaja cuando se trabaja con ADN (Figura 1a).

Extracción de ADN

La extracción del ADN se ha realizado a partir de piezas dentarias intactas. Previamente a la extracción, las piezas dentarias se someten a un proceso de limpieza mediante ácidos para eliminar posibles ADN contaminantes adheridos a la super-

ficie del diente (Ginther et al., 1992). A continuación se corta la raíz y se incuba toda la noche a 37°C, con agitación, en un volumen suficiente como para cubrir toda la raíz con el buffer de lisis (0,5 M EDTA pH 8,0-8,5, 0,5% SDS; 50 mM Tris-HCl pH 8,0 y 0,01 mg/ml Proteinasa K). A continuación la mezcla se somete a un proceso estándar de extracción con fenol y otro con cloroformo. El ADN recuperado se concentra y purifica utilizando concentradores Centricon-30.

Amplificación vía PCR del fragmento del gen de la amelogenina

Se han realizado un promedio de 6 amplificaciones diferentes del mismo individuo. La amplificación se ha llevado a cabo mediante la técnica de Hot Start en un volumen final de 15µl, que contiene: 10 mM Tris-HCl pH 8,3; 50 mM KCl; 2 mM MgCl₂; 175µM dNTP; 0,1 mg/ml BSA; 1,25 unidades de Taq DNA polimerasa; 0,4µM de cada *primer* (Aml1: 5'-CCC TGG GCT CTG TAA AGA ATA GTG-3' y Aml2: 5'-ATC AGA GCT TAA ACT GGG AAG CTG-3') y aproximadamente 10µl del extracto de ADN diluido. La amplificación se ha realizado en un termociclador con las siguientes condiciones: un ciclo inicial a 94°C (5 min), seguido de 60 ciclos a 94°C (15 seg), 45°C (5 seg) y 72°C (10 seg), finalmente un ciclo a 72°C (5 min).

Amplificación vía PCR del fragmento de la secuencia alfoide del cromosoma Y

Se han realizado un promedio de 4 amplificaciones diferentes del mismo individuo. La amplificación se lleva a cabo en un volumen final de 50µl, que contiene: 10 mM Tris-HCl pH 8,3; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 175µM dNTP; 0,1 mg/ml BSA; 1,25 unidades de Taq DNA polimerasa; 0,4µM de cada *primer* (JR25: 5'-TCC ACT TTA TTC CAG GCC TGT CC-3' y JR26: 5'-TTG AAT GGA ATG GGA ACG AAT-3') y aproximadamente 10µl del extracto de ADN diluido. La amplificación se realiza en un termociclador con las siguientes condiciones: un ciclo inicial a 94°C (5 min), seguido de 32 ciclos a 94°C (30 seg), 65°C (30 seg) y 72°C (30 seg), finalmente un ciclo a 72°C (5 min).

Tipaje de los amplificadores

El tamaño del amplificado se verifica analizando diez microlitros del amplificado mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida del 12% y tinción con plata (Figura 1).

Precauciones

Para cada conjunto de muestras extraídas se incluye: *un control de la extracción*, consistente en una reacción que se somete a todo el proceso de la extracción, pero a la que no se le añade muestra ósea, y un *control negativo de la amplificación*, es

decir, una reacción a la que se le añaden todos los reactivos para la amplificación, excepto el ADN problema.

En el campo del ADN antiguo, para obtener resultados fiables, es imprescindible realizar un análisis experimental serio y riguroso. Las diferentes fases del trabajo se han realizado en laboratorios físicamente separados. La extracción y preparación de las reacciones de amplificación, se han llevado a cabo en un laboratorio exclusivamente dedicado al trabajo con ADN antiguo, libre de ADN genómico actual. Las superficies de trabajo y material, se lavan frecuentemente con hipoclorito sódico y se irradian con luz UV. Todo el material, tanto material plástico desechable y como reactivos, se compran estériles y, asimismo, se esterilizan mediante luz U.V.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Amplificación y tipaje del sexo

Con este trabajo deseamos en *primer* lugar, evaluar la aplicabilidad de las técnicas de análisis del ADN para la estimación del sexo de restos esqueléticos. Para ello, se ha seleccionado un conjunto de muestras de sexo conocido de diversa antigüedad. En estas muestras, se ha podido comprobar que los resultados obtenidos con las técnicas moleculares coinciden con el sexo de las muestras, lo que garantiza *a priori* la fiabilidad intrínseca de la técnica.

Una vez comprobada la eficacia de las técnicas moleculares (análisis del gen de la amelogenina y de un pequeño fragmento de la secuencia alfoide del cromosoma Y), se ha procedido a la estimación del sexo en restos esqueléticos recopilados en diversos yacimientos prehistóricos e históricos del País Vasco (Tabla 1).

	Datación	n	R
Aizpea (Nafarroa)	6.600±50 BP	1	100
SJAPL (Araba)	5.070±150 - 5.020±140 BP	22	44
Uratxa (Bizkaia)	3.405±70 - 3.475±80 BP	5	75
Aldaieta (Araba)	s. VI-VII	63	55
Iglesias (Bizkaia)	s. XVIII	5	73
CAER	50 años antigüedad	21	78

n, tamaño muestral

R, rendimiento obtenido durante la amplificación de las muestras CAER, Colección Antropológica de Época Reciente

Tabla 1: Datación, tamaño muestral y eficiencia obtenida en la estimación del sexo en los yacimientos analizados en este trabajo.

Al igual que en otros trabajos (Lindhal, 1993; Handt et al., 1996; Hagelberg & Clegg, 1991; Tuross, 1994), se constata que la antigüedad no es el único factor que contribuye a un menor rendimiento durante la amplificación. Si bien según ciertos autores, existe un límite temporal estimado en unos 100.000 años, en el que independientemente de las condiciones de preservación de las mues-

tras, el daño oxidativo degradaría completamente el ADN (Lindhal, 1993), en nuestro caso, el yacimiento más antiguo no supera los 6.000 años de antigüedad. En esta escala temporal, el mayor o menor grado de preservación o degradación del ADN, depende de procesos hidrolíticos y oxidativos que ocurren una vez muerto el organismo y que provocan la rotura de las cadenas de ADN. Estos procesos presentan una doble dependencia, tanto de la antigüedad de las muestras como de las condiciones ambientales a las que han estado sometidas durante el enterramiento (Doran et al., 1986; Pääbo, 1985). Así, los ambientes húmedos favorecen la depurinización del ADN (y rotura consiguiente); mientras que temperaturas altas de entre 35-40°C y valores de pH cercanos a la neutralidad minimizan la autólisis enzimática, favoreciendo la preservación del ADN.

La determinación del tipaje femenino presenta mayores ambigüedades que el masculino. En el caso del análisis del gen de la amelogenina, la presencia única del alelo más largo (112 pb) permite asignar la muestra al sexo masculino, ya que es exclusivo del cromosoma Y; sin embargo, la presencia de únicamente el alelo más corto (106 pb) puede conducirnos erróneamente a considerar como mujer una muestra perteneciente a un hombre, en el que no haya sido posible amplificar el alelo más largo, por diversas razones (ADN degradado, fallo durante la amplificación, etc.,...). En el caso del fragmento alfoide específico del cromosoma Y hemos considerado que un resultado negativo no necesariamente indica sexo femenino, existe una alta probabilidad, en el caso del ADN antiguo de obtener resultados negativos falsos, debido a la mala preservación del ADN que impide la amplificación de estos fragmentos.

Teniendo en cuenta estas limitaciones técnicas, la asignación del sexo femenino ha requerido la confirmación del resultado mediante múltiples repeticiones de la misma muestra. Algunas muestras no han podido ser tipadas debido al bajo rendimiento obtenido en la amplificación.

En el presente trabajo se pone de manifiesto la aplicabilidad de las técnicas moleculares (análisis de marcadores en los cromosomas X e Y) en la estimación del sexo de restos esqueléticos antiguos de diversa cronología.

Género cultural vs. sexo molecular

Hasta ahora, la estimación del sexo en los trabajos de antropología se ha abordado desde dos perspectivas: una sería el análisis morfométrico de los esqueletos recuperados y otra la asociación con ajuares definidos como masculinos (hacha, cuchillo,...) o femeninos (collares, adornos personales,...). Los análisis morfométricos están limitados a aquellos restos que presentan unas condiciones de preservación óptimas, siendo casi imposible la estimación del sexo de individuos infantiles y juveniles y de los restos fragmentados.

El “género cultural” puede ayudar a estimar el sexo cuando la preservación de los restos materiales es buena, sin embargo se ha observado que el “género cultural” y el sexo de los restos recuperados no siempre coincide (Stig Sorensen, 1991); existen factores tales como la cronología, localización geográfica, edad, estatus social,... que pueden incidir en el tipo de ajuar asociado con el material esquelético objeto de estudio. Las técnicas de biología molecular nos ofrecen la oportunidad de estimar el sexo a partir del ADN recuperado de los restos esqueléticos de modo *objetivo y directo*.

En este trabajo hemos aplicado estas técnicas moleculares para la estimación del sexo de los restos recuperados en la necrópolis de Aldaieta (Araba) y establecer si existe alguna diferencia entre los ajuares que presentan los hombres y las mujeres de este yacimiento. La necrópolis de Aldaieta (Alava, s. VI-VII) (Azkarate, 2000), ha proporcionado cerca de un centenar de tumbas, algunas de las cuales se encuentran asociadas a ajuares clásicamente asociados bien a hombres o a mujeres (hachas, armas defensivas, colgantes, pendientes, joyas, etc).

Se ha llevado a cabo la amplificación del gen de la amelogenina y de una pequeña secuencia repetitiva alfoide del cromosoma Y (DYZ1) en 63 muestras de ADN recuperadas en los restos excavados en la necrópolis de Aldaieta. La estimación del sexo ha sido posible en un 55,5% de las muestras, de éstas el 40% son femeninas y el 60% masculinas.

La asociación de un determinado conjunto de elementos del ajuar, sólo se ha podido realizar en un tercio de los esqueletos de la necrópolis, en aquellos pertenecientes a inhumaciones individuales, en los que se ha podido estimar el sexo (mediante técnicas moleculares) y en los que, a su vez, se ha podido establecer una asociación clara con los elementos del ajuar. El análisis multivariante (coordenadas principales) de estos datos (elementos del ajuar asociados a los esqueletos masculinos y femeninos individuales) (Figura 2), indica:

1) La existencia en el eje 1 de una evidente diferenciación del ajuar asociado a los hombres y a las mujeres. Los ajuares femeninos son sencillos cuantitativa y cualitativamente (cerámica, dientes de ganado, clavos y sílex), frente a los masculinos (anillos, sortijas, cinturón, cuentas de collar; cuenco de bronce, vasito de vidrio, lanza, hacha, scramasax, tachuelas y clavos), más complejos.

2) En el eje 2 se observa variabilidad en la composición de los ajuares masculinos, que podría relacionarse con la edad, rango social,... Objeto de futuros análisis.

En este trabajo hemos demostrado que la aplicación de técnicas de biología molecular es de gran ayuda a la hora de responder a cuestiones, que tanto los arqueólogos como los antro-

pólogos, han venido proponiendo largamente. En el caso del yacimiento de Aldaieta, podemos observar, que las mujeres apenas presentan ajuar, mientras que todo el material cultural pertenece a los hombres. En el futuro, queda de investigar a que causas (edad, rango social,...) se debe la variabilidad observada en el ajuar de los hombres.

4. AGRADECIMIENTOS

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a las subvenciones recibidas de la U.P.V./ E.H.U. 00154.310-EA-8130/2000 y al MCYT (BOS2000-0408). Agradecemos a los directores de los yacimientos de San Juan ante Portam Latinam (Jose Ignacio Vegas), Longar (Javier Armendariz) y Aldaieta (Agustin Azkarate) por habernos confiado el estudio antropológico de estos yacimientos.

5. BIBLIOGRAFÍA

- AZKARATE A. (2000) Memorias de yacimientos alaveses. Necrópolis tardoantigua de Aldaieta. Volumen I. Memoria de la excavación e inventario de los hallazgos (Nanclares de Gamboa, Alava). Diputación Foral de Alava
- COOPER A. (1994) DNA from museum specimens. In *Ancient DNA. Recovery and Analysis of Genetic Material from Paleontological, Archaeological, Museum, Medical, and Forensic Specimen*. Herrmann B., Hummel S. (eds) New York: Springer-Verlag, pp. 149-165
- DORAN G.H., DICKEL D.N., BALLINGER W.E.JR., AGEE O.F., LAIPIS P.J., HAUSWIRTH W.W. (1986) Anatomical, cellular and molecular analysis of 8,000-year old human brain tissue from the Windover archaeological site. *Nature*, 323: 803-806
- GINIHER C., ISSEL-TARVER L., KING M.C. (1992) Identifying individuals by sequencing mitochondrial DNA from teeth. *Nature Genetics*, 2: 135-138
- HAGELBERG E. & CLEGG J.B. (1991) Isolation and characterization of DNA from archaeological bone. *Proc. R. Soc. London B*, 244: 45-50
- HALSALL G. (1995). *Settlement and social organization: the Merovingian region of Metz*. Cambridge: Cambridge University Press
- HANDT O., KRINGS M., WARD R.H., PÄÄBO S. (1996). The retrieval of ancient human DNA sequences. *Am. J. Hum. Genet.*, 59: 368-376
- HUMMEL S. & HERRMANN B. (1991) Y-chromosome-specific DNA amplified in ancient human bone. *Naturwissenschaften*, 78: 266-267
- IZAGIRRE N., DURAN L.M., DE LA RÚA C. (1998) Genética y Arqueología: análisis molecular de ADN procedente de restos esqueléticos. *Munibe (Antropología-Arkeología)*, 50: 3-14
- LASSEN C., HUMMEL S., HERRMANN B. (1996) PCR based sex identification of ancient human bones by amplification of X- and Y-chromosomal sequences: a comparison. *Ancient Biomolecules*, 1: 25-33
- LINDAHL T. (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, 362: 709-715
- NAKAHORY Y., MITANI K., YAMADA M., NAKAGONE Y. (1986) A human Y-chromosome specific repeated DNA family (DYZ1) consist of a tandem array of pentanucleotides. *Nucl. Acids Res.*, 14: 7569-7580
- PÄÄBO S., GIFFORD J., WILSON A.C. (1988) Mitochondrial DNA sequences from a 7000-year old brain. *Nucl. Acids Res.*, 16: 9775-9787
- STIG SORESENSEN M.L. (1991). The construction of gender through appearance. In Walde & Willows (Eds.): 121-129
- TUROSS N. (1994) The biochemistry of ancient DNA in bone. *Experientia*, 50: 530-535
- VERNESI C., CARAMELLI D., CARBONELLI SALA S., UBALDI M., ROLLO F., CHIARELLI B. (1999). Application of DNA sex tests to bone specimens from three Etruscan (VII-VI Century B.C.) archaeological sites. *Ancient Biomolecules*, 2: 2985-305

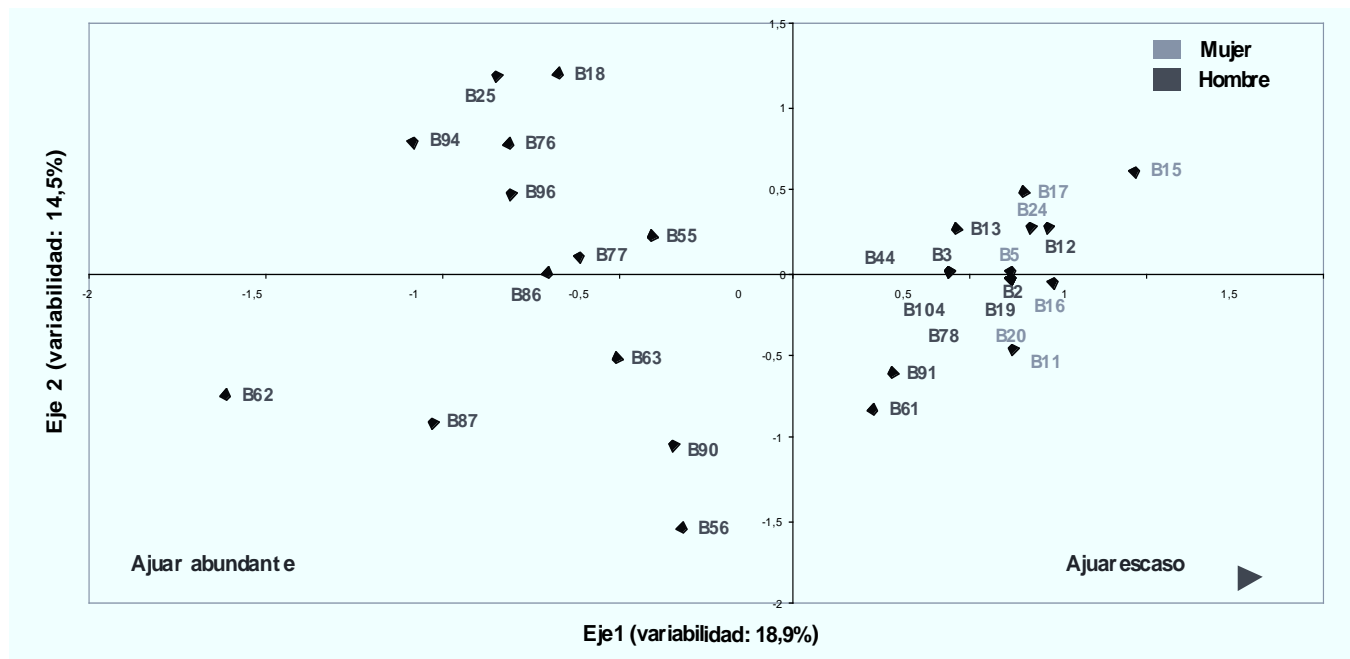


Figura 2: Análisis de coordenadas principales de los elementos del ajuar asociados a los esqueletos masculinos y femeninos de la necrópolis de Aldaieta (Alava, s. VI-VII).