

Análisis de ADNmt en restos humanos antiguos

(Analysis of DNAmT in ancient human remains)

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

El estudio de la distribución de los haplogrupos del ADN mitocondrial en restos esqueléticos antiguos, nos ofrece información adicional en un contexto temporal que puede ayudar a esclarecer la historia evolutiva humana. El análisis multivariante de los resultados obtenidos en las muestras antiguas y las poblaciones actuales, sigue indicando la existencia de una diferenciación geográfica de las poblaciones en el eje este-oeste (eje 1). Asimismo, también se observa una diferenciación de las poblaciones en el tiempo (eje 2). La interpretación filogenética de estos resultados requiere el análisis de las secuencias de los haplogrupos.

Palabras Clave: ADN antiguo. RFLP ADN mitocondrial. Variabilidad genética.

Antzinako hezur-aztarnetako ADN mitokondrialaren haplotaldeen banaketa aztertzeak informazio gehigarria ematen digu, gizakien eboluzioaren historia argitzean laguntzen ahal duen denbora-tinguinguru batean. Antzinako laginetan lorturiko emaitzen eta gaurko populazioen aldaera antzeko azterketak aditzera ematen duenez, populazioen desberdintze geografikoak iraun egin du ekialde-mendebalde ardatzari dagokionez (1 ardatza). Era berean, denboran ere (2 ardatza) populazioen desberdintzea atzematen da. Emaitza horien interpretazio filogenetikoak haplotaldeen sekuentzien azterketa eskatzen du.

Giltza-Hitzak: Antzinako ADN. RFLP ADN mitokondrial. Aldakortasun genetikoa.

L'étude de la distribution des haplogroupes de l'ADN mitochondrique sur des restes de squelettes anciens, nous offre une information supplémentaire dans un contexte temporaire qui peut aider à élucider l'histoire évolutive humaine. L'analyse multivariante des résultats obtenus sur les échantillons anciens et sur les populations actuelles, continue d'indiquer l'existence d'une différenciation géographique des populations dans l'axe est-ouest (axe 1). Ainsi, on observe également une différenciation des populations dans le temps (axe 2). L'interprétation phylogénétique de ces résultats requiert l'analyse des séquences des haplogroupes.

Mots Clés: ADN ancien. RFLP ADN mitochondrique. Variabilité génétique.

1. INTRODUCCIÓN

La historia evolutiva humana se puede tratar de inferir a partir del análisis de la variabilidad genética detectada en las poblaciones actuales. Los avances metodológicos en la tecnología del ADN han hecho posible estudiar directamente la variabilidad genética de los grupos humanos prehistóricos, lo que permite un acercamiento más verosímil a la historia evolutiva de las poblaciones.

Sin embargo, el análisis del ADN de restos prehistóricos presenta una serie de limitaciones debido principalmente a la mala preservación del ADN en tejido esquelético. El ADN antiguo (ADNa) se encuentra fragmentado en unos 200 pares de bases (pb) de longitud aproximadamente, lo cual obliga a analizar fragmentos de ADN inferiores a este tamaño. Además, la cantidad de ADN recuperado es muy baja, lo que dificulta, por ejemplo, el análisis de ADN nuclear. Sin embargo, el alto número de copias de genomas mitocondriales por célula, facilita su supervivencia y recuperación. Por otro lado, las bases de los nucleótidos del ADNa se encuentran modificadas, lo que puede provocar la obtención de resultados ambiguos.

Teniendo en cuenta dichas limitaciones y el número de datos comparativos en poblaciones actuales, nuestro trabajo se ha centrado en el análisis de la variabilidad del ADNmt mediante la técnica de los RFLPs en diversas colecciones esqueléticas de procedencia arqueológica que abarcan una amplia región del País Vasco.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

En este trabajo se ha analizado mediante la técnica de RFLPs el ADN recuperado en restos dentarios correspondientes a 183 individuos exhumados en 4 yacimientos del País Vasco, cuya cronología abarca el periodo comprendido entre el Neolítico y la historia antigua. A continuación se describe la metodología empleada. Esta metodología se encuentra en Izagirre & de la Rúa (1997, 1999) más detalladamente.

Extracción de ADN

A fin de eliminar la contaminación superficial, las piezas dentarias se han sometido a un proceso de depurinización mediante ácidos, e irradiación con luz UV por toda su superficie (Ginther et al., 1992).

Tras cortar la raíz del diente, ésta se ha incubado toda la noche a 37°C, con agitación, en un volumen suficiente como para cubrir toda la raíz (5 ml) en tampón 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 Protei-

nasa K), procediéndose seguidamente a una extracción con fenol-cloroformo y cloroformo. El extracto de ADN se purifica y concentra hasta 300 µl en un Centricon-30 (Amicon).

Estos extractos de ADN se utilizan en la amplificación y tipaje de 11 marcadores, necesarios para definir los 10 haplogrupos descritos en caucasoides por Macaulay et al. (1999). En la Tabla 1 se muestra el patrón de ausencia/presencia de corte que presenta cada haplogrupo para estos 11 marcadores analizados.

	MseI	DdeI	AluI	NlaIII	NlaIII	HaeII	HinI	DdeI	AluI	AccI	HaeIII
	14766	10394	7025	4577	4216	9052	12308	1715	10032	14465	8994
H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
HV	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
T	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
J	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
U	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
K	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
W	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 1: Patrón de ausencia/presencia de restricción que presentan los marcadores analizados en este trabajo para definir los 10 haplogrupos descritos en caucasoides.

Tipaje del ADNmt

En la Tabla 2 se muestra el tamaño (pb) del amplificado, el tamaño de los fragmentos de restricción (pb) y la temperatura de anillamiento de los fragmentos analizados para la identificación del haplogrupo mitocondrial europeo al que pertenecen los individuos; asimismo indicando, además, si es necesario realizar Hot Start (HS) durante la amplificación de las muestras.

La fase de extracción y amplificación de las muestras se realiza en un laboratorio independiente, libre de ADN moderno. Durante esta fase, se han llevado a cabo sendos controles que permitirán poner de manifiesto posibles contaminaciones ocurridas durante la manipulación de las muestras en el laboratorio. En la primera fase, un *Blanco de Extracción* (B_E), consistente en una muestra que se somete a todo el proceso de extracción, pero a la que no se le ha añadido muestra dentaria. Y en la segunda fase, un *Control Negativo de la Amplificación* [control (-)], al que no se le ha añadido ADN problema.

La amplificación se lleva a cabo en una mezcla de reacción con un volumen final de 50µl (10mM Tris-HCl pH 8.3; 50mM KCl; 2mM MgCl₂; 200µM de cada dNTP; 20 µg BSA; 0,4 µM de cada *primer* [Tabla 2]; 2 U. of *Taq* polimerasa [Perkin Elmer] y 10µl de una dilución 1/15 del extracto de DNA que se somete a 40 ciclos en el termociclador con el siguiente perfil de temperaturas: 94°C 5min 1 ciclo; 94°C 15 s, 51-65°C (dependiendo de los *primers* empleados, Tabla 2) 5s, 72°C 10s 40 ciclos; un ciclo final de extensión a 72°C durante 5 min.

PRIMER	Tamaño (pb)	Tam. Frag. Rest. (pb)	T° anill.
<u>AccI-14465</u> L	99	65/35	54
H			
<u>MseI-14766</u> L	125	87/38	52
H			
<u>NlaIII-4216</u> L	121	93/36	47
H			
<u>AluI-10032</u> L	133	78/54	46-HS
H			
<u>AluI-7025</u> L	109	68/41	62
H			
<u>DdeI-10394</u> L	131	96/35	57
H			
<u>NlaIII-4577</u> L	120	62/58	64
H			
<u>HaeIII-8994</u> L	126	88/38	65
H			
<u>HaeII-9052</u> L	120	66/54	51
H			
<u>HinfI-12308</u> L	123	93/30	55
H			
<u>DdeI-1715</u> L	104	78/26	59
H			

Tabla 2: Tamaño de los productos amplificados y de los fragmentos de restricción, y la temperatura de anillamiento. (HS: necesita Hot Start para obtener una eficiencia de amplificación correcta).

Digestión enzimática

Tras comprobar la eficiencia de la amplificación en un gel de poliácridamida y tinción con plata, aquellas muestras cuyos controles de contaminación (blanco de la extracción y control negativo de la amplificación) no presentaban signos de contaminación, se sometieron a digestión enzimática, siguiendo las indicaciones de los proveedores, en cuanto a la cantidad de unidades de enzima empleadas y tiempos y temperatura de incubación.

La ausencia/presencia de las digestiones se ha comprobado en un gel de poliácridamida y tinción con plata.

Análisis estadístico

El análisis comparativo de las muestras analizadas en este trabajo y de los datos publicados,

se ha realizado mediante *Componentes Principales* (SPSS, v.10.0). Ésta es una técnica que nos permite identificar un número relativamente pequeño de factores que pueden ser utilizados para representar la relación existente entre un conjunto de variables intercorrelacionadas. El objetivo consiste en encontrar una serie de componentes que expliquen el máximo de varianza total de las variables originales.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Amplificación y tipaje del ADN antiguo

En este trabajo, la extracción del ADN se ha llevado a cabo a partir de piezas dentarias, ya que se ha comprobado que el ADN procedente de dientes es más apropiado que el del hueso para la amplificación (Izagirre & de la Rúa, 1999; Zierdt et al., 1996). El análisis electroforético de los extractos de ADN en geles de agarosa, indica que el tamaño del ADN recuperado es menor de 500 pb de longitud.

Tan sólo se han analizado aquellas muestras que presentaban todos los controles, blanco de la extracción y control negativo de la amplificación, negativos (ausencia de ADN contaminante detectable). De este modo, se han podido tipar con éxito el 94% de las muestras (173 de un total de 183).

Diversidad mitocondrial en los grupos humanos antiguos del País Vasco

En la Tabla 3 se describe la distribución de los haplogrupos característicos de caucasoides hallada en los yacimientos vascos estudiados en este trabajo.

La distribución de los haplogrupos H, K y U es similar en los yacimientos vascos analizados, presentando el haplogrupo H la frecuencia más alta en todos los enclaves. Asimismo, es de destacar que en ninguno de los yacimientos prehistóricos se han encontrado los haplogrupos I, W y V. Sin embargo, en la necrópolis tardoantigua de Aldaieta, aunque con una frecuencia baja (2%), se han encontrado sendos individuos que se han clasificado como pertenecientes al haplogrupo V e I. Los yacimientos de SJAPL (Araba) y Aldaieta (Araba), presentan una frecuencia del haplogrupo [T, X] significativamente menor (<5%) que la descrita en los yacimientos de Pico Ramos (Bizkaia) y Longar (Nafarroa) (16,7% y 14,8%, respectivamente). Algunos haplogrupos son raros en Europa, su ausencia/presencia en una determinada muestra puede estar sujeto a efectos estocásticos debido a un pequeño tamaño poblacional. En el caso de muestras poblacionales antiguas, nos tenemos que atener al tipo y tamaño de muestra que se ha conservado hasta nuestros días, sin posibilidad de poder aumentar el tamaño poblacional si las condiciones lo requiriesen.

	<i>Yacimientos</i>			
	<i>SJAPL</i> n=61	<i>Longar</i> n=27	<i>Pico Ramos</i> n=24	<i>Aldaieta</i> n=55
Haplogrupo	Frecuencia ± se	Frecuencia ± se	Frecuencia ± se	Frecuencia ± se
H	0,377 ± 0,060	0,408 ± 0,094	0,374 ± 0,091	0,564 ± 0,067
I	-	-	-	0,018 ± 0,018
J	0,164 ± 0,047	-	0,167 ± 0,070	0,164 ± 0,049
K	0,230 ± 0,054	0,222 ± 0,080	0,167 ± 0,070	-
T, X	0,049 ± 0,027	0,148 ± 0,070	0,167 ± 0,070	0,036 ± 0,025
U	0,180 ± 0,049	0,148 ± 0,068	0,125 ± 0,062	0,127 ± 0,045
V	-	-	-	0,018 ± 0,018
W	-	-	-	-
Otros	-	0,074 ± 0,050	-	0,073 ± 0,035
No Determinados	2	2	-	7

Tabla 3: Distribución de los haplogrupos en los cuatro yacimientos prehistóricos e históricos analizados en este trabajo.

Richards et al. (1996, 1998), han observado que la mayor parte de la variabilidad mitocondrial actual europea (~85%) tiene su origen en el Paleolítico Superior (20.000-50.000 años) (haplogrupos H, V, K, X, I e U), y que el resto de haplogrupos (~15%) (haplogrupo J) se introdujeron en Europa en tiempos más recientes desde el Próximo Oriente con la primera ola migratoria de los agricultores neolíticos. Respecto a la distribución del haplogrupo J en los yacimientos analizados en este trabajo, se observa lo siguiente: 1)- en el yacimiento de Longar (Nafarroa) no se ha tipado ningún individuo perteneciente a este haplogrupo y 2)- el resto de los enclaves muestran una distribución similar del mismo (Tabla 3) (~16%).

Según Richards et al., (1996, 1998), el haplogrupo J se habría introducido en Europa desde Próximo Oriente hace unos 10.000 años, siguiendo la expansión del neolítico. Este haplogrupo presenta en toda Europa una frecuencia >11%. Sin embargo, en aquellas poblaciones en las que el mestizaje con los agricultores neolíticos hubiera sido menor, como en el caso de los vascos (Cavalli-Sforza et al., 1994), cabría esperar, que la frecuencia de este haplogrupo fuera más baja (Richards et al., 1996). Una muestra de vascos actuales presenta una frecuencia del 2% para este haplogrupo (Torroni et al., 1996). Sin embargo, en dos de los yacimientos prehistóricos (SJAPL y Pico Ramos), así como en la necrópolis de Aldaieta se ha encontrado una frecuencia relativamente alta de este haplogrupo (16%, Tabla 3), mientras que en el yacimiento de Longar no se ha detectado. Estos datos sobre el haplogrupo J suponen que tanto los pobladores de Pico Ramos (en la vertiente atlántica del País Vasco) como los de SJAPL (en la vertiente mediterránea), tuvieron contacto con los grupos neolíticos portadores de la mutación que define este haplogrupo. Nuevamente, el yacimiento de Longar presenta un comportamiento diferencial respecto a los otros dos enclaves prehistóricos.

Asimismo, el origen y distribución del haplogrupo V tampoco guarda relación con la expansión del hombre anatómicamente moderno en Europa.

Torroni et al. (1998) han propuesto que este haplogrupo probablemente se originó en alguna población del sudoeste Europeo (norte de la Península Ibérica o sudoeste de Francia) hace ~10.000-15.000 años, desde donde migraría hacia Europa del norte y central durante el Último Glacial. Una discusión más detallada de la posible expansión de este haplogrupo se encuentra en Izagirre & de la Rúa (1999).

También hay que destacar en los yacimientos de Longar y Aldaieta una frecuencia aproximadamente del 7% de individuos que no presentan un patrón de sustituciones específicas de ninguno de los haplogrupos descritos hasta el momento en caucasoídes, y que por tanto se han clasificado como pertenecientes al haplogrupo "otros". Dada la variabilidad del patrón de sustitución existente en estos individuos clasificados como "otros", no parece que puedan estar relacionados filogenéticamente entre ellos, lo más probable es que sean linajes derivados de haplogrupos ya existentes.

Distribución de los haplogrupos mitocondriales en muestras antiguas y eurasiáticas modernas

Hemos llevado a cabo un análisis multivariante de la distribución de los haplogrupos obtenidos en las muestras antiguas analizadas en nuestro laboratorio, y muestras actuales de europeos y asiáticos, recopilados de la literatura. Richards et al. (2000) han recopilado en este trabajo, la secuencia de la región control y los motivos de la región codificante publicados hasta el momento en europeos y asiáticos. Hemos considerado únicamente la distribución de los haplogrupos mitocondriales, de tal forma que coincidieran con los haplogrupos que hemos definido en las muestras antiguas (H, HV, I, J, K, TX, U, V, W, Otros).

En la Figura 1 se muestran el primer y segundo ejes del análisis de componentes principales. Se han representado tanto las poblaciones como los haplogrupos, de modo que se ve claramente la contribución de cada haplogrupo en los dos ejes. El primer eje (30,9%) presenta un claro gradiente este-oeste, donde las poblaciones europeas se encuentran separadas de las del Próximo Oriente.

El segundo eje (21%) parece indicar una separación temporal; por un lado se agrupan las poblaciones prehistóricas (SJAPL, Longar y Pico Ramos) y por el otro, las poblaciones actuales e históricas.

El haplogrupo más implicado en la diferenciación del primer eje es el H, el cual presenta la máxima frecuencia en vascos y la mínima en las poblaciones asiáticas y la del caucaso. El origen de este gradiente este-oeste podría ser debido bien a la expansión demica neolítica, hipótesis propuesta por Cavalli-Sforza et al. (1994), en base a la distribución clinal hallada en los polimorfismos clásicos; o bien, a la expansión paleolítica del hombre moderno hacia Europa. Esta propuesta es la

que han sugerido Richards et al. (1998) en base a los datos del ADNmt.

El haplogrupo que marca la diferencia en el segundo eje es el K, el cual presenta una frecuencia en torno al 15% en las poblaciones prehistóricas, mientras que su frecuencia en muestras europeas actuales oscila entre el 1 y el 5%.

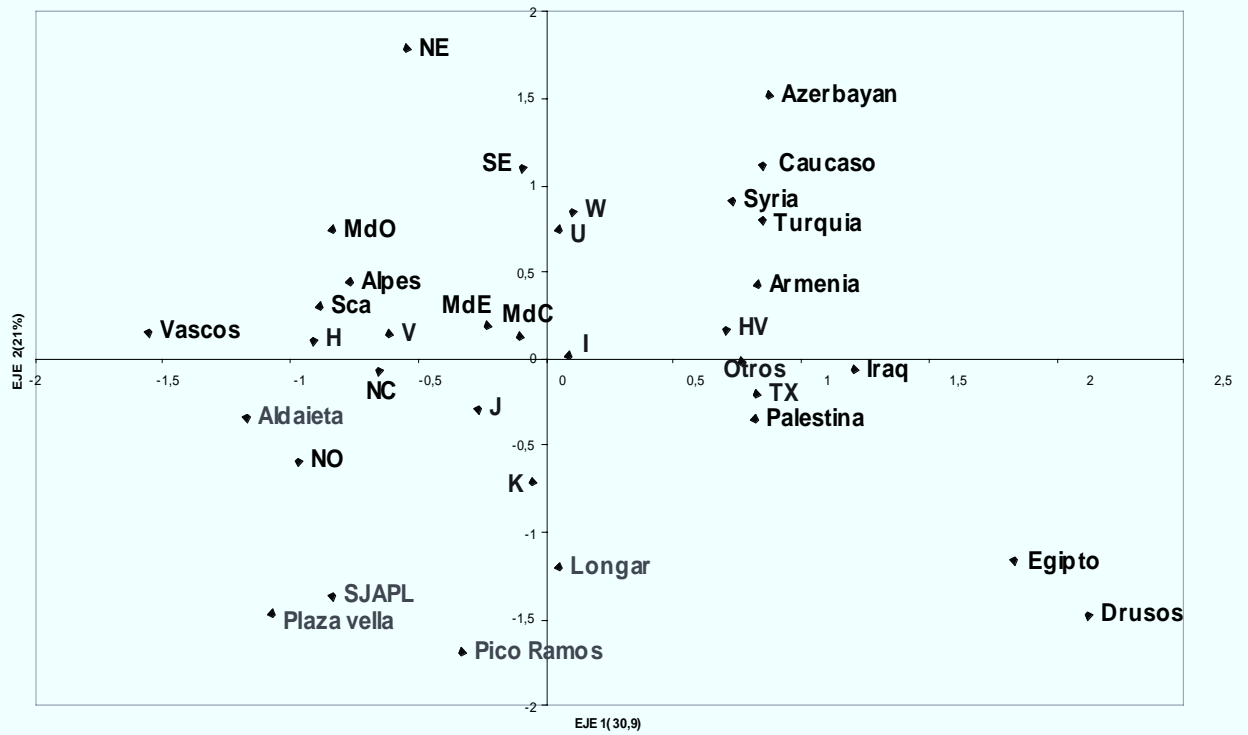
Sin embargo, estos resultados no pueden ser interpretados en términos filogenéticos hasta que no analicemos la variabilidad que existe dentro de los haplogrupos, mediante la secuenciación de un fragmento de ~400 pb de longitud de la región control (no codificante) del ADNmt. Actualmente, estamos trabajando en la secuenciación de este fragmento de 400 pb en muestras antiguas, en breve dispondremos de más datos que ayuden a clarificar este panorama.

AGRADECIMIENTOS

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a las subvenciones recibidas de la U.P.V./ E.H.U. 00154.310-EA8130/2000 y al MCYT (BOS2000-0408). Agradecemos a los directores de los yacimientos de San Juan ante Portam Latinam (Jose Ignacio Vegas), Longar (Javier Armendariz), Aldaieta (Agustín Azkarate) y Pico Ramos (Lydia Zapata) por habernos confiado el estudio antropológico de estos yacimientos.

4. BIBLIOGRAFÍA

- CAVALLI-SFORZA L.L. & EDWARDS A.W.F. (1967) Phylogenetic analysis - models and estimation procedure. *Am. J. Hum. Genet.*, 19: 233-257
- CAVALLI-SFORZA L.L., MENOZZI P., PIAZZA A. (1994). *The history and geography of human genes*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey
- GINIHER C., ISSEL-TARVER L., KING MC (1992) Identifying individuals by sequencing mitochondrial DNA from teeth. *Nature Genetics*, 2: 135-138
- IZAGIRRE N. & DE LA RUA C. (1999). An mtDNA analysis in ancient Basque populations: implications for haplogroup V as a marker for a major Paleolithic expansion from southwestern Europe. *Am. J. Hum. Genet.*, 65: 199-207
- IZAGIRRE N., DURAN L.M., DE LA RUA C. (1998). Genética y arqueología: análisis molecular de ADN procedente de restos esqueléticos. *Munibe (Antropol-Arkeol)*, 50: 3-14
- MACAULAY V.A.; RICHARDS M.B.; HICKEY E.; VEGA E., CRUCIANI F.; GUIDA V.; SCOZZARI R.; BONNÉ-TAMIR B.; SYKES B.; TORRONI A. (1999). The emerging tree of west Eurasia mtDNAs: a synthesis of control-region sequences and RFLPs. *Am. J. Hum. Genet.*, 64: 232-249.
- MONTELL R. (2000). *Estudio diacrónico de la variabilidad del DNA mitocondrial en población catalana*. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona.
- MORELLI L., GROSSO M.G., VONA G., VARESI L., TORRONI A., FRANCALACCI P. (2000). Frequency distribution of mitochondrial DNA haplogroups in Corsica and Sardinia. *Human Biology*, 72: 585-595
- PEREIRA L., PRATA M.J., JOBLING M.A., AMORIM A. (2000). Analysis of the Y-chromosome and mitochondrial DNA pools in Portugal. In *Archaeogenetics: DNA and the population prehistory of Europe*, C. renfrew & K. Boyle (Eds.). McDonald Institute Monographs, pp. 191-196
- REYNOLDS J.B.; WEIR B.S.; COCKERHAM C.C. (1983). Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics*, 105: 767-779
- RICHARDS M., CÔRTE-REAL H., FORSTER P., MACAULAY V., WILKINSON-HERBOTS H., DEMAINE A., PAPIHA S., HEDGES R., BANDELT H.-J., SYKES B. (1996). Paleolithic and Neolithic lineages in the European mitochondrial gene pool. *Am. J. Hum. Genet.*, 59: 185-203
- RICHARDS M.B.; MACAULAY V.A.; BANDELT H.-J.; SYKES B. (1998) Phylogeography of mitochondrial DNA in western Europe. *Ann. Hum. Genet.*, 62: 241-260
- RICHARDS M., MACAULAY V., HICKEY E., VEGA E., SYKES B., GUIDA V., RENGÓ C., SELLITO D., CRUCIANI F., KIVISILD T., VILLEMS R., THOMAS M., RYCHKOV S., RYCHKOV O., RYCHKOV Y., GÖLGE M., DIMITROV D., HILL E., BRADLEY D., ROMANO V., CALÌ F., VONA G., DEMAINE A., PAPIHA S., TRIANTAPHYLIDIS C., STEFANESCU G., HAITINA J., BELLEDI M., DI RIENZO A., NOVELLETO A., OPPENHEIM A., NORBY S., AL-ZAHERI N., SANTACHIARA-BENERECETTI S., SCOZZARI R., TORRONI A., BANDELT H.-J. (2000). Tracing European founder lineages in the Near eastern mtDNA pool. *Am. J. Hum. Genet.*, 67: 1251-1276
- TORRONI A., BANDELT H.-J., D'URBANO L., LAHERMO P., MORAL P., SELLITO D., RENGÓ C., FORSTER P., SAVONTAUS M.-L., BONNE-TAMIR B., SCOZZARI R. (1998). MtDNA analysis reveals a major late Paleolithic population expansion from southwestern to northeastern Europe. *Am. J. Hum. Genet.*, 62:1137-1152
- TORRONI A., HUOPONEN K., FRANCALACCI P., PETROZZI M., MORELLI L., SCOZZARI R., OBINU D., SAVONTAUS M.-L., WALLACE D.C. (1996). Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations. *Genetics*, 144: 1835-1850
- ZIERDT H., HUMMEL S., HERRMANN B. (1996). Amplification of human short tandem repeats from medieval teeth and bone samples. *Hum. Biol.*, 68 (2): 185-199



MdE: Mediterráneo este	Sca: Escandinavia	NE: Noreste de Europa
MdC: Mediterráneo centro	NO: Noroeste de Europa	SE: Sudeste de Europa
MdO: Mediterráneo oeste	NC: Centro-Norte de Europa	(Richards et al., 2000)

Figura 1: Análisis de Componentes Principales de la distribución de los haplogrupos de la región codificante del ADNmt en las poblaciones antiguas estudiadas por nosotros y las poblaciones actuales tomadas de la literatura (Ricards et al., 2000). En el tráfico se han señalado tanto las poblaciones como los haplogrupos implicados en esta distribución. En rojo aparecen las poblaciones históricas y prehistóricas, en azul los haplogrupos.