

# MARCO TEÓRICO

---

## Propiedades del DNA mitocondrial

El DNA mitocondrial presenta ciertas características que lo hacen especialmente útil para estudios de evolución molecular, como la completa caracterización de su genoma, el alto número de copias que posee cada individuo, la transmisión por línea materna, su tasa rápida de evolución, la presencia de numerosos polimorfismos, e incluso la inserción ancestral de fragmentos de mtDNA en el genoma nuclear.

### **Organización genómica**

El mtDNA es tal vez el genoma eucariótico mejor caracterizado, ya que se conoce la estructura y secuencia completa de sus genes tanto en humanos como en muchos otros organismos. Inicialmente, el conocimiento de la secuencia completa hizo posible la construcción detallada de mapas de sitios de restricción y posteriormente, mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se hizo posible el análisis a nivel de secuencia en estudios poblacionales, ya que esta técnica permite la obtención de múltiples copias de cualquier segmento de DNA siempre y cuando se conozcan las secuencias de nucleótidos entre las cuales se encuentra (Mullis y Faloona, 1987). Así, el conocimiento de la secuencia completa del mtDNA significa que el PCR puede ser usado para amplificar cualquier segmento de su genoma, lo que permite realizar estudios a gran escala con fines filogenéticos y/o médicos.

El DNA mitocondrial humano es un genoma circular de aproximadamente 16.500 pares de bases de longitud y muestra una organización extremadamente compacta para su tamaño. Cerca del 90% del genoma consiste de regiones codificantes, comprendiendo genes para 13 proteínas, dos RNAs ribosomales y 22 RNAs de transferencia. El genoma restante consiste de una región mayor no codificante y varios segmentos pequeños no codificantes que se encuentran distribuidos entre los genes (Anderson et al. 1981). El hecho de que en estos segmentos no esté codificada ninguna proteína, es relevante en el sentido de que no están sujetos a una gran presión selectiva, así que los cambios producidos por mutaciones al azar son acumulados principalmente por procesos estocásticos, convirtiendo estos segmentos en hipervariables en comparación con aquellos que si codifican para alguna proteína. Esta característica es de particular importancia en estudios filogenéticos, pues al comparar grupos de individuos, aumenta la probabilidad de encontrar diferencias entre ellos y estas diferencias son la base para

---

establecer sus relaciones. Así mismo, las secuencias hipervariables permiten utilizar sus cambios evolutivos como reloj biológico para fechar eventos ocurridos en tiempos relativamente recientes.

La región mayor no codificante comprende aproximadamente 1100 pb y es también conocida como la región de control, ya que contiene el origen de la replicación de la cadena pesada (H), los promotores de las dos cadenas y el rizo de desplazamiento o D-loop (Wallace, 1994). El D-loop, conocido así por la abreviatura en inglés de “displacement loop”, es una zona que adquiere la conformación de triple cadena en un estadio del mtDNA a partir del cual se inicia la replicación de la cadena pesada; el rizo se va abriendo o desplazando a medida que se sintetiza la nueva cadena complementaria (Clayton, 1982). No obstante, parece ser que la función principal del D-loop no está relacionada con la replicación del mtDNA, sino con la de proveer a la molécula de un sitio de asociación con alguna proteína (Fisher et al. 1992), o bien, puede ser que su función sea la de exponer porciones únicas de la cadena pesada para procesos tales como la transcripción (Clayton, 1982). Por otra parte, dentro de la región de control, se encuentran dos segmentos hipervariables, denominados segmentos hipervariables I y II (siendo la abreviatura en inglés HVS-I y HVS-II). Existe una mayor variabilidad en el HVS-I que en el HVS-II (Wakeley, 1993), por lo tanto ha sido el más usado en estudios de poblaciones humanas y del que se tiene una mayor información (Handt et al. 1998).

### **Elevado número de copias**

De acuerdo con Newman y col. (1996), las observaciones *in situ* del mtDNA en una gran variedad de organismos, han revelado que el mtDNA está altamente organizado dentro del organelo, mostrando fibras agrupadas en las que se observan de dos a seis centros diferenciados llamados nucleoides. Estos nucleoides están constituidos por DNA y proteínas de unión (binding proteins), que tienen la capacidad de cambiar la conformación del DNA. Cada mitocondria posee varias de estas estructuras y en cada célula existe un gran número de mitocondrias, por lo tanto, una célula somática normal puede poseer miles de copias de mtDNA (Clayton, 1982; Shuster et al. 1988). Esta propiedad hace que sea mucho más fácil obtener mtDNA que obtener DNA nuclear, particularmente si se analizan restos antiguos (Pääbo, 1989; Stoneking, 1993).

---

## Transmisión por línea materna

Una de las conveniencias de utilizar el DNA mitocondrial como herramienta para la reconstrucción filogenética de poblaciones humanas surge del hecho de que sea heredado únicamente por vía materna. Esta característica implica que las filogenias del mtDNA reflejarán directamente las genealogías maternas de los individuos estudiados (Stoneking, 1993). Sin embargo, aunque en un principio fue ampliamente aceptada la heredabilidad exclusivamente materna del DNA mitocondrial, más recientemente se han establecido algunas dudas.

Inicialmente, fue el grupo de D.C. Wallace, el que mediante un estudio de 3 familias, analizando polimorfismos de sitios de restricción demostró que la herencia del mtDNA se realizaba por vía materna, aunque no se propuso ningún mecanismo para explicar este hecho (Giles et al. 1980). Según Spuhler (1988), aunque el espermatozoide puede contener miles de mitocondrias en la cola, usualmente esta estructura no entra en el huevo fertilizado y si algunas mitocondrias paternas consiguen entrar, parece ser que muy pocas o ninguna, sobreviven a la primera división celular. Asimismo, Kaneda y col. (1995), basándose en los resultados que han obtenido en sus investigaciones con ratones, proponen que el citoplasma del oocito posee un mecanismo que reconoce y elimina las mitocondrias del espermatozoide y su DNA. No obstante, Ankel-Simons y Cummins (1996) opinan que se debe ser cauteloso al extrapolar estos datos a humanos, ya que hay ciertas diferencias entre ratones y humanos en los patrones de la herencia citoplasmática (por ejemplo el centrosoma, que en ratones se hereda por vía materna, en humanos como en muchos vertebrados es heredado por vía paterna). A la vez, opinan que la evidencia encontrada de heredabilidad materna puede ser debida a que los métodos usados, basados en enzimas de restricción, han sido de baja resolución (como en el trabajo de Giles et al. 1980). Además hacen especial énfasis en afirmar, que contrariamente a lo expuesto por Spuhler, el espermatozoide siempre penetra completamente en el óvulo fecundado en la mayoría de las especies y por lo tanto aconsejan no asumir que la herencia del mtDNA sea estrictamente por vía materna, hasta que no se sepa que ocurre con las mitocondrias del espermatozoide que penetran en el óvulo.

Sin embargo, Parsons y colaboradores (1997), en sus estudios con familias humanas y utilizando una técnica más sensitiva (la secuenciación directa de un fragmento del D-loop), no encontraron evidencia de transmisión por vía paterna en 69 casos de padre/hijo analizados. Por otra parte, Torroni y col. (1998a), obtuvieron resultados similares al realizar un estudio con los hijos de parejas que recurrieron a la inyección intracitoplasmática de espermatozoide como método de reproducción asistida. Esta técnica consiste en la inyección directa de un solo espermatozoide dentro del oocito con el fin de fecundarlo; está considerada como la más invasiva pues altera substancialmente el proceso fisiológico de la

---

fertilización, evitando la penetración natural del espermatozoide en el oocito y pudiendo afectar algunos mecanismos de selección natural, particularmente los que afectarían al espermatozoide en condiciones naturales. La cuestión es que una de las teorías de la herencia materna del mtDNA sugiere que la degradación de las mitocondrias paternas se debe simplemente al hecho de que las mitocondrias masculinas están seriamente dañadas, ya que los gametos masculinos necesitan maximizar su producción de energía para moverse y esta producción de energía está acompañada por la generación de radicales de oxígeno mutagénicos, que causan bastante daño oxidativo en el mtDNA (Allen, 1996; Yakes y Van Houten, 1997). Por tanto, las mitocondrias paternas podrían ser eliminadas simplemente por estar dañadas y no por su origen paterno (Allen, 1996).

Sin embargo, en la técnica de la inyección intracitoplasmática, el espermatozoide inyectado no requiere la cantidad de energía que usualmente se necesita en la fertilización natural y evita completamente el proceso de la penetración del oocito, por lo que en este caso las mitocondrias paternas estarían menos dañadas y con mayores oportunidades de ser transmitidas a la progenie. Por estas razones, Torroni y col. (1998a) investigaron si el uso de ésta técnica produce alguna alteración en el patrón de la herencia del mtDNA, encontrando que en todos los casos analizados la herencia se realizó exclusivamente por vía materna, aunque advierten que su análisis comprende pocos casos y que sus resultados deben tomarse con precaución. En todo caso, tanto Parsons y col. (1997) como Torroni y col. (1998a) no encontraron evidencia alguna de que la penetración de mitocondrias paternas en el oocito, altere la transmisión exclusivamente materna del mtDNA.

Así las cosas, la transmisión por vía materna del mtDNA en humanos podría estar relacionada con la extrema disolución del mtDNA paterno en relación con el materno, ya que en la mayoría de los mamíferos, el espermatozoide contiene de 50 a 57 copias de mtDNA (Ankel-Simons y Cummins, 1996) y en contraste se estima que en el oocito maduro existen de 100,000 a 200,000 copias de mtDNA (Marchington et al. 1997). Por otra parte, también podría estar relacionada con algún mecanismo para el reconocimiento y eliminación selectiva de las mitocondrias (y por tanto del mtDNA) del espermatozoide dentro del oocito, como ocurre en ratones (Kaneda et al. 1995). Al respecto, recientemente se ha presentado evidencia en favor de la existencia de estos mecanismos en bovinos, lo que hace pensar en una generalización de estos procesos en mamíferos. En el congreso de la "American Society for Cell Biology" en diciembre de 1998, Sutovsky y Schatten presentaron resultados que sugieren que las mitocondrias del esperma en desarrollo, son marcadas con una proteína, la cual es conocida como responsable de conducir a las proteínas dañadas al "bote de la basura" celular. Así, después de la fertilización, el cigoto puede reconocer la señal y desechar los organelos del espermatozoide (Hopkin, 1999).

---

Por otra parte, en trabajos recientes, John Maynard Smith y su grupo han detectado una proporción muy alta de sitios polimórficos homoplásicos, que según su estudio sólo pueden ser debidas a eventos de recombinación (Eyre-Walker et al. 1999a; 1999b). Aunque en el primero de estos trabajos existían errores que sesgaron de forma importante el resultado (Macaulay et al. 1999b), posteriormente los datos fueron corregidos y aumentados y se obtuvieron las mismas conclusiones. Además, Erika Hagelberg y su equipo encontraron evidencia de recombinación en un estudio con individuos de Papua Nueva Guinea (Hagelberg et al. 1999). Finalmente, en otro estudio en el que se analizó la relación entre el desequilibrio de ligamiento y la distancia entre los sitios polimórficos, el equipo de John Maynard Smith, encontró evidencias de recombinación en el mtDNA (Awadalla et al. 1999). De acuerdo con estos investigadores, la recombinación puede darse entre el mtDNA paterno y materno o bien, entre las integraciones nucleares del mtDNA (ver abajo) y el mtDNA del mismo individuo.

La discrepancia entre las observaciones empíricas y las estimaciones teóricas podría deberse a que los eventos de recombinación fuesen relativamente poco frecuentes. Es obvio que los mecanismos para evitar la transmisión paterna del mtDNA, descritos más arriba, podrían fallar en algún caso determinado dando lugar a la acumulación, en periodos evolutivos, de los polimorfismos responsables de la homoplasia y de la correlación entre el desequilibrio de ligamiento y la distancia de los sitios polimórficos. Por lo tanto, lo relevante es la estimación de la frecuencia con que pueden ocurrir estos eventos y en caso de que se demuestre la recombinación, considerarla en su justa magnitud en los estudios poblacionales basados en el mtDNA. De acuerdo con Erika Hagelberg y colaboradores, a pesar de presentar recombinación, el mtDNA podría continuar ofreciendo un valioso conocimiento de la historia evolutiva humana, siempre y cuando toda la información contenida en los datos pueda ser tomada en cuenta (Hagelberg et al. 1999).

Por otra parte, los estudios teóricos no se consideran definitivos, ya que otros procesos genéticos pueden crear patrones similares a los observados por Maynard Smith y su equipo (Strauss, 1999). Además, si la recombinación ocurre entre los DNAs mitocondriales materno y paterno, aún queda por explicar el mecanismo por el cual el mtDNA paterno puede llegar a aproximarse lo suficiente al mtDNA materno, ya que la organización en nucleoides del mtDNA, hace que esta aproximación sea complicada (Howell, 1997).

### **Homoplasmía y heteroplasmía**

---

El mtDNA puede ser considerado como un locus, en el que las formas alternativas o alelos estarían constituidos por una única secuencia, de tal forma que dos secuencias que varíen en una o más posiciones de nucleótidos pueden ser consideradas dos alelos distintos del mismo locus. La mayoría de los individuos son homoplásmicos en cuanto al mtDNA se refiere, es decir, presentan una misma secuencia o alelo en todas o casi todas las moléculas de mtDNA que poseen. Para explicar este fenómeno, se ha propuesto que en los mamíferos existe algún mecanismo que limita el desarrollo de la divergencia de las moléculas de mtDNA derivadas de un solo cigoto, manteniendo así idénticas las secuencias de DNA mitocondrial entre las células diferenciadas del individuo (Monnat y Loeb, 1985).

Según Monnat y Loeb (1985) esta homoplasmía es bastante sorprendente, ya que existen diversas razones por las que cabría esperar una acumulación de diferencias en las moléculas de mtDNA de un individuo: i) el número de moléculas mitocondriales por célula podría llegar a 10,000, por lo que la pérdida de funcionalidad de una pequeña fracción de las moléculas de mtDNA no iría en detrimento de la propagación de la célula; ii) el código genético del mtDNA está más degenerado que el código genético nuclear, por lo que es más tolerante con los errores de transcripción y traducción y por lo tanto podría tolerar la persistencia de mutaciones minimizando el efecto negativo que pudieran tener en la codificación de los genes; iii) aparentemente, la DNA polimerasa- $\gamma$  carece de actividad exonucleasa y exhibe una tasa de error de 1/7000 en los ensayos de fiabilidad y si estos ensayos son representativos de la fidelidad *in vivo*, debería de haber dos o tres bases mal apareadas en cada molécula hija después de cada ciclo de replicación del mtDNA; iv) el mtDNA es bastante susceptible a la modificación y daño molecular por parte de sustancias cancerígenas y mutagénicas.

Estas consideraciones sugieren que durante el desarrollo debería generarse cierta divergencia en la población de moléculas de mtDNA de un individuo. Además, una vez completado el desarrollo, las diferencias en la secuencia de nucleótidos deberían de continuar acumulándose durante la renovación del mtDNA en los tejidos mitóticos y postmitóticos. Por lo tanto, si no existiese algún mecanismo para limitar la divergencia, debería encontrarse al menos 1 sustitución por cada 225 nucleótidos en cada molécula de mtDNA en células somáticas adultas. Sin embargo, al no encontrar evidencia de esta divergencia, Monnat y Loeb (1985) propusieron que o bien la replicación y/o la reparación del mtDNA son procesos de una fidelidad extrema, o bien existe un mecanismo que limita el desarrollo de la divergencia de las moléculas de mtDNA. De hecho, estudios recientes han demostrado que la capacidad de reparación de ciertos tipos de daños en el DNA de la mitocondria, es mayor de lo que se pensaba y también se ha propuesto que la mayoría de las moléculas portadoras de daños importantes, son marcadas para ser destruidas (Bogenhagen, 1999).

---

Ahora bien, la heteroplasmía se caracteriza por la existencia de una mezcla de DNAs mitocondriales que difieren en su secuencia, presentes en una sola mitocondria, una sola célula o un solo individuo. Esta situación es frecuente en individuos que padecen enfermedades mitocondriales, sin embargo, se han observado muy pocas mutaciones neutras o silenciosas (sin efecto en el fenotipo) que produzcan heteroplasmía en el mtDNA de individuos normales, a pesar de que se han secuenciado segmentos hipervariables de la región de control de muchos individuos. Esto sugiere que la heteroplasmía es muy rara, o que no es fácilmente detectable mediante secuenciación directa (Bendall et al. 1996). En efecto, los resultados de las investigaciones de Monnat y Loeb en cuanto a la predominancia de homoplasmía, han venido siendo confirmados por los diversos estudios familiares y poblacionales sobre la variabilidad del mtDNA. En la mayoría de ellos no se encontró ningún caso de heteroplasmía, sin embargo, cada vez son más las publicaciones que informan de individuos heteroplásmicos a pesar de que en casi todos ellos se observó la presencia de sólo dos secuencias diferentes constituyendo la heteroplasmía.

Por ejemplo, una de las primeras evidencias de mutaciones neutras heteroplásmicas en humanos, fue publicada en 1992 por Howell y colaboradores. Estos investigadores estaban analizando pedigríes de familias que padecían neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON) y encontraron dos individuos heteroplásmicos en una familia inglesa. Analizando un segmento de 350 pares de bases (pb) del gen ND6, encontraron en cada uno de estos individuos dos alelos, uno caracterizado por una Adenina (A) y otro por una Guanina (G) en el nucleótido 14560, debido a una mutación neutra (Howell et al. 1992).

Por lo que respecta a la región de control, Comas y col. (1995) encontraron un individuo con dos posiciones heteroplásmicas, la 16293 con A y G y la 16311 que presentaba Citosina (C) y Timina (T), al secuenciar 360 pb en un estudio poblacional. Por otra parte, Ivanov y col. (1996) analizando 610 pb encontraron la presencia de dos variantes (C y T) en el nucleótido 16169 en los restos del Zar Nicolás II y descartaron la posibilidad de que esta situación hubiese surgido por daño molecular después de la muerte, al encontrar la misma posición heteroplásmica en familiares relacionados por vía materna. En el estudio de Parsons y col. (1997) en el que también se analizaron 610 pb del D-loop, se encontró que 5 individuos de los 357 estudiados eran heteroplásmicos, presentando sólo dos variantes o alelos. Por último, Bendall y col. (1996) analizaron un segmento de unos 310 pb del D-loop en 180 pares de gemelos, encontrando 4 pares de ellos con heteroplasmía, 3 con una sola posición compuesta por dos variantes y un par de ellos con dos posiciones heteroplásmicas, compuestas también por dos variantes cada una.



---

En su artículo, Bendall y colaboradores sugieren que la heteroplasmía en la región de control es más frecuente de lo que se ha informado y opinan que la falta de observación de heteroplasmía en estudios previos puede deberse a las dificultades para detectarla mediante secuenciación directa. Por otra parte, en todos los estudios aquí resumidos se han analizado fragmentos de mtDNA relativamente pequeños y quizá sea necesario analizar la secuencia completa del mtDNA en un número importante de individuos, utilizando para ello una técnica lo suficientemente sensible para detectar sitios heteroplásmicos, como la secuenciación de múltiples clones. Esto ayudaría a dilucidar si efectivamente la heteroplasmía, cuando se presenta, se limita sólo a dos alelos mitocondriales, o si por el contrario es más común la situación descrita por Howell y col. (1996); quienes encontraron un individuo que presentaba 3 secuencias diferentes (triplásmico) de mtDNA, al secuenciar 58 clones de un fragmento de 1200 pb. Así mismo, aún falta una estimación adecuada de la frecuencia de heteroplasmía en la población, que permita corroborar los resultados de Bendall y colaboradores (1996) sobre la estimación que hicieron de la tasa de evolución del mtDNA basándose en dicha frecuencia, ya que como veremos a continuación, la frecuencia de heteroplasmía en la población está relacionada con la velocidad de segregación de los alelos mitocondriales producidos *de novo* y por lo tanto con la tasa de evolución.

### **Segregación de alelos**

Durante el proceso evolutivo, en el mtDNA las sustituciones de nucleótidos se acumulan mucho más rápido que las mutaciones similares en el DNA nuclear (ver siguiente sección). Sin embargo, para que exista esta acumulación, las sustituciones deben primero ser segregadas en la línea germinal del individuo en las que surgen y ser heredadas por su proge, para posteriormente alcanzar niveles de polimorfismo y eventualmente ser fijadas en los niveles de población y especie.

Todo este proceso se inicia cuando una mutación mitocondrial surge en la célula de un individuo, creando una mezcla intracelular de moléculas normales y mutantes. Como ambas se distribuyen de forma aleatoria en las células hijas durante la replicación mitótica y meiótica, el porcentaje de unas y otras sufre una deriva dentro de la célula hacia una forma pura, ya sea la mutante o la normal, hasta llegar a la homoplasmía. A este proceso se le conoce con el nombre de segregación replicativa (Wallace, 1994). La segregación replicativa mitótica, requiere múltiples divisiones celulares para acercarse a la homoplasmía, pero la segregación replicativa meiótica puede ser bastante rápida, pues como veremos a continuación, la proporción de moléculas puede cambiar de predominantemente normales a esencialmente mutantes en una o dos generaciones. De cualquier forma, las

---

mutaciones que surgen en tejidos somáticos mueren con el individuo, en tanto que las mutaciones que surgen en la línea germinal femenina pueden ser transmitidas a la siguiente generación.

La rapidez de la segregación meiótica ha sido observada analizando generaciones sucesivas de individuos, tanto en animales como en humanos. Los estudios sobre animales se han llevado a cabo con ganado Holstein, e informan de una velocidad de segregación muy rápida. Por ejemplo, en los trabajos del grupo de Hauswirth y Laipis, se han encontrado ejemplares heteroplásmicos que tuvieron progenie homoplásmica en tan sólo dos generaciones (Hauswirth y Laipis, 1982; Ashley et al. 1989); por su parte, Koehler y col. (1991) encontraron 13 casos en los que el mtDNA de la madre era diferente del de la hija y siendo que en estos casos ni la madre ni la hija eran heteroplásmicas, quedó demostrado que el genoma mitocondrial bovino puede ser reemplazado completamente por una nueva variante en tan sólo una generación. Esta segregación de variantes tan rápida, no puede ser explicada en la línea germinal por la selección aleatoria de moléculas de mtDNA durante la división celular (Koehler et al. 1991). En cambio, podría ser explicada por la teoría de que en algún punto de la oogénesis o la embriogénesis ocurra un “cuello de botella”, en el que las moléculas de mtDNA del oocito o del embrión serían reducidas a un número relativamente pequeño, con la consecuencia de que a partir de unas pocas moléculas se desarrollen todas las copias que tendrá el oocito maduro o el embrión y eventualmente, el individuo. A esta teoría se le llama comúnmente la teoría del cuello de botella del desarrollo y fue propuesta originalmente por Hauswirth y Laipis (1982). Aunque la mayoría de investigadores están de acuerdo con esta teoría, hay discrepancias en cuanto al número inicial de copias de mtDNA a partir de las cuales surgen todas las demás. Por ejemplo, Ashley, Laipis y Hauswirth (1989) calcularon que el número de unidades de segregación podría estar entre 20 y 100 moléculas mitocondriales, en tanto que Koehler y colaboradores (1991) opinan que este número podría reducirse hasta sólo una molécula.

Por su parte, los estudios con humanos muestran resultados un poco diferentes en cuanto a la velocidad de segregación y por tanto difieren también en el número estimado de moléculas iniciales durante el cuello de botella. Por ejemplo Howell y colaboradores (1992) después de encontrar los dos individuos heteroplásmicos mencionados en la sección anterior, extendieron el análisis a un total de 8 miembros de la familia que estaban relacionados por vía materna y que pertenecían a 3 generaciones. En dicho estudio, los autores encontraron que los ocho individuos eran heteroplásmicos y que la frecuencia de los dos alelos que formaban la heteroplasmía, variaba muy poco entre los individuos y entre las generaciones. Estos resultados son un poco contradictorios con relación a los estudios con animales, pues indican una persistencia inusual de un estado heteroplásmico indicando que el número de moléculas durante el cuello de botella podría ser muy alto, en tanto que los

---

estudios con bovinos apuntan a una segregación más rápida, debida a un número inicial de moléculas más bajo. Los autores opinan que no resulta lógico creer que el cuello de botella se estreche hasta una sola molécula de mtDNA en algunos oocitos y que en otros se amplíe hasta incluir 100 o más moléculas.

Para resolver esta controversia, los autores proponen que la unidad de segregación podría ser la mitocondria y no las moléculas de mtDNA, ya que una mitocondria puede contener varias moléculas completas de mtDNA y por lo tanto, la segregación rápida de alelos dentro de un oocito heteroplásmico podría depender de si los organelos individuales, es decir las mitocondrias, son homoplásmicas o heteroplásmicas. Más aún, en un trabajo más reciente estos investigadores proponen que la unidad de segregación podría ser incluso el nucleóide, la estructura básica de “empaquetamiento” del mtDNA, ya que la tasa de intercambio de mtDNA entre los nucleóides parece ser muy baja (Lightowers et al. 1997). Así, la segregación de genotipos mitocondriales heteroplásmicos sería muy lenta si una proporción alta de nucleóides son heteroplásmicos, pero sería más rápida en la medida en que la proporción de nucleóides homoplásmicos sea mayor.

De cualquier manera, la persistencia y la proporción de individuos heteroplásmicos en una población indicará el número de nuevos alelos que surgen, la frecuencia a la que lo hacen y la velocidad a la que son fijados en el individuo; factores que determinan, en primer término, la tasa de evolución de la secuencia del mtDNA en una población. No obstante, se debe tener en cuenta la probabilidad de que una mutación que ha surgido y que ha sido segregada en una o dos generaciones hasta convertirse en homoplásmica, no alcance nunca una frecuencia de polimorfismo en la población debido a factores como la deriva genética. De acuerdo con Wallace (1994) las mutaciones neutras que surgen en la población general, normalmente se pierden debido a los efectos aleatorios de la deriva genética y son muy raras las mutaciones que alcanzan frecuencia de polimorfismo como resultado de ella. Por tanto, la mayoría de las mutaciones polimórficas que existen en la población actualmente, ocurrieron bastante tiempo atrás y desde entonces han venido siendo segregadas. Finalmente, la proporción de las mutaciones polimórficas que serán fijadas al nivel de especie para completar el proceso evolutivo podrá ser mayor o menor dependiendo de la presión selectiva a la que esté sujeto el mtDNA. Por lo tanto, la tasa de evolución es una medida que refleja tanto la velocidad a la que son segregados los alelos mitocondriales en todos los niveles, así como la influencia de la presión selectiva. Por esto, calcular la tasa de evolución es una cuestión tan complicada, ya que se deben tener en cuenta una gran cantidad de factores.

---

## Tasa de evolución

Si nos basamos en consideraciones funcionales, tendríamos que esperar un cambio evolutivo lento en el DNA de las mitocondrias animales. Esta expectativa está basada en un concepto ampliamente aceptado, concerniente a la evolución molecular: mientras más importante es la función de un gen o proteína, más lentamente actuará el cambio evolutivo en su estructura primaria (Brown et al. 1979). La mitocondria tiene funciones celulares extremadamente importantes y debido a que la vida del individuo depende crucialmente de estas funciones, deberíamos esperar que la evolución del organelo esté muy restringida y también que su DNA participe de esta restricción. Sin embargo, desde los primeros trabajos de W. Brown, se ha observado que a pesar de su extrema economía en la organización genómica, el mtDNA evoluciona alrededor de 5 a 10 veces más rápido que el segmento promedio del DNA nuclear. Esta característica hace del mtDNA una molécula extremadamente útil para el análisis de alta resolución del proceso evolutivo (Brown et al. 1979).

Para explicar porqué el genoma mitocondrial evoluciona tan rápidamente, debemos considerar que la tasa de evolución del mtDNA es una función de dos procesos, la tasa a la cual las mutaciones surgen (tasa de mutación) y la probabilidad de que una mutación recién surgida sea fijada en la población (tasa de fijación). El mtDNA presenta una alta tasa de mutación que quizá se deba en parte a que el mtDNA carezca de histonas protectoras, que posea sistemas ineficientes de reparación y/o que esté expuesto continuamente a los efectos mutagénicos de los radicales de oxígeno generados por la fosforilación oxidativa (Richter et al. 1988). También presenta una elevada tasa de fijación debido al probable efecto del cuello de botella durante el desarrollo que favorece una rápida segregación de alelos y a la relativamente rápida deriva genética de mtDNAs en la población general (Wallace, 1994). No obstante, los cálculos que se han hecho de la tasa de evolución del mtDNA varían considerablemente según los métodos utilizados y esto sugiere que aún se desconocen factores importantes del complejo proceso mediante el cual las mutaciones surgen en el mtDNA, son segregadas y fijadas en los niveles de organelo, célula, individuo y de población.

Existen varias formas de expresar la evolución molecular del mtDNA y en la bibliografía encontramos términos como tasa de mutación, tasa de substitución, tasa de evolución, y tasa de divergencia. Estrictamente hablando, la tasa de mutación se refiere a la tasa a la cual surgen nuevas mutaciones, sean fijadas o no. La tasa de evolución, conocida también como tasa de substitución, es una medida que expresa las nuevas mutaciones que han sido fijadas en un tiempo determinado. No obstante, el término tasa de mutación, suele usarse también como sinónimo de la tasa de evolución. Por otra parte, respecto a la

---

diferencia entre tasa de evolución y tasa de divergencia, Stoneking (1993) nos aclara que la tasa de evolución expresa el número de mutaciones que han sido fijadas en un linaje de mtDNA en un tiempo determinado, es decir, la velocidad a la que se diferencia un descendiente de su antecesor; en tanto que la tasa de divergencia, representa el número de mutaciones que han sido fijadas entre dos linajes de mtDNA en un tiempo determinado, o sea, la velocidad a la que se diferencian dos descendientes entre sí, relacionados por un antecesor común. Se espera por tanto que la tasa de divergencia sea el doble de la tasa de evolución, ya que considera cambios en dos linajes. Es importante hacer notar que sin un sistema que nos permita llevar a cabo un seguimiento en el tiempo para ver como evoluciona un linaje, la tasa de evolución sólo puede ser inferida a partir de la tasa de divergencia, calculada analizando individuos contemporáneos.

Por otra parte, debemos considerar que la tasa de evolución del mtDNA puede variar mucho de un sitio a otro, tanto dentro de la región de control como a lo largo de todo el genoma (Wakely, 1993) y por tanto, para poder compararlas se debe tener en cuenta sobre qué segmento los diversos autores han calculado esta tasa. Inicialmente los cálculos se hacían analizando todo el mtDNA con enzimas de restricción, con lo cual se obtenía una tasa de evolución global pero con una baja resolución, debido a que estos métodos no detectan las mutaciones que no generan nuevos sitios de restricción o que no modifican los sitios existentes. Posteriormente, para obtener una mayor resolución, muchos autores han estudiado la región de control a nivel de secuencia y han obtenido tasas de evolución más rápidas. Sin embargo, estas tasas sólo se refieren a este segmento en particular, así que lo ideal sería el estudio comparativo de la secuencia completa del mtDNA, para alcanzar la máxima resolución, obteniendo a la vez la tasa evolutiva de toda la molécula. Aunque ya se han hecho trabajos utilizando esta aproximación, se han llevado a cabo con pocos individuos y es de esperar que los nuevos trabajos incluyan la secuencia completa de un número considerable de individuos, sobre todo si se observa que los métodos de secuenciación son cada vez más rápidos y eficientes.

Conocer la tasa de evolución del DNA, se revela de particular importancia en todo estudio que pretenda utilizar el reloj molecular como método para datar eventos de interés. En el caso del mtDNA, la aplicación más relevante ha sido la estimación de la edad del antecesor de todo el mtDNA humano, ya que a nivel teórico esta fecha determina un límite máximo para la fecha del origen del hombre moderno y por lo tanto es crucial para discernir entre las dos hipótesis que existen al respecto, la de un origen africano reciente y la de la evolución multiregional (Spuhler, 1988; Stoneking, 1993). Por este motivo, los cálculos de la tasa de evolución del mtDNA han estado siempre ligados a la datación del antecesor común del mtDNA humano, así que para apreciar las diferencias en las distintas tasas calculadas, utilizaremos esta fecha como referencia.

---

Para estimar la tasa de divergencia del mtDNA existen diversos métodos. Los más utilizados son los llamados métodos filogenéticos y consisten en valorar la cantidad de diferencia que existe en el mtDNA de individuos de una, dos, o más especies relacionadas y estimar el tiempo que ha tardado en producirse esta diferencia, utilizando para ello algún dato externo, como las fechas de separación de dos o más de las especies utilizadas, obtenidas mediante evidencia paleontológica, o las fechas de acontecimientos relevantes obtenidas mediante evidencia arqueológica. Los métodos filogenéticos son llamados así porque para estimar la diferencia entre los individuos analizados se utiliza algún método de reconstrucción filogenética, como el de la máxima parsimonia o el de “neighbor-joining”, por citar dos ejemplos. También existen otros métodos que no dependen de datos externos, como los basados en modelos teóricos y los métodos empíricos, basados en la observación directa del cambio evolutivo.

### Métodos filogenéticos

Una aproximación de este tipo fue usada por primera vez por Brown y colaboradores para estimar la tasa de divergencia de la molécula del mtDNA en primates. Analizando con enzimas de restricción el mtDNA de cuatro especies de primates superiores, Brown y col. (1979), calcularon, una tasa de 0.02 substituciones por par de bases por millón de años. Cabe destacar, que una vez obtenida esta tasa, es posible estimar cuanto tiempo ha tardado en producirse la divergencia observada en un grupo concreto de individuos. Así, en un trabajo posterior, Brown y colaboradores analizaron la divergencia existente entre 21 individuos de diferente origen étnico y geográfico y dada la relativa poca diferencia encontrada, postularon la existencia de un proceso de especiación (o un cuello de botella) en la especie humana ocurrido hace 180,000 años, utilizando la tasa previamente calculada (Brown, 1980).

Poco después se publicó la primera sugerencia formal de que es posible seguir hacia atrás toda la divergencia actual del mtDNA de las poblaciones humanas hasta un ancestro femenino (Cann et al. 1987a). Utilizando una tasa del 2-4%, basada tanto en la tasa de Brown como en otras tasas calculadas a partir de diferentes especies de vertebrados, los autores calcularon que este ancestro existió entre hace 140,000 y 290,000 años, apoyando la teoría de que la transformación de formas arcaicas en formas modernas de Homo sapiens ocurrió en tiempos relativamente recientes, a partir de una sola población (Cann et al. 1987a).

---

Sin embargo, una de las principales críticas hechas a este trabajo, fue precisamente la tasa que se utilizó (2-4%), ya que fue calculada con datos interespecíficos de diversos vertebrados, lo cual podría producir una desviación del resultado. Para ilustrar esto, Saitou y Omoto (1987) utilizaron la misma tasa para calibrar el tiempo necesario para que se produzca la divergencia observada en el mtDNA de homínidos, obteniendo un tiempo de divergencia entre humanos y chimpancés de 1.4-2.8 millones de años, una fecha irreal, por lo que proponen utilizar una tasa obtenida previamente por M. Nei, de 0.71% por sitio por millón de años, con la que se obtiene una edad del antecesor de 400,000 años, con una media de más de un millón de años. No obstante, poco después fue aclarado que el cálculo de Nei se refiere a la tasa de evolución y no de divergencia (Cann et al. 1987b), con lo que para poder compararlas es necesario doblar la tasa de Nei. En cualquier caso, la principal conclusión de Saitou y Omoto es su creencia de que los datos de Cann y col. no son suficientes por si mismos para inferir el origen del hombre moderno.

Posteriormente, el grupo de Alan Wilson diseñó un método alternativo para calcular la tasa de evolución del mtDNA humano (Stoneking, et al. 1986), ya que además de las objeciones de Saitou y Omoto, otros autores opinaban que la tasa obtenida a partir de diversas especies de vertebrados no era adecuada para este tipo de estudios, pues sostenían la posibilidad de que la tasa de evolución del DNA, tanto nuclear como mitocondrial, estuviese ralentizada en los homínidos. El nuevo planteamiento de Wilson y colaboradores consistía en estudiar la variabilidad de una población que hubiese colonizado una región específica, en un tiempo conocido y que hubiese permanecido en relativo aislamiento después de la colonización. De esta forma se podría observar cuanta divergencia puede surgir en la especie humana en un tiempo determinado, en este caso, el comprendido desde la colonización hasta la actualidad.

Aunque ninguna población humana satisface exactamente estos requisitos, consideraron que las poblaciones aborígenes de Papua Nueva Guinea representaban una aproximación razonable. Así, fue obtenida la primera tasa de divergencia calibrada mediante comparaciones intraespecíficas en humanos. El trabajo publicado por Stoneking, Bhatia y Wilson en 1986, se basó en la estimación mediante el análisis de mapas de sitios de restricción de la variabilidad del mtDNA de las poblaciones de Papua Nueva Guinea, así como en la estimación de la variabilidad a partir de datos publicados de poblaciones Australianas y Amerindias, obteniendo valores concordantes con una tasa global del 2 al 4% por millón de años, que no contradice las obtenidas para diferentes especies y por tanto rechaza la idea de que en los homínidos el mtDNA evolucione más lentamente que en otros vertebrados. Además, esta tasa sitúa la existencia del antecesor común de todo el mtDNA humano, en las fechas calculadas previamente por Cann y col. (1987a), de hace 150,000-300,000 años.

---

Esta estimación fue criticada por Spuhler (1988) exponiendo que las regiones utilizadas fueron colonizadas por dos o más migraciones principales en vez de ser colonizadas en un tiempo definido y permanecer después aisladas. En su artículo, una revisión bastante completa sobre la evolución del mtDNA en primates, Spuhler opina que es más fiable una tasa de 0.5-1.0% por sitio por millón de años, lo que sitúa al ancestro en más de 480,000 años. Pero al igual que Saitou y Omoto, su conclusión final es que se necesita mayor información sobre el mtDNA de poblaciones de Africa, Asia y Europa para clarificar la evolución del hombre moderno, sobre todo información a nivel de la secuencia de nucleótidos, pues expone que los estudios con enzimas de restricción que hasta el momento se habían utilizado eran de baja resolución.

Otra estimación intraespecífica de la tasa de evolución del mtDNA humano, fue obtenida por Torroni y colaboradores (1994a), quienes analizando poblaciones amerindias con enzimas de restricción y utilizando fechas de referencia arqueológicas, obtuvieron una tasa de evolución global de 2.3-2.9% por millón de años.

Con el fin de superar las deficiencias señaladas, el grupo de Alan Wilson ideó otro método para estimar la ya polémica tasa de divergencia, esta vez aprovechando las ventajas que introdujo el desarrollo del PCR que incrementó la eficiencia y la velocidad tanto en la amplificación como en la secuenciación del DNA. Los autores estimaron la tasa evolutiva de las secuencias de los dos segmentos hipervariables de la región de control, calculando la cantidad promedio de divergencia entre las secuencias de 189 individuos analizados y una secuencia homóloga de chimpancé y la dividieron entre el tiempo estimado para la separación evolutiva de las dos especies (tiempo de divergencia). Los autores estimaron que la diferencia entre humanos y chimpancé era del 69.2% y al dividirla entre las dos fechas de divergencia utilizadas (4 y 6 millones de años), obtuvieron dos tasas, una de 11.5% y otra de 17.3% por millón de años, lo que da un rango de 166,000 a 249,000 años para la edad del antecesor del mtDNA humano (Vigilant et al. 1991).

No obstante, los métodos filogenéticos generalmente se basan en dos estimaciones que pueden variar substancialmente de acuerdo a los criterios utilizados: 1) la forma de ponderar la divergencia o distancia evolutiva entre los individuos analizados y 2) las fechas de referencia utilizadas, como pueden ser las estimaciones paleontológicas de los tiempos de divergencia de las especies estudiadas; o las fechas de colonización en el caso de los estudios con poblaciones de Papua Nueva Guinea, establecidas mediante evidencia arqueológica. A continuación se exponen estas variaciones.



- 
1. En el trabajo de Vigilant y col. (1991) fue observado un promedio de diferencia neta del 15,1% entre los nucleótidos de las secuencias de las dos especies analizadas, pero esta diferencia fue corregida para obtener la divergencia acumulada tomando en cuenta que algunas posiciones de nucleótidos pueden mutar más de una vez, escondiendo eventos evolutivos al regresar a su estado original. En particular, se consideró que las transiciones (la mutación de una pirimidina por otra pirimidina o de una purina por otra purina) son las substituciones más propensas a estar subrepresentadas, pues las transiciones son más comunes que las transversiones (substitución de una pirimidina por una purina y viceversa) en el mtDNA de los primates (Brown et al. 1982; Horai y Hayasaka, 1990). Así que para evaluar cuantas transiciones ocurrieron sin que hayan podido ser observadas mediante la simple comparación de las secuencias, los autores se basaron en el análisis de máxima parsimonia de sus datos, el cual indicaba que para explicar la filogenia obtenida tenían que haber ocurrido más transiciones que transversiones en razón de 15 a 1, por lo que sumaron 15 transiciones por cada transversión observada, obteniendo de este modo la divergencia de 69,2% que utilizaron para el cálculo.

Sin embargo, la estimación de la divergencia acumulada, entre las secuencias del hombre y el chimpancé, es una tarea particularmente problemática debido a que no sólo se debe considerar la posibilidad de que ocurran múltiples transiciones en la misma posición de nucleótido, sino también la variación de la tasa de mutación entre los diferentes sitios y la composición de nucleótidos de las secuencias analizadas, además de tener presente el largo periodo de tiempo evolutivo que separa a las dos especies (Stoneking, 1993).

Cuando se consideran estos factores, los resultados pueden ser bastante diferentes. Por ejemplo, para estimar la divergencia entre las secuencias del hombre y el chimpancé, Pesole y colaboradores (1992) desarrollaron un método estadístico basado en un proceso estacionario de Markov que toma en cuenta la presencia de sitios invariables en la región de control. Después calibraron la tasa utilizando dos fechas de divergencia y una de ellas, la de 5 millones de años, sitúa la existencia del antecesor del mtDNA humano en  $400,000 \pm 100,000$  años. Así mismo, Tamura y Nei (1993) desarrollaron un modelo que considera el exceso de transiciones, la composición desigual de nucleótidos y la variación de la tasa de mutación entre los diferentes sitios de la región de control. Con este método estimaron una fecha del antecesor de 80,000 a 480,000 años, valiéndose de un tiempo de divergencia entre humanos y chimpancés de 4 a 6 millones de años. Estas variaciones con respecto a los cálculos de Vigilant y col. (1991) nos dan una idea de la importancia que tiene el método de estimación de la distancia entre secuencias para el cálculo de las tasas de substitución.

- 
2. La segunda fuente de variación en los métodos filogenéticos es la utilización de fechas externas para calibrar la tasa evolutiva. Como ya se ha dicho, en el trabajo de Vigilant y col. (1991) se utilizaron dos fechas de divergencia hombre-chimpancé, una de 4 y otra de 6 millones de años, obteniendo respectivamente dos tasas, una de 11.5% por millón de años y otra de 17.3%, que implican una edad del antecesor de 166,000 y de 249,000 años respectivamente. No obstante, Templeton reanalizó los datos de Vigilant y colaboradores (1991) utilizando una fecha de divergencia Homo-Pan de 9.2 millones de años y obtuvo una edad del antecesor de 235,000 a 554,000 años, estimando la divergencia entre las secuencias de hombre y chimpancé de la misma forma que en el trabajo original; y de 439,000 a 844,000 años al utilizar otro método para estimar la divergencia (Templeton, 1993). Por otra parte, la fecha de divergencia más antigua que utilizaron Pesole y colaboradores como referencia, fue de 7.4 millones de años y sitúa al antecesor del mtDNA humano en  $600,000 \pm 200,000$  años (Pesole et al. 1992).

Quizá pueda parecer exagerado situar la fecha de divergencia de humanos y chimpancés entre 7 y 9 millones de años, ya que existen varios trabajos que mediante el análisis tanto de fragmentos grandes como de todo el genoma mitocondrial de primates (Horai et al. 1992; 1995) fijan esta fecha alrededor de hace 5 millones de años, al igual que los trabajos con DNA nuclear (Takahata, 1995). Sin embargo, Arnason y colaboradores utilizaron una nueva referencia molecular/paleontológica, la separación entre los artiodáctilos y los cetáceos estimada en 60 millones de años, para datar las fechas de divergencia de los primates, situando la separación entre hombre y chimpancé alrededor de hace 13 millones de años. Su trabajo merece especial atención, pues compararon la secuencia completa del mtDNA de 15 especies y las estimaciones paleontológicas se basan en los registros fósiles de artiodáctilos y cetáceos, que a diferencia del registro de los primates son más completos y por tanto más fiables para estimar los tiempos de divergencia (Arnason et al. 1996; 1998).

Estas diferencias en el tiempo de divergencia entre humanos y chimpancés y de otras líneas de primates, afectan a todos los cálculos de la tasa de evolución del mtDNA. Por ejemplo, Horai y col. (1995), utilizaron como fecha de referencia la divergencia entre el orangután y los apes africanos, estimada mediante evidencia fósil en 13 millones de años (Andrews y Pilbeam, 1996); obtuvieron una tasa de mutación para el D-loop de  $7.00 \times 10^{-8}$  por sitio por año y estimaron que la separación del chimpancé y el hombre ocurrió hace  $4.9 \pm 0.2$  millones de años (Horai et al. 1995). No obstante, Arnason y colaboradores (1996) sitúan la fecha de divergencia entre el orangután y los apes en 24.5 millones de años, casi el doble de la utilizada por el grupo de Horai.

---

Parece por tanto, que para calcular la tasa de evolución del mtDNA tanto de los primates en general, como del hombre en particular, utilizando fechas de divergencia como referencia, habrá que esperar a que haya un consenso generalizado. Aunado a esto, cabe mencionar que los métodos filogenéticos asumen que el mtDNA del chimpancé y del hombre (o de las diferentes líneas evolutivas de los primates) han evolucionado a la misma tasa, cuando cada vez hay más datos que refutan esta premisa (Hasegawa y Horai, 1991; Stoneking, 1993; Takahata, 1996).

Finalmente, los métodos filogenéticos también han sido criticados en el sentido de que muchos autores han considerado que la fecha de la existencia del antecesor común es un parámetro fijo que es posible estimar a partir de los datos genéticos, sin embargo esta edad es más bien el valor observado de una variable aleatoria cuya distribución depende de las características de la demografía humana (Donnelly y Tavaré, 1995) y por lo tanto está sujeta a fuentes de variación. Para considerar esta fuente de variación debe calcularse la media de la variable y su varianza para establecer un intervalo de confianza (Templeton, 1993). En los primeros trabajos del grupo de Alan Wilson no fue calculado este intervalo de confianza para la estimación de la edad del antecesor común y aunque puede parecer que las dos fechas que presentan en cada uno de sus trabajos conforman un intervalo de confianza, en realidad no es así. En el trabajo de Cann y col. (1987a) y de Stoneking y col. (1986) las dos fechas presentadas resultan de utilizar dos tasas de evolución, una del 2% y otra del 4%; y en el de Vigilant y col. (1991) son el resultado de utilizar una fecha de referencia de 4 millones de años para el “límite inferior” y otra de 6 millones de años para el “límite superior” (Tabla MT-1).

Sin embargo, en la estimación de cada una de estas fechas se debería calcular un intervalo de confianza (Templeton, 1993). Si se calcula el intervalo de confianza, el rango para la existencia del antecesor común sería mucho más amplio que el presentado en estos trabajos, como se observa en artículos posteriores, tanto de diversos investigadores como del grupo de Wilson. Por ejemplo, en el trabajo de Stoneking y col. (1992) se calculó la tasa siguiendo el mismo principio del análisis con enzimas de restricción en poblaciones de Papua Nueva Guinea, pero esta vez analizando la secuencia de la región de control y se obtuvo una edad del antecesor de 63,000 a 416,000 años, un rango más amplio que el obtenido por Vigilant y col. (1991) porque en este caso sí representa un intervalo de confianza (del 95%).

En vista de los problemas que presentan los métodos filogenéticos, diversos investigadores han buscado nuevas aproximaciones que no dependan de datos paleontológicos o arqueológicos para calcular la tasa de evolución, ni de la construcción de

---

filogenias para evaluar las distancias acumuladas en las secuencias. La mayoría de ellos presentan resultados sorprendentes, pues han obtenido tasas mucho más rápidas que las estimadas con métodos filogenéticos. Estos trabajos varían desde los que utilizan modelos teóricos (Lundstrom et al. 1992; Bendall et al. 1996) hasta los puramente empíricos (Howell et al. 1996; Parsons et al. 1997).

#### Métodos basados en modelos teóricos

Lundstrom, Tavaré y Ward (1992) utilizaron el modelo de la coalescencia para estimar la tasa de divergencia analizando las secuencias de la región de control de una población amerindia, ya que el modelo de la coalescencia predice la relación entre la estructura genética de la población y el tiempo de divergencia. Los autores calcularon una tasa de 110% por millón de años, una tasa mucho más rápida que las obtenidas con los métodos filogenéticos (una edad del antecesor de 26,000 años si se aplica a los datos de Vigilant et al. 1991), pero advierten que sus datos deben ser considerados como provisionales pues tuvieron que basar su análisis en estimaciones difíciles de corroborar, como el tamaño efectivo que ha tenido la población a largo plazo.

Referencia	Tipo <sup>a</sup>	Var. <sup>b</sup>	Método		Fecha utilizada <sup>c</sup>	Tasa original calculada <sup>d</sup>	Tasa evolutiva estandarizada <sup>e</sup>	Edad del antecesor (años)
			Fragmento	Análisis				
Brown et al. 1979	PHY	E.R.	Todo	CMR-Interespecífica	¶	0.02/sitio/Ma	$2.5 \times 10^{-7}$	---
Brown, 1980	PHY	E.R.	Todo	CMR-Intraespecífica	---	1%/Ma*	$2.5 \times 10^{-7}$	180,000
Cann et al. 1987a	PHY	E.R.	Todo	Máxima parsimonia	---	2%/Ma*	$2.5 \times 10^{-7}$	140,000
Cann et al. 1987a	PHY	E.R.	Todo	Máxima parsimonia	---	4%/Ma*	$5 \times 10^{-7}$	290,000
Stoneking et al. 1986	PHY	E.R.	Todo	Máxima parsimonia	---	2%/Ma	$2.5 \times 10^{-7}$	150,000
Stoneking et al. 1986	PHY	E.R.	Todo	Máxima parsimonia	---	4%/Ma	$5 \times 10^{-7}$	300,000
Torrioni et al. 1994a	PHY	E.R.	Todo	Máxima parsimonia	§	2.3-2.9%/Ma	$2.875 \times 10^{-7}$ - $3.625 \times 10^{-7}$	---
Vigilant et al. 1991	PHY	SEC.	HVS-I y II	Máxima parsimonia	4 Ma	11.5%/Ma	$1.4375 \times 10^{-6}$	166,000
Vigilant et al. 1991	PHY	SEC.	HVS-I y II	Máxima parsimonia	6 Ma	17.3%/Ma	$2.1625 \times 10^{-6}$	249,000
Hasegawa y Horai, 1991	PHY	SEC.	HVS-I y II	Proceso de Markov	4 Ma	0.177-0.286/sitio/Ma	$4.425 \times 10^{-6}$ - $7.15 \times 10^{-6}$	280,000 ± 50,000
Stoneking et al. 1992	PHY	SEC.	HVS-I y II	UPGMA	§	$11.81 \pm 3.11\%/Ma$	$2.952 \times 10^{-6} \pm 7.77 \times 10^{-7}$	63,000-356,000
Stoneking et al. 1992	PHY	SEC.	HVS-I y II	Jukes-Cantor (distancia)	§	$11.42 \pm 3.33\%/Ma$	$2.855 \times 10^{-6} \pm 8.25 \times 10^{-7}$	63,000-416,000
Pesole et al. 1992	PHY	SEC.	HVS-I y II	Proceso de Markov	5 Ma	$12 \pm 5/100$ sitios/Ma	$3 \times 10^{-6} \pm 1.25 \times 10^{-6}$	400,000 ± 100,000
Pesole et al. 1992	PHY	SEC.	HVS-I y II	Proceso de Markov	7.5 Ma	$18 \pm 10/100$ sitios/Ma	$4.5 \times 10^{-6} \pm 2.5 \times 10^{-6}$	600,000 ± 200,000
Tamura y Nei, 1993	PHY	SEC.	HVS-I y II	Tamura-Nei (distancia)	4-6 Ma	$1.5 \times 10^{-7}$ - $2.5 \times 10^{-6}$ /sitio/año	$3.75 \times 10^{-6}$ - $6.25 \times 10^{-7}$	80,000-480,000
Templeton, 1993	PHY	SEC.	HVS-I y II	Máxima parsimonia	9.2 Ma	**	---	235,000-554,000
Templeton, 1993	PHY	SEC.	HVS-I y II	Máxima verosimilitud	9.2 Ma	**	---	439,000-844,000
Horai et al. 1995	PHY	SEC.	HVS-I y II	UPGMA	4.9 Ma	$7.00 \times 10^{-8}$ /sitio/año	$1.75 \times 10^{-6}$	143,000 ± 18,000
Horai et al. 1995	PHY	SEC.	HVS-I	UPGMA	4.9 Ma	$10.3 \times 10^{-8}$ /sitio/año	$2.575 \times 10^{-6}$	---
Forster et al. 1996	PHY	SEC.	HVS-I	Redes medias	---	1 trans./275sitios/20,180 años	$4.505 \times 10^{-6}$ trans.	---
Lundstrom et al. 1992	TEO	SEC.	HVS-I	Modelo de coalescencia	---	110%/Ma	$14.3 \times 10^{-6}$	~26,000
Howell et al. 1996	EMP	SEC.	HVS-I y II	Genealógico	---	260%/Ma	$33.8 \times 10^{-6}$	~10,040
Parsons et al. 1997	EMP	SEC.	HVS-I y II	Genealógico	---	2.5/sitio/Ma	$50 \times 10^{-6}$	~6,500

**Tabla MT-1** Estimaciones de la tasa de evolución del mtDNA realizadas con diversos métodos. <sup>a</sup> Tipo: PHY, filogenético; TEO, teórico; EMP, empírico. <sup>b</sup> Variabilidad analizada: E.R., enzimas de restricción; SEC., secuenciación. <sup>c</sup> Fecha de divergencia Hombre-Chimpancé utilizada para calibrar la tasa; Ma, millones de años; ¶, se utilizaron las fechas de divergencia de las diferentes especies analizadas; §, se utilizaron dataciones arqueológicas. <sup>d</sup> Expresada según los autores de cada artículo. Estas tasas no son comparables pues algunas son tasas de divergencia y otras son tasas de sustitución (=evolución), además se han asumido diferentes tiempos generacionales para su estimación; \* no se calculó tasa de evolución, sino que se usaron estimaciones previas; \*\* en el artículo no se expresan las tasas obtenidas. <sup>e</sup> Tasa evolutiva por sitio por generación, asumiendo un tiempo generacional de 25 años. Estas tasas son comparables únicamente para segmentos iguales y son las que se deben utilizar (multiplicando por el número de nucleótidos analizados) para estimar el tiempo de la expansión poblacional en el modelo de Rogers y Harpending (1992). CMR, comparación de mapas de sitios de enzimas de restricción.

---

Por otra parte, Bendall y col. (1996) analizaron 180 pares de gemelos como parte de una investigación sobre los mecanismos de fijación de las mutaciones en el mtDNA humano. Usaron los datos obtenidos en su estudio, junto con datos no publicados de otras poblaciones, para calcular la frecuencia de sitios heteroplásmicos en poblaciones normales y a partir de esta frecuencia y con ayuda de un modelo desarrollado mediante simulación, calcularon que la tasa de divergencia en el segmento hipervariable I de la región de control, está entre  $1.2 \times 10^{-6}$  y  $2.7 \times 10^{-5}$ . Este rango es consistente con las estimaciones calculadas con los métodos filogenéticos anteriormente descritos.

### Métodos empíricos

Medir empíricamente la tasa de evolución del mtDNA significa poder seguir un linaje a través del tiempo, observando la frecuencia a la que se presentan nuevas mutaciones. En un principio se pensó que este tipo de medición de la evolución del mtDNA era imposible debido a la lentitud del cambio evolutivo, pues a pesar de que presenta una tasa rápida, serían necesarios varios miles de años para observar algún cambio, si las estimaciones filogenéticas son correctas. Sin embargo, los estudios con genealogías humanas han demostrado que esto no es exactamente así. Howell, Kubacka y Mackey (1996) en su estudio con familias al que ya nos hemos referido, analizaron una familia australiana que comprende 12 generaciones y 700 individuos relacionados por vía materna, cuya genealogía puede seguirse sin ambigüedad hasta una mujer nacida en 1714 en Londres. Los autores secuenciaron un fragmento de 1200 pb de la región de control de 45 miembros de esta familia y de 4 individuos de un linaje relacionado, encontrando 2 nuevas mutaciones, lo que indica que la tasa de divergencia para esta zona es de 260% por millón de años (significaría una edad del antecesor común de 10,040 años).

Así mismo, Parsons y col. (1997), compararon las secuencias de la región de control de 357 individuos pertenecientes a 134 linajes maternos independientes, abarcando 327 eventos generacionales. Dado que en su estudio encontraron 10 nuevas mutaciones, calcularon una tasa empírica de 1 sustitución por cada 33 generaciones, o de 2.5 sustituciones por sitio por millón de años, asumiendo un tiempo generacional de 20 años. Esta tasa es aproximadamente 20 veces más rápida que las derivadas con análisis filogenéticos y si se utiliza para estimar la edad del antecesor, indicaría que éste vivió hace tan sólo 6,500 años, una fecha claramente incompatible con la antigüedad conocida del hombre moderno.

Para explicar la discrepancia entre las tasas empíricas, también llamadas tasas genealógicas, y las tasas filogenéticas (Tabla MT-1), se han propuesto diversas hipótesis.

---

Por ejemplo, en relación al trabajo de Howell y col. (1996) se ha propuesto que la tasa observada es debida a que el análisis se realizó en una familia afectada por LHON y aunque las nuevas mutaciones encontradas son neutras y se hallan en sitios de la región de control, podría ser que en linajes afectados por esta o alguna otra enfermedad, la tasa de evolución sea mucho más alta. Sin embargo el trabajo de Parsons y col. (1997) comprende muchos linajes normales e independientes, con lo cual este argumento pierde su validez.

También se ha propuesto (Pääbo, 1996) que estos resultados se deben a que los estudios genealógicos revelan únicamente los sitios más inestables (*hot spots*), no obstante 5 de las 10 mutaciones encontradas por Parsons y colaboradores ocurrieron en sitios con bajos niveles de polimorfismo, según su base de datos multirracial que comprende 742 secuencias. Por otra parte, Wakeley (1993) identificó 29 *hot spots* en el HVS-I y sólo una de las dos sustituciones encontradas en esta zona por el grupo de Parsons ocurrió en uno de estos sitios. Howell y col. (1996) opinan que la explicación más sencilla para la discrepancia entre los resultados de los dos métodos, es que las aproximaciones filogenéticas han subestimado substancialmente la tasa de divergencia del mtDNA, y que las tasas más rápidas derivadas del modelo de la coalescencia (Lundstrom et al. 1992) y de su estudio, son más adecuadas. Opinan también que en caso de confirmarse esto, todos los estudios cronológicos y geográficos que se han hecho sobre la evolución humana necesitan ser reevaluados y además, que o bien el origen del hombre moderno es mucho más reciente de lo que se ha planteado o que simplemente el genoma mitocondrial no es fiable como reloj evolutivo (Howell et al. 1996).

Sin embargo, otra explicación más plausible y en la que coinciden los autores de los dos trabajos, es que la evolución de la región de control esté operando bajo condiciones de no-neutralidad, con la consecuencia de que a nivel poblacional se fije una proporción mucho menor de las sustituciones que surgen entre las generaciones, en relación con las que se fijarían por deriva genética. Esto es más claramente explicado por la posibilidad de que algunas sustituciones de la región de control sean ligeramente deletéreas y que con el tiempo sean selectivamente eliminadas de la población, que mantendría de esta forma una baja frecuencia de sustituciones a pesar de una alta tasa de mutación (Parsons et al. 1997). En este sentido, los métodos filogenéticos estarían midiendo la tasa de fijación a nivel de especie o de población, en tanto que los genealógicos la tasa de fijación a nivel de individuo, o como mucho inter- generacional (Howell et al. 1996). Si esto es cierto, ninguna de las dos tasas sería incorrecta, pero no sería adecuado extrapolar la tasa detectada con estudios genealógicos a los estudios filogenéticos, de la misma forma que no sería correcto aplicar la tasa filogenética para estudios genealógicos, ya que cada tasa sería útil para estimar fechas de diferentes rangos. Para comparaciones de secuencias que están cercanamente relacionadas compartiendo un antecesor común en el orden de los cientos o

---

miles de años atrás, las tasas genealógicas se ajustarían mejor y para comparaciones que van más allá de los cientos de miles o millones de años, las tasas filogenéticas serían más apropiadas (Pääbo, 1996). Una conclusión inmediata de esto, es que los estudios forenses de identificación deben utilizar las tasas genealógicas y no las filogenéticas para establecer sus límites de confianza, pues las tasas genealógicas indican una probabilidad mayor de encontrar diferencias en la secuencia de familiares relacionados por vía materna (Parsons et al. 1997), de la misma forma que indicarían una mayor probabilidad de que dos individuos no relacionados pertenecientes a una misma población compartan la misma secuencia mitocondrial (ver Ivanov et al. 1996); con las consecuencias negativas que los dos casos conllevarían en los trabajos de identificación criminal, por ejemplo.

Sin embargo, la diferencia entre las tasas genealógicas y filogenéticas es demasiado grande y el problema reside en decidir qué tasa es apropiada para qué serie de datos en particular (Macaulay et al. 1997). Para resolver este problema, se tendría que investigar si estas dos tasas representan los extremos de un gradiente que sufre una declinación constante desde la tasa genealógica a la filogenética a medida que se retrocede en el tiempo, en cuyo caso podría esperarse la existencia de varias tasas intermedias; o si por el contrario en una primera etapa la tasa disminuye rápidamente mientras la mayoría de las nuevas mutaciones son eliminadas, para después permanecer constante ceñida únicamente a los efectos de la deriva.

Para valorar cual de estas dos opciones es correcta sería necesario conocer los mecanismos y velocidad de fijación de las mutaciones a nivel poblacional, quizá investigando la evolución del mtDNA en el rango de los 500 a los 50,000 años y es aquí donde puede residir la importancia de los estudios basados en el análisis de DNA extraído de restos antiguos, sobre todo si se tiene en cuenta que este rango puede ser perfectamente asequible para este tipo de estudios (Lindahl, 1993b), tema que trataremos más adelante. Esta aproximación permitiría observar a qué velocidad son fijadas las mutaciones en la población después de haber sido fijadas en el individuo, ayudando así a resolver los límites de aplicación de la tasa genealógica y a calcular empíricamente, las tasas intermedias, como la histórica, e incluso la prehistórica en caso de que existan.

No debemos olvidar empero, que para que las dos tasas sean compatibles, debemos asumir que la evolución del mtDNA se aleja de la neutralidad y a continuación revisaremos este punto.

## **Evolución no neutral**



---

La teoría neutral de la evolución, postula que la mayor parte del cambio evolutivo a nivel molecular no es debida a la selección darwiniana sino a la fijación aleatoria de mutaciones selectivamente neutras o casi neutras (Kimura, 1983). Como la teoría neutral considera que los polimorfismos son una fase transitoria de la evolución molecular, también sostiene que la mayoría de la variabilidad intraespecífica al nivel molecular es esencialmente neutra, es decir, que la mayoría de los polimorfismos son mantenidos en las especies por la generación de mutaciones y la extinción aleatoria de éstas y no por razones adaptativas (Kimura, 1983).

La importancia de la teoría neutral en el estudio de la variabilidad genética, radica en que hace predicciones concretas en cuanto al resultado de la evolución en la estructura genética de las poblaciones, predicciones que pueden ser contrastadas. Por ejemplo, bajo condiciones neutras, la cantidad de polimorfismo de DNA mantenido en una población es proporcional al producto del tamaño efectivo de la población y la tasa de mutación; mientras mayor sea el tamaño y menor la presión selectiva, habrá mayor polimorfismo. Por otra parte, como el tamaño efectivo de la población refleja la historia demográfica, la caracterización de los polimorfismos provee un medio para inferir esta historia (Takahata, 1996). Por lo tanto, la existencia de un menor polimorfismo del esperado en una determinada población indicaría que el alelo bajo estudio no ha evolucionado de forma neutral o que a pesar de evolucionar neutralmente, han intervenido otros factores, como una reciente expansión de la población. A este tipo de análisis se le denomina test de neutralidad. Existen diversos tests de neutralidad para probar si la distribución de frecuencias de tipos mitocondriales en una población es consistente con lo que predice la teoría neutral para poblaciones en equilibrio.

La aplicación de estas pruebas a los datos sobre mtDNA humano, indica que las distribuciones observadas difieren significativamente de las esperadas por evolución neutral. Las pruebas de neutralidad de Ewens y Watterson, de Tajima y de homocigidad de Watterson aplicadas a los datos de los análisis con enzimas de restricción del mtDNA humano, indican que la cantidad de polimorfismo existente es menor que la esperada, pues hay un exceso en la frecuencia de los tipos mitocondriales comunes y también en la frecuencia de alelos únicos, mientras que los tipos con frecuencias intermedias estarían subrepresentados, lo que en conjunto implica un exceso de homocigidad (Whittam et al. 1986; Excoffier, 1990; Merriwether et al. 1991).

Estas características indican que la evolución del mtDNA se desvía de la neutralidad, aunque el rechazo de la hipótesis de neutralidad mediante estas pruebas, no necesariamente indica que el mtDNA evolucione bajo presión selectiva, ya que estas pruebas asumen diversos supuestos teóricos que no cumple la población humana. Uno de

---

estos supuestos es que las poblaciones analizadas están en equilibrio con respecto a la ganancia de variantes mitocondriales mediante nuevas mutaciones y la pérdida aleatoria de ellas por deriva genética (equilibrio mutación-deriva). Para explicar pues la variabilidad del mtDNA humano, además de la posibilidad de que exista algún tipo de selección, se debe considerar la posibilidad de que diversos factores hayan podido desviar el estado de equilibrio, como la reciente expansión de la población o la heterogeneidad geográfica que presenta el mtDNA en cuanto a su variación. Estas han sido las explicaciones que han dado los diversos autores que han analizado la variabilidad de los sitios de restricción del mtDNA, al observar la falta de ajuste al modelo neutral (Whittam et al. 1986; Excoffier, 1990; Merriwether et al. 1991), si bien no queda claro si esta falta de ajuste se debe a las condiciones de no-equilibrio (expansión reciente), a la evolución selectiva, o a ambas.

Para superar esta falta de resolución, Nachman y colaboradores (1996) han utilizado datos a nivel de secuencia y han reanalizado, con otro tipo de pruebas, los datos de los polimorfismos de restricción en el mtDNA humano. Estos análisis se basan en la predicción de la teoría neutral de que la cantidad de variabilidad dentro de una especie está en correlación con la cantidad de divergencia entre especies y han detectado que en el mtDNA humano, existe un exceso de sustituciones no silenciosas en relación a las esperadas por las comparaciones interespecíficas bajo condiciones neutras. Debido a que se utilizó el test de McDonald y Kreitman, que no asume que la población esté en equilibrio, estas observaciones no pueden atribuirse a la reciente expansión poblacional, así que Nachman y colaboradores proponen dos hipótesis para explicar esta desviación. En primer término, la posibilidad de que recientemente haya habido un importante relajamiento de la presión selectiva en la especie humana, ya que bajo estas condiciones ciertos polimorfismos que actualmente son observados podrían haber sido deletéreos antes de este relajamiento. Como segunda explicación plantean la hipótesis de que las sustituciones que conducen a cambios de aminoácidos sean ligeramente deletéreas, pudiendo aparecer dentro de las especies como polimorfismos, pero que muy probablemente no llegarán a ser fijadas, por lo que raramente aparecerán como diferencias entre especies.

En opinión de Nachman y colaboradores, la distinción entre estas dos hipótesis es bastante complicada, pues el patrón de exceso de polimorfismos de reemplazo de aminoácidos es similar al observado en el mtDNA de ratones y moscas de la fruta, lo que plantea la duda de si existe un mecanismo general que pueda explicar el mismo resultado en especies diferentes. Sin embargo, tanto los ratones como las moscas de la fruta son especies comensales de los humanos y podrían beneficiarse del mismo relajamiento selectivo aunque no está claro como puede el comensalismo afectar en los cambios de la presión selectiva (Nachman et al. 1996). No obstante, en un trabajo posterior, Nachman analizó el mtDNA de 25 especies animales y sus resultados muestran una generalidad en cuanto a la evolución no

---

neutral del mtDNA animal. Como muchas de las especies analizadas no son comensales de los humanos, opina que la explicación más plausible es la hipótesis de la existencia de polimorfismos que son ligeramente deletéreos y que raramente son fijados (Nachman, 1998).

Así pues, estos resultados establecen que la evolución del mtDNA no es neutral y apoyan la teoría de que las tasas genealógica y filogenética son dos funciones de un mismo proceso, por lo que ninguna de las dos sería incorrecta. Sin embargo, una observación interesante sería la explicación de porqué analizando una región no codificante como la región de control se puede pensar en mutaciones ligeramente deletéreas. Al respecto, Howell y col. (1996) exponen que a pesar de que los segmentos hipervariables de la región de control no codifican para ninguna proteína, si pueden tener alguna otra función en la que participa el D-loop, como la de proveer un sitio de unión con alguna proteína y por lo tanto, algunas mutaciones en esta zona podrían conducir a algún cambio estructural desfavorable para esta función. Además, no debemos olvidar que en el mtDNA todas las zonas y genes están ligados y que un bajo polimorfismo en una región selectivamente neutra con una baja tasa de recombinación es indicador de selección positiva o negativa en locus ligados (Takahata, 1996). De esta forma, la pérdida a través de largos periodos de tiempo de algunas o muchas de las mutaciones observadas entre generaciones en el D-loop, puede deberse a que en las zonas codificantes de algunos linajes ocurra una mutación deletérea, que al ser eliminada por selección evitaría la fijación de los polimorfismos ligados de la región de control.

Por otra parte, sin importar la causa de que la variabilidad del mtDNA se desvíe de la neutralidad, este patrón tiene el potencial de afectar el uso del mtDNA como un marcador neutral en estudios evolutivos y poblacionales (Nachman, 1998). Toda muestra de genes debe exhibir el fenómeno de coalescer en un ancestro común, pero la estimación de este tiempo de coalescencia requiere que la variación genética existente sea interpretada en términos de los modelos de genética de poblaciones. Los supuestos implícitos de estos modelos son que la variación genética es neutral y que la población esta en equilibrio mutación-deriva (Merriwether et al. 1991). La marcada desviación de las predicciones de la teoría neutral en el mtDNA, han conducido a Merriwether y colaboradores a expresar su escepticismo en cuanto a la corrección de aplicar la teoría del reloj neutral para estimar el tiempo de coalescencia de una muestra (Merriwether et al. 1991).

No obstante aún queda la posibilidad de utilizar el reloj molecular pero con el ajuste correspondiente por esta desviación de la neutralidad. Los resultados de Nachman indican que una proporción substancial de substituciones no silenciosas encontradas en humanos nunca llegan a ser fijadas y esto conllevaría a una sobrestimación de la edad del antecesor

---

del mtDNA humano cuando se asume evolución neutral y equilibrio mutación-deriva. En particular, los datos de restricción apuntan a una diferencia de 29.5% entre el valor observado y el esperado, por lo que la edad del antecesor puede estar sobrestimada por un 30%. Esto quiere decir que los cálculos hechos utilizando modelos neutrales, requieren ser ajustados a una edad del antecesor 30% menor (Nachman et al. 1996). Pero no cabe duda que aún se necesita investigar más sobre la evolución no neutral del mtDNA y su influencia en el reloj molecular.

### **Inserciones en el genoma nuclear**

Una característica muy peculiar del genoma mitocondrial, es que en el transcurso de la evolución, han ocurrido transferencias de fragmentos de DNA mitocondrial que se han integrado en el DNA del núcleo celular, en el que permanecen como una forma de pseudogenes. De acuerdo con van der Kuyl y col. (1995) se han observado copias de genes mitocondriales en el genoma nuclear de muchas especies, incluyendo insectos y mamíferos como el gato y el hombre. Mediante el análisis filogenético de estos fragmentos con su equivalente mitocondrial es posible estimar el tiempo transcurrido desde que ocurrió la integración. Por ejemplo, Collura y Stewart (1995) determinaron que hace 30 millones de años ocurrió en la línea evolutiva de los catarrinos una transferencia de un fragmento de al menos 3 kilobases del gen del citocromo *b*, por lo que muy posiblemente lo tengan todos los homínidos incluyendo los humanos. De igual manera, Nomiyama y col. (1985) observaron en humanos secuencias de los genes mitocondriales 16S y 12S (rRNAs), integradas en el núcleo y estimaron que estas integraciones ocurrieron hace 12 y 15 millones de años, respectivamente.

La forma en que el mtDNA es transportado dentro del núcleo, no está clara, pero según Nomiyama y colaboradores se ha observado que a veces las mitocondrias se encuentran en el núcleo de células humanas y de otros mamíferos, lo que podría dar una explicación al respecto. En su opinión, estas mitocondrias intranucleares podrían ser degradadas dentro del núcleo, liberando su DNA que sería integrado en el DNA nuclear por mecanismos similares a los que intervienen en la integración del DNA viral en el DNA nuclear de la célula huésped. De acuerdo a sus datos, no hay indicios de que los fragmentos de mtDNA se integren en sitios específicos del DNA nuclear (Nomiyama et al. 1985).

El problema con estos pseudogenes, es que pueden ocasionar confusión en los estudios filogenéticos (Smith et al. 1992) y pueden ser una fuente insidiosa de contaminación en los estudios de DNA antiguo (Collura y Stewart, 1995; van der Kuyl et al.

---

1995). De hecho, se ha informado que una supuesta secuencia de dinosaurio, es más probablemente contaminación humana, concretamente de una integración nuclear del citocromo *b* (Zischler et al. 1995b).

La presencia de estos pseudogenes también ha confundido los estudios que relacionan las mutaciones mitocondriales con determinadas enfermedades. En 1997 se informó de una correlación entre una mutación heteroplásmica en el gen de la citocromo C oxidasa y la enfermedad de Alzheimer, sin embargo, estudios posteriores han demostrado que estos resultados se deben a que el método de extracción de DNA utilizado (a partir de sangre total) favorece la amplificación de un pseudogene nuclear, siendo éste el que presenta la heteroplasmía, por lo que la supuesta correlación en realidad no existe (Hirano et al. 1997; Taylor et al. 1998). Esto demuestra que la presencia de estas integraciones nucleares conlleva también dificultades significativas a la hora de identificar mutaciones en el mtDNA relacionadas con enfermedades, sobre todo si no se elige el tejido o el método de extracción de DNA adecuado (Taylor et al. 1998).

Por otra parte, las inserciones también pueden ser de utilidad. El grupo de Svante Pääbo, localizó una inserción de la región de control del mtDNA en el cromosoma 11 y la usaron como grupo externo (outgroup) para el análisis filogenético de secuencias de mtDNA. Según su análisis, esta inserción se produjo después de la separación entre las líneas del hombre y del chimpancé y en una fecha muy cercana a la de la existencia del antecesor de todo el acervo mitocondrial humano, pues los chimpancés no la tienen pero si está presente en poblaciones humanas de todo el mundo, aunque no ha sido fijada y se presenta en frecuencias variables. Su valor como grupo externo reside en que no hay tanto tiempo de divergencia evolutiva entre esta inserción y las secuencias de las poblaciones actuales, contrariamente a lo que ocurre con la secuencia del chimpancé, por lo que no se presenta el problema de las sustituciones múltiples que obliteren la información filogenética (Zischler et al. 1995a). Así pues, el buscar y caracterizar estas integraciones del mtDNA en el núcleo puede ser de gran utilidad, tanto para evitar confusiones al analizar DNA antiguo como para incrementar la calidad de la información obtenida con los estudios de la variación del mtDNA en humanos, como concluyen Zischler y colaboradores.

### **Polimorfismos**

La mayoría de los polimorfismos en el mtDNA humano, se presentan en forma de sustituciones puntuales, de las cuales la mayoría son transiciones (Brown, 1980; Cann et al. 1984; Vigilant et al. 1991). Aunque tampoco son raras las inserciones o deleciones, tanto

---

puntuales como de varios pares de bases (Cann y Wilson, 1983). Muchos de estos polimorfismos definen linajes que presentan una especificidad geográfica, en la que los tipos mitocondriales pueden ser compartidos por individuos de una misma población, pero no entre individuos de poblaciones distintas (Brown, 1980; Wallace et al. 1985; Cann et al. 1987a; Vigilant et al. 1991).

Inicialmente se utilizó el análisis con enzimas de restricción para detectar los sitios polimórficos, ya que existen sustituciones que pueden ocasionar la pérdida o la ganancia de una diana de restricción. Este tipo de análisis permite buscar los polimorfismos en todo el mtDNA y como la mayoría de la secuencia es codificante, se obtiene más información de estas zonas que de las no codificantes. Con esta aproximación, Cann y colaboradores (1984) estudiaron el mtDNA de 112 individuos, utilizando 12 enzimas de restricción. Comparando el tamaño de los fragmentos obtenidos con los deducidos a partir de una secuencia de referencia, construyeron mapas de sitios de restricción y descubrieron que con las 12 enzimas utilizadas podían analizar 441 dianas, entre las que encontraron 163 posiciones polimórficas y 278 sitios invariables. En 77 casos, les fue posible especificar la naturaleza exacta y la localización de la mutación responsable de la presencia o ausencia del sitio de restricción. Cabe destacar que este método puede ser más o menos resolutivo dependiendo del número de enzimas utilizadas para el análisis. Por ejemplo, Merriwether y col. (1991) utilizaron 6 enzimas para el análisis del mtDNA de 3065 individuos encontrando tan sólo 81 sitios polimórficos.

El análisis con enzimas de restricción permite detectar también la presencia de inserciones o deleciones, pues dos segmentos homólogos definidos por sitios de restricción no polimórficos, pueden variar en tamaño si en uno de los segmentos ha ocurrido una inserción o delección. De esta forma, Cann y Wilson (1983) detectaron 14 variantes causadas por inserciones o deleciones de alrededor de 6 a 14 pb, en el mtDNA de los 112 humanos analizados. Una de estas deleciones ha resultado ser muy útil como marcador genético, pues es posible que su origen haya tenido lugar en alguna población asiática antigua, ya que se encuentra con alta frecuencia en poblaciones de origen asiático (Harihara et al. 1992). Esta delección de 9 pares de bases está situada en la región codificante V, entre los genes para la subunidad II de la citocromo C oxidasa y para el tRNA de la Lisina y ha sido encontrada también en algunas poblaciones amerindias, evidenciando el proceso migratorio desde Asia hasta el nuevo mundo (Schurr et al. 1990; Wallace y Torroni, 1992).

Posteriormente, el grupo de A.C. Wilson introdujo el análisis directo de la secuencia, aunque restringido únicamente a los dos segmentos hipervariables de la región de control, con lo que se ganó en resolución, pero se perdió la estimación global de la variabilidad que se obtiene con las enzimas de restricción. Mediante la secuenciación de

---

estos fragmentos en 189 individuos de diferente origen geográfico, Vigilant y col. (1991) encontraron 201 sitios polimórficos, 179 definidos por sustituciones de bases y 22 por inserciones/delecciones. Sin embargo, a medida que diversos grupos de investigación han secuenciado estos segmentos en más individuos, se han encontrado más sitios polimórficos. Así por ejemplo, analizando la base de datos compilada por Handt y col. (1998), es posible encontrar 271 sitios polimórficos sólo en el HVS-I, sin contar las inserciones/delecciones (Francalacci et al. 1999). Es importante hacer notar que muchas de estas sustituciones presentan también especificidad geográfica, es decir, que sólo se encuentran en individuos de regiones determinadas, pudiendo ser utilizadas como marcadores. Sin embargo, otras se presentan en individuos de cualquier origen étnico debido quizá a que corresponden a sitios con tasas de mutación muy elevada y por lo tanto pierden su valor filogenético. Estas mutaciones pueden introducir ruido de fondo cuando se intenta reconstruir una filogenia a partir de secuencias de los segmentos hipervariables.

Por otra parte, Antonio Torroni del grupo de Douglas C. Wallace ha continuado trabajando con enzimas de restricción para la detección de los sitios polimórficos. Su método, consiste en la amplificación de 9 fragmentos que comprenden todo el mtDNA, para posteriormente digerirlos con 14 enzimas, lo que permite analizar alrededor del 20% del genoma mitocondrial (Torroni et al. 1992; 1994b). Además, se busca la presencia o ausencia de dianas en sitios específicos utilizando algunas enzimas adicionales (Torroni et al. 1998b). Con este método Torroni y colaboradores han podido identificar sitios polimórficos que han mostrado ser específicos en cada continente, por lo que pueden ser usados como marcadores para estudiar las migraciones a este nivel. Esta aproximación no tiene el nivel de resolución del análisis por secuenciación, pero reduce en cambio, el efecto de los sitios inestables que entorpecen el análisis.

---

## DNA antiguo

Desde los primeros años de la década de los 80, se ha estudiado la posibilidad de recuperar el DNA de los restos preservados de un organismo. Algunos de los primeros trabajos tuvieron un gran impacto en la comunidad científica, pues obtener DNA de restos de gran antigüedad ofrece expectativas únicas en muchas áreas del conocimiento, abarcando todos los niveles de la organización biológica. No obstante, siguiendo a esta primera etapa de optimismo sobrevino un período escéptico, marcado por la dificultad de clonar el DNA obtenido y por las dudas acerca de la validez de algunos trabajos, lo que llevaba a pensar que la presencia de DNA en algunos restos antiguos era poco más que anecdótica e incluso que no se podría constituir una disciplina científica con este tipo de análisis.

Sin embargo, trabajos posteriores han demostrado sin duda, la presencia de pequeños fragmentos de DNA en muy diversos tipos de restos de organismos. A pesar de encontrarse sumamente fragmentados, estos pequeños segmentos de DNA contienen información que puede ser muy útil en estudios de evolución molecular y de reconstrucción filogenética, poblacional, antropológica y arqueológica, sin olvidar la posibilidad de obtener datos del individuo analizado con fines forenses. Así, la recuperación y análisis de DNA de restos preservados natural o artificialmente ha constituido un nuevo campo de investigación científica, denominado “ancient DNA” o DNA antiguo.

### **Historia**

La historia del DNA antiguo, es la historia de la consolidación de una nueva rama del conocimiento, consolidación que se ha fraguado gracias a las investigaciones individuales de científicos pioneros, seguidas por las investigaciones de varios grupos que han trabajado tanto de forma independiente como en colaboración. Pero no sólo los trabajos publicados contribuyen a la formación de una disciplina, sino también las diversas actividades que los científicos interesados realizan conjuntamente. A través de esta sección se intenta dar un panorama de estas dos facetas que han contribuido al fortalecimiento de este campo.

### Trabajos de investigación



---

De acuerdo con Pääbo (1986) fueron unos investigadores chinos los primeros en publicar un artículo referente a la extracción de DNA a partir de los restos mortales de un individuo. El artículo, escrito en Chino, fue publicado en 1981 pero pasó prácticamente inadvertido en el mundo científico occidental. Por este motivo, se considera que la disciplina del DNA antiguo (aDNA) tuvo su origen en 1984, ya que en este año fue publicado en la revista *Nature* el primer artículo que tuvo un gran impacto en la comunidad científica.

Russell Higuchi y Alan C. Wilson de la Universidad de California en Berkeley, obtuvieron DNA a partir de la piel momificada de un cuagga (*Equus quagga*), un miembro de la familia de los caballos ahora extinto (Higuchi et al. 1984). Con el objetivo de determinar si el DNA podía preservarse y ser recuperado después de la muerte de un organismo, examinaron el músculo disecado de un espécimen que tenía 140 años de antigüedad y encontraron que efectivamente era posible obtener DNA, aunque en muy pocas cantidades (el 1% del esperado en músculo fresco) y de bajo peso molecular (<500 pb). Con cierta dificultad, el DNA obtenido fue clonado y mediante una sonda marcada se identificaron los clones que contenían DNA mitocondrial. A partir de estos clones, se obtuvo la secuencia de un fragmento de 229pb que posteriormente fue comparado con una secuencia homóloga de cebra, encontrando que sólo diferían en 12 pares de bases. De acuerdo con los autores, el número, naturaleza y localización de las sustituciones observadas entre los dos especímenes, implicaban que el cambio postmortem en el DNA del cuagga fue nulo o casi nulo. La conclusión fue que estas dos especies estaban cercanamente relacionadas y que tuvieron un antepasado común hace 3-4 millones de años. Esta fue la primera secuencia de DNA determinada de una especie extinta (Higuchi et al. 1984).

Más o menos al mismo tiempo, Svante Pääbo, que en ese entonces estaba estudiando el doctorado en inmunología en la Universidad de Uppsala en Suecia, tuvo la idea de experimentar con momias egipcias para buscar algún contenido de DNA, pues consideró que dichas momias representaban una fuente única de restos humanos antiguos que podría usarse para estudios de genética molecular, ya que la momificación artificial ha sido practicada en Egipto durante miles de años y las condiciones secas del clima han promovido también la momificación natural. Su estudio (Pääbo, 1985a; 1985b), completamente independiente del de los investigadores de Berkeley, comprendió 23 momias y empezó con el análisis histológico de diferentes tejidos de cada una de ellas, utilizando tinciones convencionales y tinciones con bromuro de etidio para detectar DNA. Con éstos métodos identificó la presencia de DNA en el núcleo de células del tejido cartilaginoso del oído externo de una momia y en los tejidos epidérmicos y subcutáneos del rostro de otra. No obstante, cuando extrajo el DNA de esta última encontró que no era posible clonarlo debido a que sus pirimidinas estaban modificadas, hecho que demostró

---

hidrolizando el DNA y analizándolo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Sin embargo, a partir de la piel de una momia de un niño de un año de edad que había presentado excelentes condiciones histológicas, Pääbo extrajo DNA en cantidades de 20µg/g, lo que representa aproximadamente el 5% de la cantidad esperada en tejidos frescos. La mayoría del DNA extraído era de menos de 500pb de acuerdo a su movilidad electroforética, pero una pequeña porción sobrepasaba los 5,000pb. Parte del DNA extraído fue clonado y mediante la utilización de una sonda radioactiva que contenía un miembro de la familia de secuencias repetitivas *Alu*, identificó un clon que contenía un inserto de 3.4 kilobases (kb)<sup>1</sup>. El inserto contenía dos segmentos que habían hibridado con la sonda y uno de ellos fue secuenciado. La comparación de este segmento de 900 pb con una secuencia *Alu* consenso, indicó que no hubo modificaciones significativas en el DNA de la momia después de la muerte.

En opinión de S. Pääbo, estos resultados establecían la viabilidad de clonar con éxito fragmentos substanciales de DNA nuclear de restos biológicos de gran antigüedad. Sin embargo, hizo notar que la mayoría de las muestras analizadas carecían de ácidos nucleicos y también que la preservación general histológica era mejor en las partes periféricas del cuerpo en comparación con los tejidos más internos, hecho que atribuyó al proceso de momificación practicado en Egipto consistente en la inclusión del cuerpo en una agente desecante, el cual podía actuar inicialmente y con mayor velocidad en los tejidos exteriores (Pääbo, 1985a; 1985b). Los resultados preliminares de las investigaciones de Svante Pääbo fueron publicados en 1984, pero los resultados más completos y que alcanzaron mayor trascendencia fueron publicados en sus dos artículos de 1985; particularmente, el artículo publicado en *Nature*, llamó la atención de Alan Wilson, quien invitó a Pääbo a realizar una estancia postdoctoral en su laboratorio (Dickman, 1988), a partir de la cual puede decirse que empezó prácticamente el estudio sobre DNA antiguo (aDNA).

Durante estos años, al menos dos grupos fueron capaces de realizar estudios de aDNA, por un lado Hauswirth y colaboradores analizando restos humanos excelentemente conservados en condiciones anaeróbicas en turba húmeda (Doran et al. 1986) y por otro, el grupo de Franco Rollo investigando muestras de maíz precolombino (Rollo et al. 1988); aunque se encontraron también con grandes dificultades para clonar el DNA recuperado.

Así pues, la extrema dificultad para la clonación del DNA antiguo puso en serios problemas el desarrollo de la disciplina, ya que dificultaba la repetición de los resultados,

---

<sup>1</sup> Un resultado bastante sorprendente a la luz de investigaciones posteriores que determinan la imposibilidad de obtener fragmentos tan grandes y que por otra parte no ha sido repetido.

---

condición primordial para que un estudio pueda considerarse de validez científica (Pääbo et al. 1989; Handt et al. 1994b). Afortunadamente, el desarrollo de la técnica para la replicación *in vitro* del DNA mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa ó PCR, proporcionó una de las herramientas más poderosas en el campo del aDNA, pues permite obtener millones de copias de un segmento determinado a partir de unas pocas moléculas, e incluso en teoría a partir de una sola (Pag. 103).

Poco después de que este método fuese desarrollado, fue utilizado por primera vez en DNA antiguo por Pääbo y Wilson (1988). Con su trabajo pusieron de manifiesto las ventajas que tiene el PCR sobre la clonación bacterial, pues dos substituciones en el mtDNA del cuagga que habían sido observadas anteriormente, no fueron detectadas mediante PCR, lo que indicó que probablemente habían sido producidas por los mecanismos de reparación de las bacterias utilizadas en la clonación. Además destacaron el gran potencial del PCR para la amplificación de DNA en las condiciones que usualmente se presenta en extractos de restos antiguos, ya que a pesar de que existan algunas moléculas con daño molecular, es de esperar que sean amplificadas con menor eficiencia que las moléculas intactas, por lo que el resultado final estará constituido por un número mayor de copias de moléculas intactas. Por otra parte, al ser una técnica *in vitro*, no existen mecanismos de reparación que puedan introducir errores adicionales (Pääbo et al. 1989). En un trabajo posterior, demostraron que a diferencia de la clonación, con el PCR era posible obtener de manera rutinaria secuencias reproducibles (Pääbo et al. 1988).

Otra de las contribuciones importantes hechas en este campo, fue el descubrimiento de la posibilidad de obtener DNA de restos esqueléticos. La importancia de este hecho, radica en que los huesos y los dientes, son los restos más abundantes del registro fósil debido a que resisten más a la degradación en condiciones relativamente normales, lo que permite disponer de gran cantidad de material para estudios genéticos de todo tipo en un amplio rango de especies y antigüedades. Aunque en 1987, Svante Pääbo había hecho notar la trascendencia que podría tener esta posibilidad (Pääbo, 1987), no fue sino hasta 1989 cuando fueron publicados los primeros tres artículos acerca de la recuperación de DNA de restos óseos.

Publicados con pocos días de diferencia, los autores habían realizado sus investigaciones de forma completamente independiente. El menos conocido es un artículo publicado en una revista científica mexicana, por Rocío Vargas, una investigadora del Instituto de Investigaciones Antropológicas de México. En su artículo informa de la recuperación de material genético de restos óseos humanos de entre 650 y 750 años de antigüedad (Vargas, 1989). Por otra parte, investigadores japoneses liderados por S. Horai publicaron un artículo en una revista japonesa, en el que informaban de la recuperación de

---

DNA de restos óseos con antigüedades de 60 a 6000 años (Horai et al. 1989). No obstante, el que tuvo más impacto fue nuevamente un artículo publicado en *Nature*. Los investigadores británicos E. Hagelberg, B. Sykes y R. Hedges recuperaron DNA de huesos de 300 a 5,500 años de antigüedad (Hagelberg et al. 1989).

Erika Hagelberg y sus colaboradores, han hecho contribuciones muy importantes en el área forense, llegando a identificar a través del DNA a una víctima de asesinato, siendo dicha identificación aceptada por un tribunal inglés para la resolución del caso (Hagelberg et al. 1991b), pero también ha hecho otras contribuciones importantes tanto en aspectos metodológicos (Hagelberg et al. 1991a), como en la aplicación de las técnicas de aDNA en la arqueología (Hagelberg y Clegg, 1991) y en la antropología, sobre todo en el estudio de poblaciones de las islas del pacífico (Hagelberg y Clegg, 1993; Hagelberg et al. 1994b; Hagelberg, 1997). Por otra parte, el grupo de Horai, ha utilizado las técnicas de DNA antiguo en el estudio de la afiliación filogenética entre japoneses antiguos y contemporáneos a través del DNA mitocondrial para dilucidar el origen de la población japonesa actual (Horai et al. 1991).

Ahora bien, dentro de los estudios de la preservación del DNA en restos esqueléticos, la posibilidad de recuperar DNA a partir de piezas dentales es particularmente interesante, pues la extrema dureza de los dientes hace que sean todavía más resistentes que los huesos y en consecuencia más abundantes. Es por esto destacable el estudio de Hänni y colaboradores (1990), el primer trabajo publicado sobre la recuperación de DNA a partir de dientes antiguos, en el que se informa de la recuperación de DNA de piezas de 150 a 5,500 años de antigüedad. Análisis posteriores de restos humanos del ámbito forense han demostrado que el DNA puede preservarse en el interior de los dientes en las condiciones más extremas de humedad, temperatura y acidez y en diversos de tipos de suelos (Schwartz et al. 1991; Alvarez García et al. 1996). Más aún, los estudios con restos de mucho mayor antigüedad, informan que el DNA recuperado de piezas dentales es de mejor calidad que el recuperado a partir de huesos o tejidos blandos (Kurosaki et al. 1993; DeGusta et al. 1994; Woodward et al. 1994a; Oota et al. 1995; Zierdt et al. 1996), lo que resalta todavía más la importancia de los dientes en el campo del DNA antiguo. La razón de esta mejor preservación del DNA en los dientes no ha sido estudiada formalmente, aunque se ha sugerido que la composición de la dentina (DeGusta et al. 1994) y la extrema dureza del esmalte (Francalacci, 1995) pueden desempeñar un papel importante en la protección del DNA.

A partir de 1989 se han multiplicado los trabajos referentes a la extracción de DNA antiguo. En ellos, investigadores de distintos países informan de la extracción de DNA de una gran variedad de restos biológicos de diversas especies, desde plantas e insectos hasta

---

seres humanos, pasando por diferentes tipos de aves y mamíferos. En la Tabla MT-2 se puede apreciar los tipos de tejidos de los que se ha obtenido DNA, su antigüedad y los investigadores que han llevado a cabo los experimentos. Algunos de estos trabajos merecen especial atención por sus características metodológicas o por las implicaciones de sus resultados.

En este sentido, podemos destacar el trabajo realizado con especímenes de especies extintas, que brindan la posibilidad de estudiar el genoma de organismos que ya no existen, como los estudios sobre el lobo marsupial (Thomas et al. 1989), o los estudios con las moas (aves no voladoras) de Australia que han permitido clarificar sus relaciones filogenéticas con los kiwis (Cooper et al. 1992). También son de destacar los estudios a nivel poblacional que analizan la variabilidad del mtDNA de forma diacrónica, como el realizado mediante la comparación de un segmento del mtDNA de 43 ratas kanguro preservadas desde 1911 en un museo, con el de 63 especímenes colectados en 1988 (Thomas et al. 1990).

En el aspecto metodológico, podemos citar el trabajo de Höss y Pääbo (1993) quienes adaptaron, para muestras antiguas, un método de extracción de DNA basado en sílice (Boom et al. 1990) y mostraron la potencia del método recuperando DNA de un hueso de 25,000 años de antigüedad, perteneciente a un équido de Alaska (Equus hemionus). También muy importantes han sido los trabajos realizados con muestras de mamut de más de 50,000 años de antigüedad, que han demostrado la reproducibilidad de los resultados en laboratorios independientes (Höss et al. 1994; Taylor, 1996).

En el área forense, además de los trabajos de Erika Hagelberg ya citados, han destacado también los trabajos sobre el método de identificación del sexo basado en el gen de la amelogenina (Akane et al. 1992; Sullivan et al. 1993; Mannucci et al. 1994). Y en cuanto a los estudios de relevancia antropológica, destacan los trabajos con poblaciones autóctonas, como los que informan de la recuperación de DNA a partir de esqueletos de poblaciones indígenas americanas (Stone y Stoneking, 1993; Merriwether et al. 1994; Lalueza et al. 1997), aunque algunos investigadores han sugerido que es necesario mucho más trabajo del habitual para considerar como auténtico el DNA recuperado de restos humanos debido a la gran dificultad tanto para evitar como para detectar la contaminación de las muestras con DNA moderno (Richards y Sykes, 1995; Handt et al. 1996; Kolman y Tuross, 2000), lo que ha generado una de las polémicas que actualmente existen en este campo (Stoneking, 1995; Cooper, 1997; Béraud-Colomb et al. 1997).

---

También de relevancia antropológica, es el importante trabajo realizado por el grupo de Svante Pääbo con muestras de un individuo Neandertal (Kriings et al. 1997), ya que puede contribuir a esclarecer la relación filogenética entre el hombre moderno y los neandertales. No obstante, a pesar de que el rigor metodológico y los múltiples criterios de autenticación utilizados han merecido el reconocimiento de Tomas Lindahl, un científico que ha mantenido una de las actitudes más críticas sobre los estudios de aDNA (Lindahl, 1997), las conclusiones obtenidas en este trabajo no han sido aceptadas del todo, debido principalmente a que están basadas en un único individuo (Clark, 1997; Nordborg, 1998). Sin embargo, diversos investigadores están analizando más individuos (Cooper et al. 1997) y recientemente se ha publicado una nueva secuencia extraída de un niño Neandertal encontrado en un yacimiento del Cáucaso de 29,000 años de antigüedad (Ovchinnikov et al. 2000). De acuerdo con M. Höss (2000) este segundo trabajo es quizá más importante que el primero, ya que provee una corroboración única de la autenticidad de las secuencias de mtDNA de los Neandertales, además de que ofrece un conocimiento más detallado sobre la polémica relación entre los Neandertales y el hombre moderno.

Por otro lado, dentro de los trabajos que más han llamado la atención, se encuentran los que informan de la extracción de DNA de restos de millones de años de antigüedad, siendo no obstante los que han recibido más críticas y han suscitado más polémica.

Organismos / Tipo de tejido	Antigüedad <sup>1</sup>	Referencia
<b>Aves</b>		
Plumas	< 80 años	Ellegren, 1991
Huesos	especímenes de museo	Cooper et al. 1992
<b>Mamíferos</b>		
Piel momificada	140 años	Higuchi et al. 1984
	> 46,000 años	Yang et al. 1996
Tejidos blandos momificados	13,000 años	Pääbo, 1989
Tejidos congelados	> 50,000 años	Höss et al. 1994; Taylor et al. 1996
Huesos	25,000 años	Höss y Pääbo, 1993
	> 47,000 años	Hagelberg et al. 1994a
Coprolitos	200,000 años	Poinar et al. 1998
<b>Humanos</b>		
Piel momificada	2,400 años	Pääbo, 1985b
Cerebro preservado	7,000-8,000 años	Doran et al. 1986; Pääbo et al. 1988
Restos de sangre	2,800 años	Loy, 1992
Tejidos congelados	1475 años	Thuesen y Engberg, 1990
	5,000 años	Handt et al. 1994a
Huesos	650-750 años	Vargas, 1989
	5,500 años	Hagelberg et al. 1989
	6,000 años	Horai et al. 1989
	12,000 años	Béraud-Colomb et al. 1995
Huesos incinerados	Bronce temprano	Brown et al. 1995
Dientes	4,700 años	DeGusta et al. 1994
	5,000 años	Izagirre, 1998
	5,500 años	Hänni et al. 1990
<b>Neandertal</b>		
Hueso	~30,000-100,000 años	Krings et al. (1997)
Hueso	29,000 años	Ovchinnikov et al. (2000)
<b>Dinosaurios</b>		
Huesos fosilizados	80 millones de años	Woodward et al. 1994b
<b>Insectos</b>		
Fijados con formol	> 50 años	Fet y Vezzetti, 1994
Incluidos en ámbar	25-30 millones de años	DeSalle et al. 1992
	120-135 millones de años	Cano et al. 1993
<b>Plantas</b>		
Semillas	980 años	Rollo et al. 1988
	1,000- 3,300 años (RNA)	Venanzi y Rollo, 1990
Semillas carbonizadas	3,000 años	Brown et al. 1994a
Hojas congeladas	5,300 años	Rollo et al. 1994
Hojas fosilizadas	17-20 millones de años	Golenberg et al. 1990; Soltis et al. 1992
Hojas incluidas en ámbar	35-40 millones de años	Poinar et al. 1993
<b>Líquenes</b>		
<u>Umbilicaria cylindrica</u>	> 1,300 años	Gargas et al. 1994
<b>Gusanos</b>		
<u>Fasciola gigantica</u>	? (Fijados con formol)	Herniou et al. 1998
<b>Microorganismos (en restos humanos)</b>		
<u>Yersinia pestis</u>	400 años	Drancourt et al. 1998
<u>Mycobacterium leprae</u>	600 años	Rafi et al. 1994
<u>Mycobacterium tuberculosis</u>	1,000 años	Salo et al. 1994
	3,000-3,500 años	Nerlich et al. 1997
Mycobacterium sp.	5,400 años	Crubézy et al. 1998

**Tabla MT-2** Ejemplos de extracción de DNA en diferentes organismos y tipos de tejido de diversas antigüedades. <sup>1</sup> Los informes de recuperación de DNA de millones de años de antigüedad deben tomarse con precaución (ver texto).

En 1990 se publicó un trabajo sobre la extracción de DNA de una hoja fosilizada de una magnolia del Mioceno, de 17 a 20 millones de años de antigüedad (Golenberg et al. 1990), sin embargo, tales resultados no han podido ser repetidos (Sidow et al. 1991) y

---

han sido criticados (Pääbo y Wilson, 1991; Lindahl, 1993a). De igual forma, se han publicado diversos estudios que informan de la recuperación de DNA de organismos conservados en ámbar, como plantas (Poinar et al. 1993) e insectos de hasta 135 millones de años de antigüedad (DeSalle et al. 1992; Cano et al. 1993), pero que también son motivo de discusión (Lindahl, 1993b; Austin et al. 1997a; Austin et al. 1997b; Sykes, 1997; Walden y Robertson, 1997; Gutiérrez y Marín, 1998) y que incluso se han llegado a considerar un fiasco (Lindahl, 1997). En lo concerniente a restos óseos, se ha informado de la extracción de DNA de huesos que probablemente pertenecieron a dos dinosaurios del Cretáceo de 80 millones de años de antigüedad (Woodward et al. 1994b), aunque este estudio ha sido extensamente rebatido (Allard et al. 1995; Hedges y Schweitzer, 1995; Henikoff, 1995; Zischler et al. 1995b).

Así, en un artículo “clave” para el campo del DNA antiguo<sup>1</sup>, Tomas Lindahl (1993b) opina que este tipo de trabajos han obscurecido los valiosos e importantes estudios sobre DNA moderadamente antiguo y que en vez de proseguir con informes espectaculares sobre DNA más y más antiguo, las investigaciones deberían centrarse en la amplificación de material genético de unos 100,000 años de antigüedad. En su artículo, Lindahl propone una serie de controles y diversos criterios que deberían seguirse en los trabajos de DNA antiguo y señala que los resultados negativos deberían ser también publicados, para poder contar con datos de referencia (Lindahl, 1993b).

Al respecto, podemos destacar un excelente trabajo realizado por J. Austin y colaboradores (1997b), en el que llevan a cabo un estudio sistemático con 12 especímenes de insectos preservados en ámbar y 3 preservados en copal (una resina solidificada que todavía no se transforma en ámbar). Al no encontrar DNA en ninguno de los insectos estudiados, aportan la evidencia más consistente en contra de la conservación del DNA en este tipo de fósiles. Aunque, como los mismos autores apuntan, ningún resultado negativo puede refutar la existencia de DNA antiguo en especímenes preservados en ámbar, su trabajo muestra que la recuperación de DNA geológicamente antiguo a partir de ellos, no es reproducible. Por lo tanto, sugieren que el valor principal de este tipo de fósiles, reside en su excelente preservación morfológica y no en la posible existencia de algunos restos fragmentados de DNA, cuya persistencia en estos insectos sigue siendo en el mejor de los casos, especulativa (Austin et al. 1997b).

### Esfuerzos conjuntos

---

<sup>1</sup> Varias de las sugerencias realizadas en este artículo han sido finalmente llevadas a cabo por diversos grupos de investigación, incluyendo los de E. Hagelberg y S. Pääbo.



---

Como hemos dicho, no solamente los cientos de trabajos publicados han contribuido a consolidar el campo del DNA antiguo, sino también los diversos esfuerzos que con este fin han realizado los científicos que trabajan en esta disciplina. Por ejemplo, cada dos años se han organizado **congresos** dedicados al DNA antiguo (Cherfas, 1991; Sykes, 1991; Fischman, 1993; Sykes, 1993; Williams, 1995), el primero de ellos en la Universidad de Nottingham del 8 al 10 de Julio de 1991 y el más reciente (Ancient DNA V) en la Universidad de Manchester del 12 al 14 de Julio del 2000. En estos congresos se ha puesto de manifiesto los problemas de contaminación con DNA moderno (procedente de tejidos frescos), que a menudo se presentan en los estudios de DNA antiguo y se han establecido ciertas líneas generales que deben seguirse para demostrar la autenticidad del DNA obtenido.

Por otra parte, en 1992 fue creado el **boletín** *Ancient DNA Newsletter*, con el objetivo de comunicar avances relevantes en los procedimientos de laboratorio y análisis de datos y que en 1996 se convirtió en una **revista formal**, denominada *Journal of Ancient Biomolecules*, publicada en Holanda por Harwood Academic Publishers. Así mismo, por iniciativa conjunta de la Unidad Coombs de Computación de la Universidad Nacional Australiana y de Thomas H. Loy del Departamento de Prehistoria de la misma Universidad, fue establecido un **foro de correo electrónico** de amplitud mundial (Internet) el 14 de octubre de 1993. A través de este foro, denominado ANCIENT-DNA-L, los investigadores pueden compartir información y discutir temas de interés común. Las contribuciones son archivadas en una base de datos que se puede consultar a través de Internet en la dirección <http://coombs.anu.edu.au>.

Además, ya se han publicado **libros** dedicados enteramente al DNA antiguo, como el editado por Bernd Herrmann y Susanne Hummel (1994a) en el que participan varios de los investigadores de la “primera generación”.

Como se puede apreciar a través de esta revisión histórica, el campo del DNA antiguo, ha quedado establecido como una disciplina científica, aunque debe considerarse todavía como un campo nuevo y por lo tanto se debe tener presente que los problemas inherentes al propio material y las dificultades metodológicas elevan los costos frente a una rentabilidad reducida, al menos por el momento. También hemos visto que los límites metodológicos del campo no están todavía definidos y que hará falta mucha más investigación para resolver las dos polémicas que existen al respecto, por un lado, la antigüedad real de la que se puede esperar obtener DNA informativo y por otro, la posibilidad de circunvalar los problemas de contaminación que obstaculizan las investigaciones con poblaciones humanas.

---

## **Características fisicoquímicas del DNA antiguo**

El DNA preservado en restos antiguos ha sufrido una serie de procesos desde el fallecimiento del individuo y por lo tanto presenta ciertas características que lo diferencian del DNA procedente de tejidos frescos, a la vez que condicionan la información que se puede obtener de él. A continuación, se hará una revisión de estas características.

### Fragmentación

La mayoría del DNA recuperado de tejidos blandos antiguos consiste de fragmentos que no sobrepasaban los 500 pares de bases, de acuerdo con su migración en gel de agarosa (Higuchi et al. 1984, Pääbo, 1985b; 1986), aunque existen excepciones, como el DNA obtenido a partir de uno de los cerebros humanos encontrados en Windover, que presentaba DNA de alto peso molecular (Doran et al. 1986; Pääbo, 1986). Sin embargo, cuando se utiliza la reacción en cadena de la polimerasa, se observa que en la mayoría de los casos únicamente se pueden obtener fragmentos de menos de 150 pares de bases (Pääbo, 1989), y sólo en algunos restos excepcionalmente bien conservados, como la piel de especímenes de colecciones zoológicas, fue posible amplificar segmentos de hasta 500 pb (Pääbo, 1990). También se ha observado que existe una relación inversamente proporcional entre el tamaño del fragmento a amplificar y la cantidad del producto obtenido (Pääbo et al. 1988). La limitación en el tamaño de los fragmentos que se pueden amplificar por PCR se considera tan característica del aDNA que incluso se considera un criterio de autenticidad; si se obtienen fragmentos más grandes, o no se observa la relación inversamente proporcional anteriormente descrita, sería muy probable que el DNA obtenido esté contaminado con DNA exógeno (Pääbo et al. 1988; Pääbo et al. 1989). No existe una correlación clara entre la fragmentación del DNA y la edad de las muestras, ya que es similar tanto en muestras de 4 años de antigüedad como en muestras de hace 13,000 años, lo que sugiere que la mayor parte de la fragmentación ocurre en los primeros momentos después de la muerte, aunque posteriormente podría producirse de forma más lenta dependiendo del sitio y las condiciones de preservación (Pääbo, 1989).

---

Por otra parte, el DNA extraído de huesos generalmente muestra un alto peso molecular cuando se analiza mediante electroforesis, superando en algunos casos los 10,000 pb (Francalacci et al. 1992; Persson, 1993; Tuross, 1993; 1994; Hagelberg, 1994b), pero igualmente, cuando se ha utilizado la amplificación por PCR, los fragmentos que se han podido obtener son mucho menores, a pesar de ser de mayor tamaño que los obtenidos a partir de tejidos blandos (Hagelberg, 1994b). Algunos investigadores han amplificado fragmentos de 800pb (Hagelberg et al. 1991a) y de hasta 1300pb de mtDNA (Hagelberg, 1994a), no obstante, una revisión bibliográfica, nos muestra que el promedio estaría en menos de 300pb cuando se amplifica mtDNA. Sin embargo, cuando se ha intentado la amplificación de genes nucleares sólo se han podido obtener fragmentos de poco más de 100pb (Hagelberg, 1994a; Hauswirth et al. 1994). Al igual que con los extractos de tejidos blandos, en restos óseos no parece haber una relación entre la eficiencia en la amplificación del DNA con la edad de las muestras analizadas (Hagelberg et al. 1989; Faerman et al. 1995). Las posibles causas de este fenómeno serán discutidas en una sección posterior (Pag. 63).

En cuanto a la discrepancia observada entre el tamaño de los fragmentos que presenta el DNA cuando se analiza mediante electroforesis y el tamaño de los fragmentos que es posible amplificar por PCR, se ha propuesto que se debe a que el daño molecular del DNA antiguo, impide la amplificación de fragmentos más grandes (Pääbo et al. 1989; Rogan y Salvo, 1990; Hauswirth et al. 1994). Esta posibilidad estaría apoyada por las investigaciones en las que se han llevado a cabo experimentos de hibridación con sondas radioactivas, que muestran la existencia de DNA humano de alto peso molecular, de hasta 9 kb en el caso de los restos humanos de Windover (Pääbo, 1986), de los que no ha sido posible amplificar fragmentos tan grandes (Pääbo et al. 1988; Hauswirth et al. 1994).

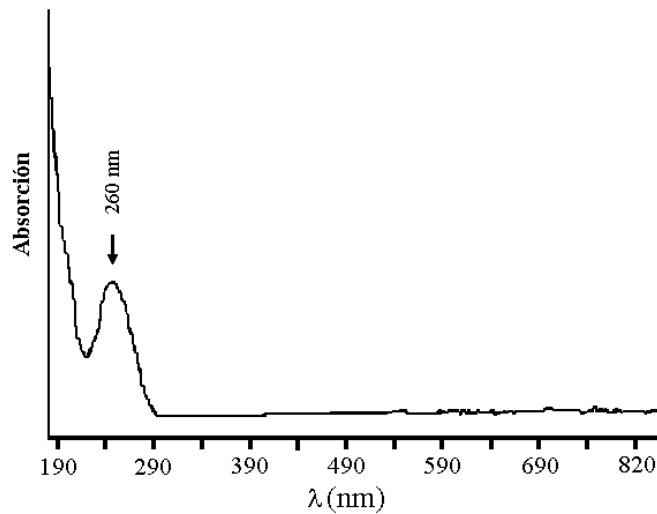
Por otra parte, una explicación general más plausible para la observación de DNA de alto peso molecular en los geles de agarosa, es que proviene de diversos organismos como hongos, algas y bacterias y no del organismo analizado (Pääbo et al. 1988; Hagelberg, 1994b). De hecho, mediante microscopía (óptica y electrónica) se ha observado la presencia de este tipo de organismos en tejidos antiguos (Herrmann y Hummel, 1994b; Schultz, 1997) y utilizando experimentos con PCR se ha probado que una fracción del DNA extraído es de origen microbiano (Höss et al. 1996). No obstante no deja de ser interesante investigar la naturaleza y magnitud del daño molecular, para poder diseñar métodos de reparación del DNA que permitan amplificar segmentos más grandes, como el publicado por Pusch y colaboradores (1998) sobre la reparación de aDNA utilizando DNA polimerasa I y T4 DNA ligasa de E. coli.

---

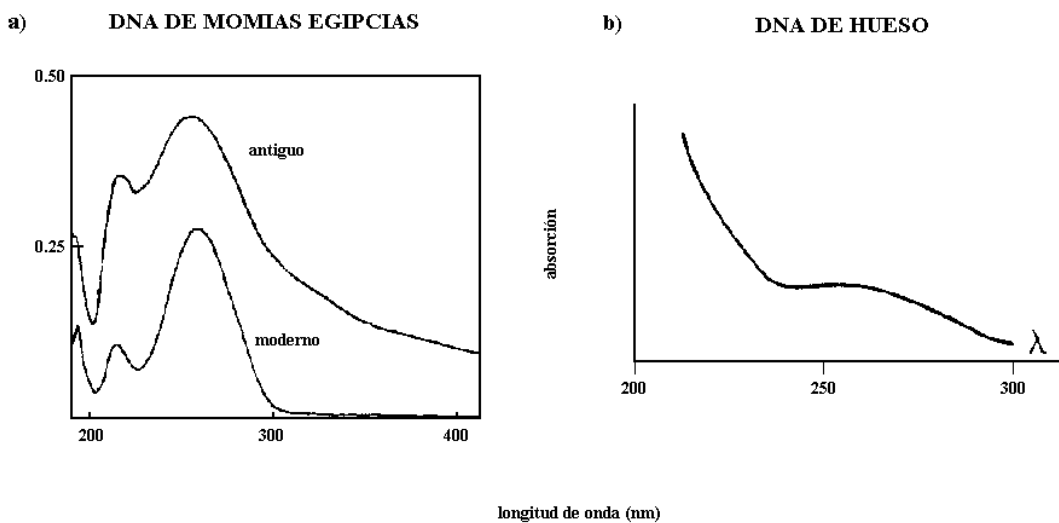
## Daño molecular

Los espectros de absorción de luz ultravioleta (UV) de los extractos de DNA de tejidos frescos (DNA moderno), muestran un pico máximo a 260nm (Fig. MT-1), que corresponde al DNA, aunque también existe absorción a 280nm, que corresponde a las proteínas. La relación entre la absorción a 260 y 280 nm ( $OD_{260}/OD_{280}$ ) es un índice de la pureza del DNA obtenido (Sambrook et al. 1989 p. E.5). Sin embargo el DNA extraído de restos antiguos presenta un espectro de absorción diferente, resaltando principalmente un desplazamiento del pico del DNA hacia una longitud de onda ligeramente menor (Pääbo, 1985a) y en el caso del DNA procedente de tejidos blandos, la presencia de un pico alrededor de los 215nm (Pääbo, 1989). También se ha observado el aumento de la absorción a longitudes de onda menores y mayores, sin llegar a constituir picos independientes (Pääbo, 1985a; Persson, 1992; Tuross, 1994). En la Figura MT-2 se puede observar el espectro de 2 extractos de DNA antiguo publicados por diferentes investigadores (ver también la sección de resultados de esta tesis).

Estas diferencias en el espectro de absorción del DNA antiguo con respecto al moderno, indican que el primero ha sufrido ciertas modificaciones químicas y/o que existen sustancias que acompañan al DNA en los extractos de tejidos antiguos. Las investigaciones indican que el daño molecular en el aDNA consiste de tres tipos principales, el daño oxidativo, la existencia de muescas (nicks) en una de las dos cadenas de varios sitios de longitud (zonas de cadena sencilla) y los puentes cruzados (cross-links) entre moléculas de DNA. Es probable que la mayor parte del daño hidrolítico, que cabría esperar, no sea detectado debido a que este tipo de daño produce principalmente la depurinización del DNA (Lindahl y Nyberg, 1972), que conduce casi inmediatamente al rompimiento de la doble cadena (Lindahl y Andersson, 1972), por lo que el daño hidrolítico sería observado como fragmentación.



**Figura MT-1** Espectro de absorción de luz UV que presenta el DNA en solución.



**Figura MT-2** Espectros de absorción de luz UV de DNA antiguo: a) Pääbo, 1985a; b) Persson, 1992.

Daño oxidativo. El primer estudio del daño que presenta el DNA antiguo, lo llevó a cabo Svante Pääbo (1985a). Analizando el DNA que había obtenido de una de las momias estudiadas, Pääbo liberó todos los nucleótidos del DNA hidrolizándolo mediante incubación a 170°C en ácido fórmico al 90%. Posteriormente separó los productos de la hidrólisis utilizando una columna de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y midió la absorción que presentaban a 260nm. Al comparar la absorción de los nucleótidos que constituían el DNA antiguo con la que presentaban los nucleótidos de DNA moderno tratado en la misma forma, encontró que los picos de absorción eran

---

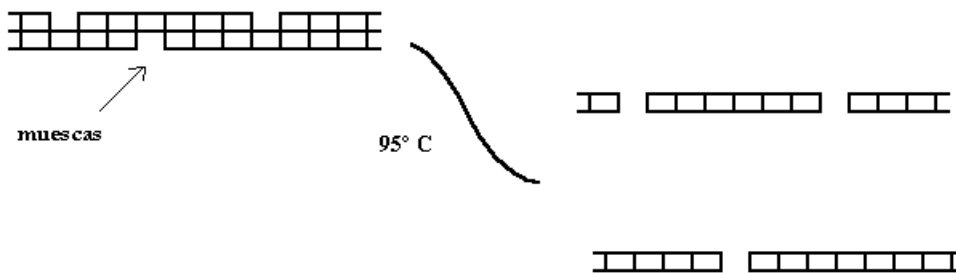
diferentes para algunos nucleótidos. En general, esta comparación indicaba que en el DNA antiguo había ocurrido una modificación o pérdida principalmente de las bases pirimidínicas (Citosina y Timina) y en menor medida de las Adeninas, lo que puede explicar que la absorción máxima del aDNA se desplace hacia longitudes de onda menores. Este daño en las pirimidinas podría ser causado por daño oxidativo, ya que éste afecta más a la pirimidinas que a las purinas (Pääbo, 1986).

También se ha observado que el DNA antiguo es altamente sensible a la alcalinidad, lo cual puede deberse a la existencia de sitios apurínicos/apirimidínicos (AP), así como a modificaciones de los residuos de azúcar. Mediante tratamiento con álcalis y con diversas enzimas se ha comprobado la existencia de más de un sitio sensible a la alcalinidad por cada 20pb, la mitad de los cuales se deben a los sitios AP y la mitad a residuos de azúcar modificados. También se ha observado que en una de cada 10pb existen pirimidinas modificadas. En cambio, la desaminación de las Citosinas no parece tener un papel importante en las modificaciones que sufre el DNA (Pääbo, 1989). En conjunto, estas características demuestran que el DNA antiguo está dañado principalmente por oxidación y de acuerdo con Pääbo (1989), son muy similares a las causadas en el DNA sometido a radiaciones gamma.

Asimismo, los estudios con cromatografía de gas/espectrometría de masa, han demostrado que los derivados hidantoinos de las pirimidinas (5-OH-Hid y 5-OH-5-MeHid) producidos por daño oxidativo son los más comunes y que existe una correlación inversa entre la cantidad de modificaciones de este tipo y la eficiencia en la amplificación del aDNA, lo que no ocurre con la presencia de otro tipo de daños, como el hidrolítico (Höss et al. 1996). Este tipo de modificaciones de las pirimidinas es particularmente problemático, debido a que la *Taq* DNA polimerasa usada en las reacciones de PCR (o cualquier otra polimerasa) no puede copiar estos residuos dañados (Höss et al. 1996; Lindahl, 1997). En el DNA antiguo, el daño oxidativo, puede ser causado tanto por la interacción directa de las radiaciones ionizantes con el DNA, como de forma indirecta a través de los radicales libres creados por estas radiaciones a partir de moléculas de agua (Höss et al. 1996).

Al igual que con la fragmentación, no existe una relación entre la magnitud del daño y la edad de las muestras, tanto en tejidos blandos como en tejidos duros (Pääbo, 1989; Hagelberg et al. 1989; Faerman et al. 1995; Höss et al. 1996) y esto puede deberse a que el daño oxidativo alcance un máximo en un lapso de tiempo relativamente corto, después del cual sólo tendría un efecto adicional mínimo (Pääbo, 1989). No obstante, sí puede estar relacionado con la temperatura de la región donde estén preservadas las muestras, siendo menor a temperaturas más bajas (Höss et al. 1996).

Muestras o “Nicks”. En otro de sus trabajos, S. Pääbo (1986) observó que el tratamiento del DNA con una nucleasa específica para DNA de cadena sencilla, incrementaba la eficiencia en la clonación del DNA. Esto indica que el DNA extraído de restos antiguos, puede contener “nicks” de varios sitios de longitud formando zonas de cadena sencilla que impiden la clonación. El tratamiento del DNA con polimerasa I (Pol I), que debería reparar estas zonas, no incrementa la eficiencia en el clonaje, debido probablemente a las modificaciones de las pirimidinas que son capaces de bloquear la replicación del DNA y por lo tanto la función de la polimerasa. Sin embargo, el tratamiento secuencial con Pol I y la nucleasa mencionada, incrementa en gran medida la eficiencia en el clonaje. Esto puede indicar que la polimerasa I replica el DNA hasta los sitios con pirimidinas modificadas, en los que se detiene dejando zonas de cadena sencilla de uno o



**Figura MT-3** Las muecas en el DNA provocan una mayor fragmentación durante el primer paso de desnaturalización en el PCR. más nucleótidos de longitud, que pueden ser accesibles a la endonucleasa específica para cadena sencilla. De esta forma, la digestión con esta nucleasa después del tratamiento con polimerasa I puede producir fragmentos más grandes libres de las zonas de cadena sencilla que inhiben la clonación (Pääbo, 1986). Por otra parte, el tratamiento del aDNA con DNA polimerasa I y T4 DNA ligasa incrementa la eficiencia en la amplificación por PCR, lo que indica que la presencia de “nicks” afecta también a este procedimiento. El primer ciclo de PCR implica la desnaturalización del DNA y si los nicks no son reparados, la separación de las hebras conduce a una mayor fragmentación (Fig.MT-3). La Pol I rellena las muecas, trasladando los nicks (nick translation) y los huecos finales son cerrados por la T4 DNA ligasa (Pusch et al. 1998).

Puentes cruzados. Mediante microscopía electrónica, se ha observado que en el DNA antiguo existen muchas estructuras producidas por la formación de puentes

---

cruzados DNA-DNA (intra- e ínter-moleculares) y en menor medida algunas estructuras complejas que aparentemente consisten de grandes cantidades de DNA condensado y unido por puentes cruzados (Pääbo, 1989). Estas estructuras pueden afectar las estimaciones electroforéticas de la distribución de los tamaños del DNA (Pääbo, 1990) y se ha sugerido que es debido a ellas la observación de DNA de alto peso molecular en los geles de agarosa y no a que existan fragmentos de miles de pares de bases de longitud, como podría suponerse (Francalacci et al. 1992; Tuross, 1993; Francalacci, 1995). La formación de puentes cruzados DNA-DNA es favorecida por la depurinización del DNA (Lindahl y Nyberg, 1972), así que podrían ser un indicio de daño hidrolítico.

### Cuantificación del aDNA

En los estudios con DNA moderno la cuantificación del DNA se realiza midiendo la absorción de luz UV a 260 nm, o bien, midiendo la fluorescencia que emite el DNA cuando se utilizan marcadores fluorescentes que se intercalan entre las bases (ej. Sambrook et al. 1989 p.E.5), sin embargo, los compuestos que acompañan al DNA antiguo pueden interferir en las mediciones de absorción o emisión de luz y el daño del DNA puede impedir la intercalación de los marcadores, por lo que todas las cuantificaciones en aDNA deben considerarse como tentativas (Pääbo, 1989). Las estimaciones del DNA extraído de tejidos blandos antiguos indican que es posible obtener de 1 a 200 µg por gramo de tejido (Higuchi et al. 1984; Pääbo, 1985b; Doran et al. 1986; Pääbo, 1989). En cuanto al DNA procedente de tejidos duros, las estimaciones oscilan entre 0.2 y 50 µg/g en huesos (Hagelberg et al. 1989; Hagelberg y Clegg, 1991; Tuross, 1994; Zierdt et al. 1996) y entre 2 y 10 µg/g en dientes (Hänni et al. 1990; Zierdt et al. 1996).

Sin embargo, los métodos utilizados para estas estimaciones, miden la cantidad de todo el DNA que hay en la solución, sin importar si proviene del mismo individuo o de organismos diferentes. No obstante, existen métodos basados en la utilización de sondas marcadas, ya sea radiactivamente o con fluorescencia, que permiten la cuantificación selectiva del DNA. Una alícuota del DNA que se pretende analizar, se inmoviliza en un soporte sólido (ej. nitrocelulosa) y después se realiza una reacción de hibridación con la sonda marcada, que se unirá al DNA inmovilizado con mayor o menor especificidad según sean más o menos estrictas las condiciones de la reacción. Después de eliminar la cantidad de sonda que no se ha podido hibridar, se mide la intensidad de la señal en el soporte sólido, que será proporcional a la cantidad de DNA que existe en la preparación.



---

Este método permite estimar la cantidad de DNA de la misma especie a la que pertenece la sonda, sin ser influido por la presencia de DNA de otras especies, por lo que se considera un método de cuantificación específico. Pues bien, cuando se han utilizado sondas específicas para cuantificar el DNA antiguo, se ha observado que la sonda sólo hibrida con una muy pequeña fracción del DNA obtenido, lo que puede indicar que la mayoría del DNA no pertenece al individuo en estudio, o que el extenso daño que presenta el DNA interfiere en la hibridación, produciendo un resultado erróneo.

Así, las estimaciones con sondas de repeticiones *Alu* y  $\alpha$  en los extractos de DNA de tejidos blandos humanos, indican que tan sólo del 0.01% al 0.02% del total extraído pertenece al individuo analizado<sup>1</sup> (Pääbo, 1989; Thuesen y Engberg, 1990; Nielsen et al, 1994). Así mismo, Doran y col. (1986) utilizando una sonda para mtDNA, encontraron que solamente el 0.05% del total extraído era mtDNA, cuando en las extracciones de DNA de tejidos frescos, el mtDNA suele representar del 0.5 al 1% (Doran et al. 1986). Por otra parte, cuando se analizan especímenes extinguidos, no es posible contar con DNA de la misma especie para construir la sonda, sin embargo, si es posible utilizar DNA de especies relacionadas filogenéticamente. Höss y col. (1996) utilizaron esta aproximación para cuantificar el DNA extraído de milodonte y de mamut y encontraron que solo una milésima parte del DNA obtenido pertenecía a los individuos analizados, de acuerdo a la magnitud de la hibridación.

En lo referente a restos óseos, Brown y Brown, (1992a) utilizaron sondas *Alu*, y estimaron que en promedio 4 ng de DNA por gramo de tejido era endógeno, lo que podría representar del 0.008% al 2% del total extraído. Sin embargo, otros investigadores han estimado que tan sólo el 0.001% del DNA obtenido a partir de hueso pertenece al individuo en estudio (Thuesen y Engberg, 1990; Nielsen et al. 1994). Los experimentos con sondas específicas para mtDNA, indican un promedio de 3ng por gramo de tejido óseo (Brown y Brown, 1992a). Estas estimaciones no han sido llevadas a cabo con DNA extraído de dientes, pero la mejor eficiencia que presenta en la amplificación, podría indicar que en los dientes, las sondas hibridarían con una fracción mayor del DNA.

Algunas observaciones pueden ayudar a esclarecer si la baja hibridación específica se debe al daño molecular o si por el contrario es debida a que sólo una pequeña parte del DNA pertenece al individuo estudiado. Por ejemplo, se ha observado que la mayoría del DNA recuperado, presenta el mismo tipo de daño molecular, al punto de que podría esperarse que sólo una fracción menor del 1% esté intacta (Pääbo et al.

---

<sup>1</sup> Aunque pueden existir trazas de DNA contaminante de otro individuo de la misma especie, es de esperar que las cantidades en las que se presenta no sean suficientes como para ser detectadas con este método.

---

1989). Además, Höss y col. (1996) encontraron una correlación negativa entre la cantidad del daño en todo el DNA de la preparación y la capacidad de amplificación de DNA endógeno.

Todo esto podría ser explicado si en realidad la mayoría del DNA extraído pertenece al individuo analizado, pero que al estar tan dañado, no permita la hibridación de las sondas. Otra posibilidad, sin ser excluyente, es que gran parte del DNA de las muestras provenga de microorganismos que colonizaron los tejidos poco tiempo después de la muerte. Tal DNA microbiano sería de origen antiguo y podría esperarse que estuviese dañado en grado similar al DNA endógeno (Höss et al. 1996). Esta segunda posibilidad estaría apoyada por el trabajo de Nielsen y colaboradores (1994), quienes observaron que el DNA de una momia humana, marcado radioactivamente, hibridaba fuertemente con el DNA de la misma momia, mostrando su integridad química, pero la hibridación era muy débil cuando se probaba con DNA moderno de placenta; indicando que la mayoría del DNA de la momia no era de origen humano. Sin embargo, es necesario más trabajo para clarificar este punto.

Existen otros métodos de cuantificación del DNA que están basados en la técnica de PCR, no obstante, el daño molecular y la presencia de sustancias que interfieren en la reacción pueden ocasionar que no se obtengan estimaciones precisas. Estos métodos, serán expuestos con detalle en otra sección (Pag. 126).

### **Degradación orgánica y preservación del DNA**

La muerte de los organismos conlleva la privación del oxígeno para los tejidos provocando el fallo del metabolismo celular y de los mecanismos de reparación, lo que finalmente conduce a la descomposición de los tejidos. El proceso se inicia con la interrupción de la biosíntesis, lo que ocasiona la ruptura de las membranas, liberando una serie de enzimas hidrolíticas que comienzan a desnaturalizar las moléculas y membranas restantes. A este proceso autodestructivo se le conoce como autólisis. Después de la autólisis, la degradación continúa con el rápido crecimiento de las bacterias que comúnmente habitan en el intestino de los animales y posteriormente con la intervención de diversos organismos, como hongos y bacterias del suelo, plantas, insectos y animales carroñeros que finalmente llevan los restos a la descomposición. La velocidad de la descomposición, depende de factores como temperatura, pH, disponibilidad de oxígeno y la presencia de agua, pero a medida que el cuerpo se reduce a los tejidos duros, la descomposición comienza a asumir un carácter diferente, pues la degradación química de los tejidos duros ya no es iniciada por los organismos, sino que depende cada vez más del

---

equilibrio químico entre los tejidos y el suelo o el medio acuoso donde se encuentran. Es por esto que en determinados ambientes el proceso de descomposición se retrasa e incluso puede permitir la fosilización (Gill-King, 1997).

### Conservación de los tejidos

La destrucción de los tejidos blandos puede ser disminuida o interrumpida en cualquier estadio de la descomposición por factores ambientales o por tratamientos artificiales. Una rápida pérdida de humedad puede inducir la momificación natural deteniendo la degradación hidrolítica y en el caso de la momificación artificial, las sustancias químicas como asfalto, natrón, alcohol o formaldehído pueden disecar los tejidos o desnaturalizar las enzimas e interrumpir el crecimiento de los microorganismos.

También los ambientes húmedos pueden permitir la completa conservación del organismo, si cuentan con las condiciones adecuadas, como la presencia de gran cantidad de sales, o la falta de oxígeno en combinación con una concentración elevada de ácidos húmicos. Las propiedades fenólicas de los ácidos húmicos inactivan las enzimas de la autólisis (Hummel y Herrmann, 1994; Parsons y Weedn, 1997). Algunas condiciones acuosas pueden también favorecer la preservación de ciertos tejidos induciendo la formación de adipocera mediante la saponificación de las grasas, especialmente en el caso del tejido cerebral, por su alto contenido de mielina (Gill-King, 1997). Esto es lo que pudo haber ocurrido con los cerebros encontrados en Windover, que presentaban un excelente estado de conservación (Hauswirth, et al. 1994). Así mismo, el congelamiento también puede retardar la descomposición reduciendo la actividad enzimática y bacterial. En ambientes naturales, estas condiciones se encuentran en suelos de permafrost o en las regiones árticas y dentro de los glaciares, donde se han encontrado diversos organismos bien conservados (Nielsen et al. 1994).

Por otra parte, a pesar de la completa destrucción de los tejidos blandos, aún pueden conservarse los restos esqueléticos, cuya dureza y bajo contenido de agua y de enzimas, los hacen más resistentes (Hummel y Herrmann, 1994), siempre dependiendo de las condiciones del sitio donde se encuentren, como ya se ha mencionado.

### Preservación del DNA

---

El potencial de preservación de los biopolímeros y de otras biomoléculas, varía considerablemente de acuerdo a su estructura molecular, el ambiente de deposición de los organismos y su historia diagenética (Eglinton y Logan, 1991). Estructuralmente, el potencial de preservación del DNA es muy reducido, pues depende casi por completo de la estabilidad de los puentes fosfato-éster (Eglinton y Logan, 1991), por lo tanto requiere de condiciones diagenéticas y tafonómicas adecuadas para su preservación.

La observación de que el grado de fragmentación del DNA es el mismo en muestras recientes que en muestras de más de 10,000 años de antigüedad, indica que la mayor parte de ella se produce durante la autólisis (Pääbo, 1989). Por lo tanto, si el proceso degradativo es detenido en esta fase, el DNA tendrá mayores posibilidades de ser conservado. De hecho, en los restos momificados, la preservación histológica es mejor en los tejidos blandos superficiales que en los tejidos blandos internos, pues en los primeros se interrumpe antes la hidrólisis al secarse con más rapidez, al grado de que en los tejidos superficiales se han podido observar núcleos celulares, en los que presumiblemente se encuentra el DNA (Pääbo, 1985b). Asimismo, las condiciones húmedas adecuadas podrían detener todavía más rápidamente la autólisis, pues las muestras encontradas en Windover, conservadas en condiciones húmedas, muestran la persistencia de DNA de alto peso molecular.

Algo ligeramente diferente debe ocurrir en los tejidos duros, pues a pesar de que la autólisis y la degradación microbiana termine con los tejidos blandos, el DNA se conserva en mejores condiciones en los huesos y dientes, en los que también han sido observados núcleos celulares (Hagelberg et al. 1991a; Cipollaro et al. 1998) y mitocondrias (Herrmann y Hummel, 1994b). Podría ser que en los tejidos duros, cada osteocito o cementoblasto sea sometido a un proceso rápido de “momificación celular”, ya que presentan un contenido de agua y enzimas comparativamente menor; además, estas células están protegidas contra la degradación física y bioquímica producida por los microorganismos al estar completamente rodeadas por la matriz mineral (Hummel y Herrmann, 1994).

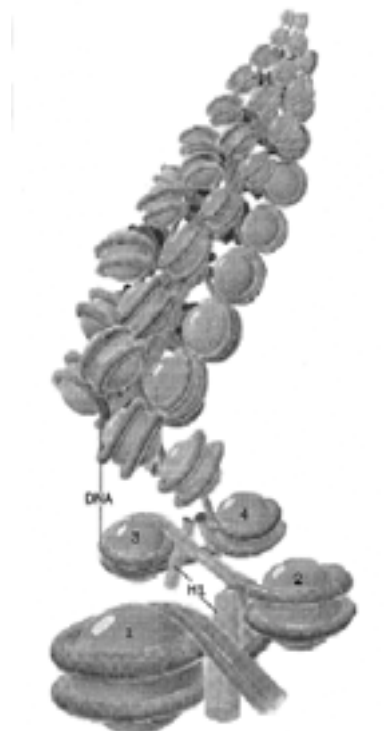
Por otra parte, también se ha propuesto (Persson, 1992; Tuross, 1993; Nielsen et al. 1994) que el DNA se preserva mejor en estos tejidos debido a su alto contenido de hidroxiapatita (una forma insoluble de fosfato de calcio). El DNA presenta una gran afinidad por este compuesto (Sambrook et al. 1989 p. E.30) al que podría unirse con rapidez, quedando protegido de las enzimas. La dentina presenta un mayor contenido de hidroxiapatita que el hueso y esto podría explicar porqué el DNA sobrevive mejor en los dientes (DeGusta et al. 1994). De cualquier manera se debe tener presente que para que esta unión se lleve a cabo, el DNA tiene que ser liberado del núcleo, así que si esta hipótesis es

---

cierta, la preservación del DNA en los tejidos duros podría ocurrir incluso en condiciones que no permitan la preservación de la estructura celular.

Esto sugiere que los métodos de extracción deberían considerar el tipo de tejido y dónde se encuentra el DNA dentro de él. Así por ejemplo, en tejidos momificados artificialmente, los métodos deberían incluir pasos que permitan la eliminación de los agentes conservativos, además de los que provoquen la lisis celular y la degradación de las proteínas (ej. Hall et al. 1992). En el caso de huesos y dientes lo importante sería valorar hasta que punto se encuentra el DNA en el interior de los núcleos de osteocitos o cementoblastos “momificados” o unido a la hidroxiapatita y consecuentemente utilizar el método adecuado, tema sobre el que volveremos en una sección posterior.

Otra de las teorías acerca de porqué el DNA sobrevive a la degradación endógena, fue propuesta por Kelman y Moran (1996) basándose en la observación de que los fragmentos de DNA nuclear que se han podido recuperar mediante PCR son invariablemente de alrededor de 100 pares de bases, sin importar la procedencia o la antigüedad de los restos y en el hecho de que el DNA nuclear de los eucariotas se encuentra en forma de cromatina, cuya unidad básica son los nucleosomas, que a su vez consisten de una cadena de DNA de alrededor de 160pb e histonas asociadas (Fig. MT-4). Según su teoría, el DNA que rodea el núcleo del nucleosoma (octámero) quedaría protegido de la acción enzimática, pero el DNA que une los nucleosomas entre sí, llamado DNA de enlace o DNA “linker”, quedaría expuesto a la degradación autolítica.



---

**Figura MT-4** Modelo propuesto para el filamento de la cromatina. El nucleosoma (1,2,3,4) consiste de un núcleo proteico rodeado por una cadena de DNA. Tomado de Voet y Voet, 1992.

De esta forma, el tamaño de los fragmentos de DNA nuclear extraído de fuentes antiguas reflejaría la longitud del DNA protegido por los nucleosomas.

En lo referente al DNA mitocondrial, Kelman y Moran (1996) han hecho notar que aunque las mitocondrias, al igual que los cloroplastos y los procariotas, no tienen histonas, su DNA está asociado a proteínas parecidas a las histonas (histone-like). Como hemos mencionado con anterioridad, dentro del organelo, el mtDNA está organizado en centros diferenciados llamados nucleoides, constituidos por DNA y proteínas de unión (binding proteins), que tienen la capacidad de cambiar la conformación del DNA.

El tratamiento con DNasa I del mtDNA *in organelo* y del mtDNA de los nucleoides purificados, muestran claramente que la presencia de proteínas asociadas con el mtDNA en los nucleoides contribuye a incrementar de 2 a 3 veces la resistencia a la DNasa I, en comparación con la que exhibe el mtDNA desproteínizado (Newman et al. 1996). En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se ha caracterizado una de estas proteínas de unión, llamada Abf2p y las estimaciones de su abundancia indican que en la mitocondria existe cantidad suficiente de esta proteína como para unirse a cada 30pb del mtDNA (Newman et al. 1996). En la célula mitocondrial animal, incluyendo la humana, existe una proteína similar denominada factor de transcripción 1 (mtTF1). Al igual que la Abf2p de las levaduras, el mtTF1 puede introducir cambios significativos en la conformación del DNA y superenrollamientos negativos. Estos cambios incluyen el plegamiento del DNA, presumiblemente alrededor de múltiples moléculas de mtTF1 en un complejo proteína-DNA esencialmente inespecífico, que puede conferir cierta protección contra la acción de la DNasa I (Fisher et al. 1992).

Además, en la membrana mitocondrial parece existir la maquinaria de proteínas que provee de sitios de unión entre la membrana interna y el mtDNA durante la replicación y la segregación del genoma. Esta interacción ha sido observada en las mitocondrias de levadura y de ratas e incluso en el DNA de bacterias y cloroplastos (Cho et al. 1998). Una proteína de la membrana, denominada Yhm2p, ha sido caracterizada recientemente en *Saccharomyces cerevisiae*. Es una proteína integrada en la fracción interna de la membrana, que *in vitro* presenta una actividad general de unión al DNA y que además es también un componente de la estructura del nucleoide (Cho et al. 1998). Proteínas como ésta podrían ser liberadas de la membrana durante la autólisis y al unirse al DNA lo protegerían de la degradación. La abundancia de este tipo de proteínas podría explicar porqué el DNA mitocondrial persiste en fragmentos más grandes que el DNA

---

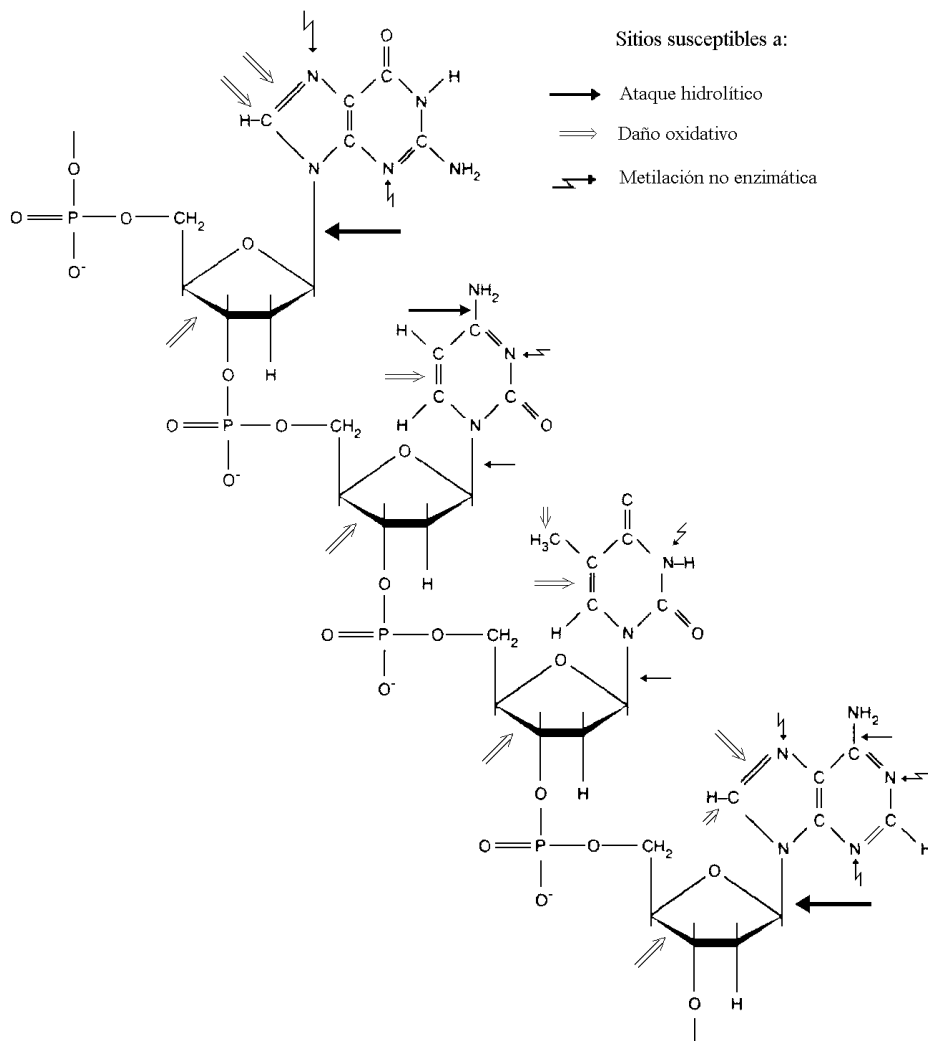
nuclear, además de que existen muchas más copias de cualquier segmento de mtDNA por célula.

Otros mecanismos pueden estar involucrados en la protección del DNA en los ambientes inmediatos a la muerte, como la inhibición de la función enzimática debida a sustancias químicas orgánicas (tocoferoles y flavonoides) liberadas durante la degradación, o la misma conformación del DNA, que con plegamientos a nivel de estructura terciaria podría obtener cierta protección (Yang, 1997).

De cualquier forma, una vez detenido el proceso autolítico y la degradación microbiana responsables de la mayoría de la fragmentación, el DNA que haya podido sobrevivir queda expuesto al efecto de otro tipo de daños. Los estudios *in vitro* en soluciones acuosas, demuestran que el DNA es una molécula químicamente inestable que decae espontáneamente, principalmente debido al daño hidrolítico que puede romper el enlace fosfodiéster entre la base nucleotídica y un residuo de azúcar, liberando las bases de los nucleótidos (Lindahl, 1993a). Esta ruptura ocurre más frecuentemente en las purinas (Lindahl y Nyberg, 1972), creando en el DNA sitios sin base muy susceptibles a la ruptura de la doble cadena (Lindahl y Andersson, 1972). El daño hidrolítico puede ocasionar también la desaminación de la Citosina convirtiéndola en Uracilo y en menor medida de la Timina para convertirla en Hipoxantina. Estos y otros procesos como el daño oxidativo, ocurren espontáneamente en condiciones acuosas (Fig.MT-5) y podrían acumular modificaciones en el DNA de los restos de organismos que ya no cuentan con los mecanismos celulares de reparación, sobre todo si el DNA se encuentra completamente hidratado (Lindahl, 1993a).

Sin embargo, de acuerdo con Lindahl, en los restos mantenidos a bajas temperaturas o los que consigan una deshidratación parcial del DNA y la exclusión de oxígeno, la estabilización del DNA podría incrementarse reduciendo el proceso de la depurinización hidrolítica (Lindahl, 1993a). En efecto, las investigaciones de Pääbo (1985a; 1989) y de Höss y colaboradores (1996), demuestran que en un rango de 4 a 50,000 años, el daño oxidativo es el principal responsable de las modificaciones que presenta el DNA (Pag. 57) y esto sugiere que las condiciones que permiten la preservación de los tejidos, ralentizan también el daño hidrolítico. Más aún, muchas de las muestras de mayor antigüedad de las que ha sido posible recuperar DNA de forma reproducible, provienen de organismos preservados en sitios de baja temperatura; tal es el caso de los diversos ejemplares de Mamut lanudo (Höss et al. 1994; Hagelberg et al. 1994a; Taylor, 1996; Yang et al. 1996) y de los restos de uno de los individuos Neandertal de los que por el momento ha sido posible recuperar mtDNA (Cooper et al. 1997). Además, métodos como la cromatografía de gas/espectrometría de masa y la

racemización de aminoácidos, indican una mejor preservación molecular en muestras de regiones frías (Höss et al. 1996; Poinar et al. 1996).



**Figura MT-5** Sitios susceptibles a la degradación intracelular. Se muestra un segmento de DNA con las cuatro bases (de arriba hacia abajo: guanina, citosina, timina y adenina). Los sitios más importantes son mostrados con flechas de mayor tamaño. En el DNA antiguo se acumulan los daños hidrolítico y oxidativo, pero no los residuos metilados. Tomado de Lindahl, 1993a.

Ahora bien, ¿qué posibilidades tiene el DNA de sobrevivir por períodos geológicos de tiempo en restos fosilizados? De acuerdo con Edward Golenberg (1994b) la asociación íntima del DNA, con moléculas más resistentes puede protegerlo de la degradación, por lo que un alto grado de preservación de la estructura celular y



---

subcelular en los fósiles sería una condición necesaria, aunque no suficiente, para la presencia de DNA (ver también Eglinton y Logan, 1991). Muchas estructuras pueden aparentar que han sido mantenidas debido al remplazo de las biomoléculas originales por la mineralización, pero en estos casos la preservación de la estructura no necesariamente refleja la preservación biomolecular. Sin embargo, Golenberg apunta que desde 1912 muchos investigadores han informado de la observación de células nucleadas en varios tipos de restos fosilizados, así como de cromatina, cloroplastos y mitocondrias, algunos de ellos sugiriendo la preservación orgánica efectiva. A pesar de que estos informes no se pueden tomar como evidencia de la presencia de DNA, indican que está abierta la posibilidad de encontrar fósiles de una variedad de edades que contengan DNA (Golenberg, 1994b).

Por otra parte, cabe la posibilidad, al menos en teoría, de que no sea necesario que se conserve la estructura celular para la preservación del DNA, pues el DNA libre podría unirse a la hidroxiapatita. Más aún, se ha informado de la capacidad del DNA para asociarse con superficies minerales (montmorilonita, kaolinita, feldespato y cuarzo entre otros) y que esta unión puede conferirle una protección hasta 100 veces mayor contra la DNasa I, en relación a la del DNA en solución, sin afectar su capacidad para transformar bacterias (Lorenz y Wackernagel, 1987; Romanowski et al. 1991; Alvarez et al. 1998). Por lo tanto, podría ser que el DNA no se perdiera con la mineralización de los tejidos durante el proceso de fosilización, pues sería adsorbido en los minerales que reemplazan a las biomoléculas. Asimismo, también se ha descrito que el DNA puede unirse con los ácidos húmicos sin perder su capacidad para la transformación de bacterias e incrementando su resistencia a la DNasa I (Crecchio y Stotzky, 1998).

En conjunto, estos datos sugieren que el DNA de los organismos podría integrarse en genomas bacterianos y si estas bacterias tienen la capacidad de responder a los ambientes hostiles con el mecanismo de la esporulación, el DNA podría permanecer protegido por mucho más tiempo del previsto, ya que las condiciones para la conservación del DNA en las esporas son en verdad excepcionales (Lindahl, 1993a). Sin embargo, si la frecuencia con la que todo este proceso puede ocurrir es muy reducida, la reproducibilidad de los resultados será difícil y la inversión en tiempo y dinero para la obtención de algún fragmento informativo sería enorme. Hará falta mucha más investigación sobre el comportamiento del DNA durante la diagénesis y la fosilización para poder resolver estas cuestiones.

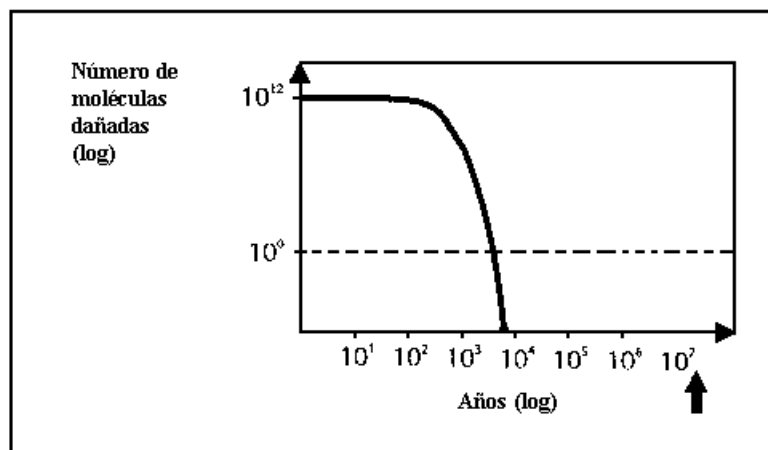
Por otra parte, Lindahl (1993a) enfatiza que la fragmentación hidrolítica no puede ser detenida completamente, ya que en cierto modo el DNA siempre permanece hidratado. Algunas de las moléculas de agua en los surcos de la doble hélice del DNA

---

son estructuralmente esenciales y su pérdida ocasiona que el DNA no retenga la conformación de la doble hélice, haciendo que las bases sean más vulnerables al daño. De hecho, es posible deshidratar el DNA mediante un potente desecante (pentóxido de fósforo), pero el DNA resultante es extremadamente higroscópico y se rehidrata rápidamente al contacto con el aire (Lindahl, 1993a).

Así pues, Lindahl opina que la conservación de DNA completamente hidratado durante 20 millones de años es incompatible con las propiedades conocidas de la estructura química del DNA (Lindahl, 1993a), poniendo en duda la recuperación de DNA de la hoja fosilizada de *Magnolia* de 17-20 millones de años de antigüedad (Golenberg et al. 1990), encontrada en un depósito que probablemente ha permanecido saturado con agua desde el Mioceno (Pääbo y Wilson, 1991); y ha expresado implícitamente que el límite máximo para la preservación del DNA estaría alrededor de los 100,000 años (Lindahl, 1993b). El trabajo de Poinar y col. (1996), apoya estas estimaciones, pues basándose en las tasas de racemización del ácido aspártico y su relación con la preservación del DNA, calcularon que en regiones cálidas, como Egipto, el DNA sólo puede permanecer por unos cuantos miles de años y en las regiones frías, aproximadamente 100,000.

Pääbo y Wilson (1991), también sorprendidos por los resultados de las hojas de *Magnolia* encontradas en el depósito de Clarkia, realizaron un estudio en el que calcularon la tasa a la cual se espera que sobreviva un segmento de DNA de cierta longitud, basándose en la tasa de depurinización espontánea que presenta el DNA en soluciones acuosas (Lindahl y Nyberg, 1972). Golenberg y colaboradores (1990) informaron de la amplificación de un segmento de 790pb, pero Pääbo y Wilson estimaron que si se parte de  $10^{12}$  moléculas (aproximadamente el número de genomas de cloroplasto que se encuentran en un gramo de tejido de hoja), el último fragmento de 800 pb sería depurinizado después de aproximadamente 5,000 años, a pH 7 y 15°C (Fig.MT-6). Como los sitios sin base conducen rápidamente a la ruptura de la doble cadena (Lindahl y Andersson, 1972), Pääbo y Wilson opinan que la probabilidad de que algún segmento de DNA de 800pb sobreviva durante 16 millones de años en la presencia de agua queda excluida. Sin embargo, reconocen que su estudio es una extrapolación teórica y que los resultados empíricos deben sentar precedente si se prueba que son correctos.



**Figura MT-6** Extrapolación teórica que indica la posibilidad de preservación en el tiempo de segmentos de 800pb en solución acuosa. La última molécula sería depurinizada después de alrededor de 5,000 años. La flecha indica la edad aproximada de los fósiles de Clarkia. Tomado de Pääbo y Wilson, 1991.

Para dar una solución a la contradicción entre la teoría y las observaciones en el caso de las hojas de Magnolia, Pääbo y Wilson (1991) exponen que la presión pudo forzar la exclusión del agua de los cloroplastos y dejar muy pocas moléculas de agua atrapadas en un ambiente lipídico, lo que evitaría que las purinas y los hidroxilos en C-1 de los residuos de azúcar estuviesen hidratados, reduciendo drásticamente la depurinización. Además, es posible que los productos de la hidrólisis no pudiesen escapar y al acumularse en concentraciones lo suficientemente elevadas, podrían impedir una mayor depurinización. Finalmente, si las moléculas de DNA son inmovilizadas debido a la compresión, el enlace C-N podría estar limitado en su capacidad de estirarse y doblarse, lo que también podría reducir la depurinización (Pääbo y Wilson, 1991).

Por su parte, Golenberg (1994b) expone que los estudios iniciales de la composición de bases de al menos un espécimen del depósito de Clarkia (Golenberg, 1991) no sugieren que el daño predominante sea la depurinización y opina que esto puede ser debido a una baja presencia de iones de metales, lo que evitaría la formación de hidroxilos responsables del daño hidrolítico.

Como vemos, estas explicaciones se apoyan en las diferencias que puede haber entre las condiciones en las que se encuentra el DNA en los fósiles con respecto a las utilizadas en los estudios de laboratorio, lo que inevitablemente hace surgir la pregunta de si es válido extrapolar unos resultados obtenidos *in vitro* a la probabilidad de preservación del DNA durante millones de años en restos fosilizados.

---

En este sentido, Golenberg (1994a) advierte que los experimentos en los que se basan las críticas de Lindahl, fueron realizados en solventes fisiológicos y a elevada temperatura, pero las condiciones microambientales dentro de los tejidos y organelos preservados, podrían muy bien ser bastante diferentes de las condiciones fisiológicas, haciendo que la simple extrapolación de los estudios *in vitro* no sea concluyente. “La teoría – expone Golenberg – es importante para generar predicciones susceptibles de ser probadas y la validez de una teoría es determinada por el grado de apoyo que obtiene de los resultados empíricos; el reverso de este proceso, estableciendo la validez de los resultados empíricos determinando que tan bien se ajustan a las expectativas teóricas, es en el mejor de los casos arrogante y en el peor, retrógrado”. En su opinión, el creciente cuerpo de estudios empíricos demuestran que la preservación del DNA no es una simple función del tiempo (Golenber, 1994a).

Por otra parte, Poinar (1993) opina que existen muchos tipos de procesos de fosilización y asumir que el decaimiento del DNA es similar en todos ellos, o que es equivalente a la del material no fosilizado, no es una actitud científica. De igual forma, Yang (1997) expone que aunque las condiciones artificiales simuladas en el laboratorio pueden ser usadas como una indicación general del proceso degradativo, no pueden reflejar diversos microambientes tafonómicos donde se lleva a cabo la degradación del DNA, por lo que las tasas y los modelos teóricos de la degradación deben ser aplicadas con cautela.

Dado que el DNA puede unirse tanto a proteínas, como a sustancias orgánicas (ácidos húmicos) e inorgánicas (superficies minerales) obteniendo protección, es necesario investigar las tasas de decaimiento espontáneo que presenta el DNA en estas condiciones. Al respecto, el trabajo preliminar de Terry Brown y colaboradores (Waite et al. 1997) parece ser el único realizado con este enfoque. En este trabajo, se investigó la preservación de DNA mitocondrial amplificable mediante PCR, en huesos mantenidos a temperaturas elevadas en presencia y en ausencia de agua, para simular una “diagénesis artificial”. Los resultados del estudio muestran que el DNA se conserva mejor en condiciones secas y esto podría ser una primera prueba de laboratorio indicando que el DNA no decae a la misma tasa en todas las condiciones, como es de esperar.

A la luz de estas consideraciones, parece ser que la respuesta definitiva estará dada por la reproducibilidad de los resultados, determinada por la extracción y secuenciación consistente de algún segmento de DNA obtenido en más de dos extractos diferentes de un mismo espécimen, de preferencia en laboratorios independientes.

---

En el caso de los restos del depósito de Clarkia, se ha informado de la obtención de un fragmento de mtDNA de un ciprés del género *Taxodium* encontrado en el mismo depósito y aunque no demuestra la reproducibilidad de los resultados en las hojas de Magnolia, podría indicar que las condiciones del depósito son en verdad favorables para la preservación del DNA (Soltis et al. 1992). Sin embargo, al igual que las secuencias de Magnolia (Sidow et al. 1991), estos resultados tampoco han podido ser reproducidos en laboratorios independientes (Austin et al. 1997a).

Otro de los informes acerca de la extracción de DNA de millones de años de antigüedad, fue el publicado por Woodward y col. (1994b), en el que aparecen varias secuencias del citocromo *b* (mtDNA) de 168pb provenientes de dos huesos que posiblemente pertenecieron a uno o dos dinosaurios del Cretáceo, hace 80 millones de años. Los autores obtuvieron dos secuencias consenso (una de cada hueso) y las compararon con secuencias de muchas especies obtenidas tanto de una base de datos como de su laboratorio. También determinaron la correspondiente secuencia de aminoácidos y al compararla con la equivalente de mamíferos y aves, encontraron que en cuanto a similitud, se encontraba más o menos en medio de los dos grupos. Basándose en estos análisis concluyeron que las secuencias obtenidas pertenecieron a los dinosaurios. También hicieron notar que el fragmento era muy pequeño para realizar análisis filogenéticos y que no fue posible obtener otros fragmentos que fuesen más informativos (Woodward et al. 1994b).

Sin embargo, Hedges y Schweitzer (1995), realizaron un análisis filogenético, criticando el trabajo de Woodward y colaboradores por ser poco exhaustivo y encontraron que una de las secuencias consenso, se relacionaba más cercanamente a la correspondiente en humanos y cuando obtuvieron una secuencia consenso de todas las secuencias publicadas en el artículo original, la similitud con la secuencia de humano aumentó. Además, hacen notar que este tipo de trabajos deberían contar con la reproducción independiente de los resultados antes de poder ser publicados.

Henikoff (1995), critica también la comparación hecha con la secuencia de aminoácidos inferida por Woodward y col. y al utilizar un método más potente, usando para la comparación 223 secuencias equivalentes de diferentes especies, encontró que las secuencias de los huesos del Cretáceo tienen más homología con la de los mamíferos que con las de otros grupos, lo que sugiere que o bien la secuencia proviene de un mamífero o ha ocurrido convergencia evolutiva en el segmento analizado.

Allard y col. (1995) indican que a pesar de que se cuente con fragmentos pequeños, lo más indicado para buscar relaciones entre secuencias sigue siendo el

---

análisis filogenético usando el método de la parsimonia. Estos investigadores hicieron un análisis de este tipo encontrando que varias de las secuencias publicadas se agrupaban más cercanamente con la secuencia de humano.

El grupo de S. Pääbo (Zischler et al. 1995b), pensó en la posibilidad de que las secuencias del Cretáceo fuesen en realidad integraciones nucleares del mtDNA (Pag. 38), así que obtuvieron células humanas sin DNA mitocondrial, a partir de las cuales realizaron diversos experimentos de amplificación utilizando los *primers* y las condiciones de PCR utilizadas por Woodward y col., así como *primers* diseñados a partir de las secuencias publicadas. Consiguieron amplificar varios segmentos del tamaño esperado, los secuenciaron y realizaron un análisis filogenético. Como probablemente esperaban, encontraron que la supuesta secuencia del Cretáceo, estaba más relacionada con los insertos humanos que con otras especies. Para explicar el resultado expusieron, quizá con un poco de sorna, que existían tres posibilidades: i) sus preparaciones de DNA humano pudieron haber sido contaminadas con DNA de dinosaurio, ii) el mtDNA de dinosaurio pudo haber penetrado en la línea germinal de los mamíferos a través de algún o algunos eventos de hibridación entre los antecesores de los mamíferos y los dinosaurios antes del fin del Cretáceo y iii) que los extractos de dinosaurio obtenidos por Woodward y col. fueron contaminados con muy pequeñas cantidades de DNA humano. Obviamente, los autores consideran que la tercera posibilidad es la más plausible (Zischler et al. 1995b).

Respondiendo a estas críticas, Woodward (1995) considera que la contaminación con DNA nuclear humano no puede ser la explicación del origen de sus secuencias. Para amplificar una inserción nuclear, el DNA tendría que estar libre del mtDNA, pues el último es más abundante y más fácil de amplificar que el primero. Opina también que la similitud entre las secuencias del Cretáceo y las de los mamíferos, puede deberse a la convergencia evolutiva del gen del citocromo *b* debido a cuestiones energéticas de los organismos y a las presiones selectivas sobre la proteína. Además, hace notar que la rápida evolución del mtDNA podría ocasionar que las diferencias entre secuencias homólogas se asintoticen al alcanzar el 30% de divergencia en 30 o 40 millones de años, con lo que los análisis filogenéticos pierden su significado (Woodward, 1995). Esto sin embargo, hace pensar en que quizá los pequeños fragmentos de mtDNA que se puedan recuperar de restos de más de 40 millones de años de antigüedad, ofrecerán una información limitada, pues la tasa de evolución del mtDNA habrá saturado las diferencias que puedan tener con fragmentos de especies actuales (ver también Brown et al. 1982).

---

Por otra parte, resulta curioso que un detalle importante del trabajo de Woodward y col. (1994b), relacionado con las condiciones de preservación del DNA no haya sido puesto de manifiesto en estas revisiones, sino hasta 1997 por Austin y col. (1997a) y es el hecho de que el yacimiento donde fueron encontrados los huesos posiblemente se formó a temperaturas de 90-95°C (Woodward et al. 1994b).

El caso de los restos incluidos en ámbar, también merece atención, ya que si en algún sitio cabe la posibilidad de encontrar DNA geológicamente antiguo, será seguramente en fósiles preservados en ámbar (Austin et al. 1997a). De hecho, la mayoría de informes relacionados con la extracción de DNA de millones de años de antigüedad, se refieren a este tipo de restos (DeSalle et al. 1992; Poinar et al. 1993; Cano et al. 1993; entre otros). Por sus características, el ámbar puede ofrecer un ambiente único ventajoso para la retención de secuencias de DNA antiguo (Lindahl, 1993a), porque los componentes de la resina eliminan la humedad de los tejidos, produciendo un grado extremo de momificación, los protegen de la degradación microbiana y los aíslan parcialmente del oxígeno atmosférico (Poinar et al. 1994; Austin et al. 1997a). En los tejidos preservados en ámbar, la preservación general bioquímica es excepcional, como lo demuestran los estudios de la racemización de aminoácidos (Poinar et al. 1996). También es sorprendente la preservación histológica, incluso a nivel subcelular, pues han sido observados núcleos celulares y mitocondrias (Grimaldi et al. 1994; Poinar et al. 1994).

En este contexto, es de vital importancia la reproducibilidad de la extracción y caracterización de DNA a partir de dichos fósiles, pero estudios recientes indican que los resultados no sólo no son reproducibles, sino que en algunos de los trabajos originales se pudieron cometer errores graves en el análisis de los resultados. Así, el trabajo de Austin y col. (1997b), indica que los resultados no son reproducibles de forma consistente y lo que es más, al no encontrar fragmentos de DNA en fósiles mucho menos antiguos incluidos en copal, descarta en gran medida la posibilidad de su persistencia en restos más antiguos embebidos en ámbar (Lindahl, 1997).

Walden y Robertson (1997), intentaron replicar la amplificación de la primera secuencia publicada de un espécimen preservado en ámbar, un insecto de la especie *Proplebeia dominicana*.

---

Analizaron 9 individuos de la misma especie de 15-20 millones de años de antigüedad, utilizando varios métodos de extracción y la técnica de “nested-PCR” para incrementar la sensibilidad (Pag. 113) y obtuvieron algunas amplificaciones que al ser secuenciadas revelaron ser contaminación con DNA de escarabajo, humano y pez; probablemente proveniente del aire, pues ni ellos ni nadie de su laboratorio había amplificado antes el segmento encontrado utilizando muestras humanas o de escarabajos.

---

Gutiérrez y Marín (1998) reanalizaron la secuencia del espécimen más antiguo de todos los estudiados, publicada por Cano y col. (1993), que supuestamente proviene de un insecto de la especie Lebanorhinus succinus, de hace 120-135 millones de años. El análisis filogenético de Gutiérrez y Marín sugiere que la secuencia no es en realidad antigua, por lo que revisaron las comparaciones que hicieron Cano y colaboradores entre la secuencia obtenida y el de otras especies de coleópteros y dípteros. Encontraron que la secuencia de Aedes albopictus, recuperada de una base de datos (acceso X57172) con fines comparativos por Cano y col., no era homóloga con la secuencia de Lebanorhinus. La secuencia que sí es homóloga no fue enviada a dicha base de datos sino hasta un año después (acceso L22060). Además, a su parecer, la secuencia de Drosophila melanogaster publicada en el artículo de Cano y col., es un ensamble que aparentemente fue obtenido empalmando fragmentos que no eran adyacentes, para poder alinearla con la secuencia del fósil. Gutiérrez y Marín concluyen, con base en sus análisis, que la supuesta secuencia de L. succinus es en realidad contaminación probablemente de origen fúngico; que las secuencias de coleóptero obtenidas para comparación por Cano y colaboradores muestran características inesperadas; y que para ellos es inexplicable el origen de las secuencias del díptero utilizadas en el artículo original (Gutiérrez y Marín, 1998).

En resumen, parece justificada la sentencia de Sykes (1997) “la luz se pone roja para el ámbar” y quizá sea necesario esperar a que se comprendan mejor los mecanismos de preservación del DNA en restos de millones de años de antigüedad, utilizando muestras con un menor valor morfológico, antes de proceder a la destrucción sistemática de ejemplares valiosos. Por otra parte, la investigación de DNA geológicamente antiguo no es accesible para todos los grupos de investigación, así que para “el resto de los mortales” quizá lo más conveniente sea ceñirse a organismos de una antigüedad en la que la preservación del DNA esté más que probada.

Al respecto, en una revisión acerca del DNA obtenido de restos del Cuaternario, Yang (1997), expone que el principal rango de acción para estudios de DNA antiguo debería estar enmarcado dentro de este período, debido a las siguientes razones: i) la edad relativamente reciente de los enterramientos, ii) los linajes de los organismos del Cuaternario puede seguirse hasta especies actuales, iii) el fino grado de precisión cronológica que se puede obtener utilizando la espectrometría de acelerador de masa, que requiere poca cantidad de material, posibilita el establecimiento de una escala de tiempo detallada y iv) las secuencias de DNA obtenidas pueden ser contrastadas con otros datos moleculares, inmunológicos y de isótopos estables que ya son utilizados rutinariamente en la ciencia del Cuaternario.



---

Además, en el tiempo comprendido por este período, será difícil encontrar la saturación evolutiva en el mtDNA que puede ocurrir en períodos de tiempo mayores.

### **Prospección molecular**

No todos los especímenes antiguos contienen DNA amplificable, debido a que existen condiciones ambientales que pueden impedir su conservación (Höss et al. 1996). En el caso de muestras valiosas, muestras que están en los límites temporales o muestras en las que se ha intentado la extracción de DNA sin éxito, convendría contar con métodos para saber, antes de iniciar o de continuar con la destrucción de las muestras, que posibilidades existen de encontrar DNA. Se han descrito algunos métodos con este fin, a los que podríamos denominar métodos de “prospección molecular”. Un buen método de prospección molecular, debería ser económico, relativamente fácil de realizar y que necesite poco material para el análisis. Aunque tal vez no exista el método ideal, a continuación se exponen los que diversos investigadores han llevado a cabo.

### **Análisis histológicos**

De acuerdo con Pääbo (1987), para saber si una muestra de tejido blando contiene DNA, es de obvio interés saber si la preservación histológica es adecuada. De hecho, la primera demostración de la existencia de DNA en tejidos momificados humanos, fue hecha a nivel histológico utilizando una tinción con bromuro de etidio específica para DNA, que permitió su observación en los núcleos celulares (Pääbo, 1985a). El buen estado celular, como condición para la preservación del DNA, es bastante razonable, ya que los tejidos blandos no contienen hidroxapatita. Sin embargo, el DNA podría permanecer protegido por su asociación con las histonas o con proteínas de unión, incluso fuera del núcleo celular o de las mitocondrias. Por ejemplo, a pesar de que el examen histológico del tejido del cerebro de Windover mostró que sólo ocasionalmente existían células preservadas, fue posible extraer DNA de cerca de 10,000 pb de origen humano, según las pruebas de hibridación con sondas de repeticiones *Alu* (Pääbo, 1986) y con sondas de mtDNA (Doran et al. 1986). Así que aunque el análisis histológico puede ser un buen indicio, aún hace falta mucha más investigación a nivel histológico para determinar si la preservación del núcleo o de las mitocondrias es esencial para la existencia de DNA en los tejidos blandos.

---

En relación a los restos óseos, se ha observado que la apariencia general de los huesos, estimada a *grosso modo*, no es indicativa del estado de preservación del DNA (Hagelberg et al. 1991a; Faerman et al. 1995), pero se ha informado que existe una clara relación entre el buen estado de preservación histológica de la muestra y la recuperación de DNA amplificable (Hagelberg et al. 1991a), e incluso con el éxito en la amplificación de genes de una sola copia (Cipollaro et al. 1998). Esto pone en duda la hipótesis de que el DNA se conserve mejor en los huesos debido a su unión con la hidroxiapatita, aunque también en este sentido hace falta una investigación más completa. Por ejemplo, la relación preservación histológica/DNA endógeno no ha sido analizada en restos dentales, en los que el alto contenido de hidroxiapatita podría ser el factor responsable de la mejor calidad del DNA (DeGusta et al. 1994).

También han sido observados núcleos celulares y mitocondrias en los tejidos de organismos conservados en ámbar, pero esto no ha sido garantía de la existencia de DNA, como ya se ha expuesto en páginas anteriores.

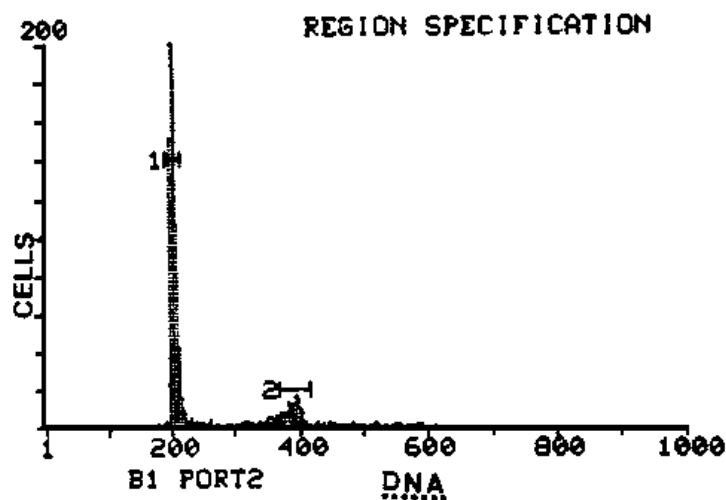
#### Microscopía óptica y electrónica

Además de la observación de la estructura celular, la investigación microscópica puede revelar la presencia de microorganismos, que pueden contribuir en mayor o menor medida a la presencia de DNA exógeno en los extractos (Herrmann y Hummel, 1994b). Es previsible que el exceso de DNA contaminante haga más difícil la amplificación del DNA endógeno.

#### Citometría de flujo

Megan Cook, describió en 1993, el uso de la citometría de flujo para detectar DNA nuclear en restos esqueléticos. Realizó una modificación de la técnica para descalcificar la muestra y desagregar el tejido y utilizó la tinción con 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), específica para DNA. La citometría de flujo permite distinguir los núcleos de células con carga cromosómica  $2n$  de los núcleos de células en fase replicativa con carga  $4n$  (Fig.MT-7). Cook encontró que en la mayoría de los histogramas de sus muestras eran predominantes los picos que representan cargas  $2n$ , aunque también observó picos de carga  $4n$ .

Sin embargo, existen una serie de consideraciones que se deben tener en cuenta si se usa este método para evaluar el estado y la cantidad de DNA en una muestra ósea. Por un lado, requiere de la existencia de núcleos intactos, por lo que sería bueno realizar primero una inspección histológica. Por otro lado, la citometría de flujo por si misma, no revela el grado de homología genética entre varias muestras de DNA, por lo que el DNA proveniente de hongos podría interferir en la estimación. De hecho, Cook ha hipotetizado que los picos  $4n$  que observó en sus muestras podrían ser agregados de DNA, ya que los osteoblastos, los osteoclastos y los osteocitos no se replican (Cook, 1993). Por otra parte, es una técnica que requiere el análisis de bastante material, por lo que sólo podría usarse en muestras de las que se disponga bastante tejido de poco valor morfológico. De cualquier manera, sería muy interesante observar si existe una relación entre la presencia y magnitud de los picos  $2n$ , con la eficiencia en la amplificación de DNA endógeno, para evaluar si este método es adecuado para la prospección molecular. También sería interesante su aplicación en tejidos blandos.



**Figura MT-7** Histograma de la citometría de flujo de preparaciones de DNA antiguo. El pico diploide se obtiene en el canal 200, en tanto que el  $4n$  por el canal 400. Tomado de Cook, 1993.

#### Cromatografía de gas/espectrometría de masa

En el trabajo de Höss y colaboradores (1996), se buscó, mediante cromatografía de gas/espectrometría de masa, la presencia de 8 modificaciones oxidativas en las bases

---

del DNA extraído de huesos y tejidos blandos de 11 especímenes, cubriendo un rango de antigüedad de 40 a 50,000 años. Se encontró que las modificaciones más comunes eran los derivados hidantoinos de las pirimidinas y que su presencia tenía una influencia negativa en la amplificación de DNA endógeno. Aunque este análisis requiere de gran cantidad de material, si la correlación negativa entre la cantidad de hidantoinos y la eficiencia del PCR se confirma, la presencia de hidantoinos podría servir como un indicador efectivo de la degradación del DNA. Sin embargo, para establecer la generalidad de esta correlación, es necesario analizar un número mayor de muestras (Höss et al. 1996).

### Racemización de aminoácidos

Todos los aminoácidos utilizados en las proteínas, con excepción de la glicina, pueden presentar dos isómeros ópticos, los enantiómeros dextrorrotatorios (D-) y los levorrotatorios (L-) pero sólo los L-enantiómeros son utilizados en la biosíntesis proteica. Después de la muerte, al quedar libres de los procesos metabólicos activos, los L-aminoácidos comienzan a transformarse en D-aminoácidos a través de un proceso denominado racemización, hasta que los enantiómeros D- y L- del aminoácido en cuestión se presentan en cantidades iguales (Poinar et al. 1996). La racemización es una reacción de isomerización, en la que un átomo de hidrógeno desplaza su posición estereoquímica en el único centro quiral de una molécula, invirtiendo su quiralidad (Voet y Voet, 1992 p.432).

La tasa de racemización de los aminoácidos, depende de algunos de los mismos factores que afectan la degradación del DNA. Particularmente, la racemización del ácido aspártico (Asp), que tiene una de las tasas más rápidas, requiere de una energía de activación y unas constantes muy similares a las de la depurinización del DNA (Poinar et al. 1996). Más aún, el trabajo de Poinar y colaboradores (1996), demostró una relación entre la magnitud de la racemización del ácido aspártico y la posibilidad de amplificar DNA endógeno, en la que las muestras con valores de la razón D/L Asp mayores de 0.08 no contenían DNA amplificable, e incluso que había cierta relación entre la magnitud de la racemización de este aminoácido y la longitud de los fragmentos amplificables. En muestras con una razón de 0.05, fue posible obtener secuencias de entre 140 y 340 pb, mientras que en las muestras con mayor racemización, había una tendencia a obtener sólo fragmentos más cortos.

Además, ya que la racemización del Asp es más rápida que la de otros aminoácidos como la alanina (Ala) y la leucina (Leu), la magnitud de la racemización de

---

Asp, debería de ser mayor que la de Ala y Leu si todos ellos son de la misma edad, por el contrario, si la razón D/L Asp es menor que la de Ala o Leu, indicaría contaminación de aminoácidos más recientes. En el trabajo de Poinar y col. (1996) los especímenes que contenían DNA amplificable, siempre presentaban una racemización de Asp mayor que la de Ala o Leu, pero las muestras que no seguían este patrón, no contenían DNA endógeno. Por lo tanto, la cuantificación de la racemización del ácido aspártico, de la alanina y de la leucina puede ser un medio eficaz para identificar muestras que contengan secuencias informativas de DNA. Por otra parte, esta técnica requiere de unos pocos miligramos para el análisis y puede llevarse a cabo en pocos días (Poinar et al. 1996).

#### Otras posibilidades

Técnicas de análisis químico como la pirólisis-espectrometría de masa y la pirólisis-cromatografía de gas/espectrometría de masa pueden ser usadas para evaluar la preservación de polisacáridos estructurales y proteínas (Eglinton y Logan, 1991; Logan et al. 1993). De acuerdo con Lindahl (1993b), si en una muestra no existen proteínas o polisacáridos, tampoco existirá DNA.

Sin embargo, los estudios preliminares sobre la conservación del DNA y de algunas proteínas durante la diagénesis artificial de huesos, indican que el DNA puede sobrevivir por más tiempo que las proteínas analizadas (Waite et al. 1997), aunque es necesario mucho más trabajo para aclarar la relación entre la preservación de las proteínas y otros biopolímeros con la preservación del DNA.

También se ha propuesto que es necesario estudiar otro tipo de restos de los mismos yacimientos donde fueron encontrados los restos de interés, por ejemplo, el análisis de fauna encontrada en excavaciones arqueológicas. El hecho de encontrar DNA endógeno en fauna, indicaría que las condiciones del sitio para la preservación del DNA no son adversas (Cooper, 1997).

#### **Problemas metodológicos**

En principio, los métodos utilizados para la extracción de DNA antiguo son relativamente sencillos, y se basan mayoritariamente en los métodos de extracción de DNA moderno. En tejidos blandos, el proceso consta de la destrucción de los núcleos celulares y membranas mitocondriales mediante una solución de lisis; digestión y desnaturalización de proteínas y colágeno utilizando una solución enzimática; la separación del DNA de todos

---

los restos orgánicos y su colecta mediante precipitación con alcohol o concentración mediante filtración centrífuga. En el caso de la extracción de DNA a partir de huesos y dientes, se incorporan también pasos para la descalcificación, como el uso de concentraciones elevadas de agentes quelantes del calcio como el EDTA (Hagelberg et al. 1989; Hagelberg y Clegg, 1991); o pasos para separar el DNA de su hipotética unión con la hidroxiapatita. Los ácidos nucleicos pueden unirse a la hidroxiapatita por virtud de las interacciones entre sus residuos de calcio y los grupos fosfatos del esqueleto polinucleotídico (Sambrook et al. 1989 p. E-30) y algunos investigadores han incorporado tampones de fosfato (Persson, 1992; Nielsen et al. 1994) que desestabilizan esta unión. La base fisicoquímica de este procedimiento no está aclarada por completo, pero aparentemente incluye la adsorción de aniones en los sitios del  $\text{Ca}^{2+}$  y de cationes en los sitios del  $\text{PO}_4^{3-}$  de la red cristalina de la hidroxiapatita (Voet y Voet, 1992), lo que en consecuencia, libera el DNA.

Aunque con ciertas dificultades, el DNA obtenido se puede clonar, amplificar mediante PCR y secuenciar o analizar con otros procedimientos, como la utilización de enzimas de restricción. Sin embargo, a la aparente sencillez de la extracción y caracterización del DNA antiguo, están ligados diversos problemas que interrumpen o dificultan la obtención de información, sobre todo para los que se enfrentan por primera vez con una investigación en este ámbito. A continuación se exponen algunos de estos problemas.

#### Dificultad en la estandarización de los protocolos

Debido a que los protocolos se han derivado de los métodos para tejidos frescos, no existe un “protocolo para DNA antiguo”, sino que los diversos autores han adaptado los métodos existentes de acuerdo a su criterio personal. Incluso cuando se utiliza un protocolo que ya ha sido publicado para aDNA, a menudo es necesario introducir modificaciones, debido a las características de las muestras con las que se trabaja o a las limitaciones de cada laboratorio. Más aún, debido a las diferencias que pueden presentar distintos restos en la preservación del DNA, a pesar de que provengan del mismo yacimiento, existe una dificultad importante a la hora de estandarizar los protocolos. Muchas veces puede resultar difícil distinguir los motivos por los cuales no se obtienen resultados positivos, ya que intervienen una gran cantidad de factores que no es posible controlar.

---

## Tamaño limitado de los segmentos

Debido a la fragmentación y al extenso daño molecular que presenta el DNA antiguo, es imposible obtener fragmentos informativos grandes, así que las investigaciones tienen que ceñirse a fragmentos que por sus características sean muy informativos, como los que se encuentran en la región de control del mtDNA, o genes nucleares que por alguna circunstancia puedan ser útiles, como es el caso del gen de la amelogenina, que presenta una delección en el cromosoma Y, lo que hace posible determinar el sexo de la muestra mediante la amplificación de un fragmento de sólo 100pb aproximadamente. (Sullivan et al. 1993). Si se pretende obtener fragmentos más grandes, es necesario recuperarlos “por partes” en amplificaciones sucesivas, lo que puede elevar los costos.

## Escasez del DNA extraído y problemas en la cuantificación

A pesar de que existen diversos problemas para cuantificar el DNA (Pag. 59), la mayoría de investigadores coinciden en que el DNA obtenido es muy poco comparado con el que se esperaría de tejidos frescos. Además, los experimentos de hibridación específica sugieren, independientemente de si el DNA es endógeno o no, que no todo el DNA es utilizable. Por lo que para obtener una cantidad suficiente de DNA requerida para algunos análisis, a veces será necesario destruir buena parte de la muestra.

Los problemas en la cuantificación y el riesgo de contaminar los extractos con DNA moderno, han llevado a la mayoría de científicos a prescindir de este paso y a realizar los subsecuentes procedimientos de análisis determinando de forma empírica la cantidad de extracto necesaria en cada uno de ellos.

## Presencia de inhibidores

Las características de los primeros extractos de DNA antiguo de tejidos blandos, como las diferencias en los espectros de absorción de luz UV con respecto a los de DNA moderno (Pääbo, 1985a) y el color marrón (brown color) que a menudo presenta el extracto (Pääbo, 1987), ya indicaban que alguna sustancia o sustancias acompañaban al DNA extraído. Después se observó que los extractos procedentes de hueso (Brown y Brown, 1992a; Dickel y Hauswirth, 1992) también presentaban el “color marrón”,

---

incluso si se utilizaba un protocolo de extracción diferente basado en un tampón de fosfato (Persson, 1992), aunque se informó que en algunos casos el color de los extractos podía presentar diferencias según la procedencia de los huesos y que en general eran de una tonalidad diferente respecto a los extractos de tejidos blandos (Cooper, 1992). También fue observada una fluorescencia azul en los extractos procedentes de tejidos blandos (Pääbo, 1990) y de huesos (Hummel y Herrmann, 1991; Persson, 1992) al ser expuestos a la luz UV en los geles de electroforesis.

Cuando se empezó a utilizar la tecnología PCR, se observó que existía una actividad inhibitoria de origen desconocido que interfería con el proceso, tanto en tejidos blandos (Pääbo et al. 1988; Pääbo, 1989), como en huesos (Hagelberg et al. 1989), que inevitablemente se asoció con las características de los extractos antes mencionadas. Posteriormente se observó que la inhibición del PCR en los extractos de dientes ocurría en menor medida que en los procedentes de huesos (Zierdt et al. 1996).

La presencia de este factor inhibitorio está considerada como uno de los mayores problemas en el campo del DNA antiguo (Handt et al. 1994b), ya que puede conducir a la obtención de falsos negativos, o peor aún, puede aumentar considerablemente el riesgo de contaminación con DNA externo, pues obliga al investigador a incrementar, por un lado, los pasos en los protocolos para mejorar la pureza del DNA y por otro, el número de experimentos de PCR que es necesario llevar a cabo con cada muestra para obtener resultados positivos.

Es probable que esta inhibición sea un problema multifactorial y cada tipo de muestra (hueso, tejidos blandos, dientes) puede contener una sola sustancia inhibitoria o una combinación de ellas. Sin embargo, existen algunas características generales que presenta el factor inhibitorio: i) se manifiesta en casi todos los extractos procedentes de diferentes tipos de tejidos, ii) puede estar relacionado con el “color marrón” y con la fluorescencia azul, iii) no son eliminados por la extracción orgánica (con fenol-cloroformo) ni con la precipitación con etanol y iv) no atraviesan la membrana de los tubos de filtración centrífuga que retienen moléculas con un peso molecular mayor de 30,000 Da (Centricon 30).

Se desconoce la naturaleza exacta de este factor, aunque se han hecho algunas conjeturas. Pääbo (1989), propuso que se trataba de los productos de la reacción Maillard, iniciada por la condensación entre los aminoácidos de las proteínas y los azúcares reductores. Esto parece ser particularmente relevante en los extractos de tejidos blandos, que presentan un tinte tenue marrón-amarillo (Cooper, 1992). Recientemente, los productos Maillard han sido identificados en un coprolito (Poinar et al. 1998), lo que



---

no resulta sorprendente, pues la reacción Maillard es común durante la descomposición de los alimentos (Dills, 1993).

De acuerdo con Higuchi (1992a), en algunos extractos, las sustancias inhibitorias podrían ser residuos de porfirinas o alguno de sus subproductos, ya que muchos tejidos vivos, como la sangre y las hojas de las plantas, son ricos en porfirinas. La razón de que no pasen a través de la membrana del Centricon 30 podría ser el hecho de que los compuestos porfirínicos tienden a agregarse. Otra hipótesis es que los compuestos inhibitorios podrían estar asociados con las moléculas de DNA (Francalacci, 1995), siendo así retenidos por el filtro.

Algunos autores han propuesto que en los extractos de huesos, los inhibidores podrían ser componentes del suelo, como hierro, taninos, ácidos húmicos o ácidos fúlvicos (Hagelberg y Clegg, 1991; Cooper, 1992; Tuross, 1994). Sin embargo, los experimentos de diagénesis artificial en huesos, realizados en condiciones de laboratorio, muestran que existe un factor inhibitorio que no proviene del suelo (Waite et al. 1997).

Rogan y Salvo (1990) sugirieron que la inhibición es debida al DNA mismo, o más precisamente, al extenso daño que presentan las moléculas antiguas. No obstante, las observaciones de que una alícuota de extractos antiguos es capaz de inhibir una reacción de PCR con DNA moderno (Goodyear et al. 1994; Woodward et al. 1994a; Francalacci, 1995; Hänni, et al. 1995), no apoyan esta hipótesis.

Los experimentos de Scholz y col. (1998), indican que en los extractos tanto de tejidos blandos como de huesos, el inhibidor podría ser colágeno de tipo I, pero algunos protocolos de extracción que utilizan colagenasa (ej. Persson, 1992), continúan produciendo extractos con fuerte presencia de “color marrón” y fluorescencia azul.

Como se observa, no existe un consenso general, sin embargo, a pesar de que se desconoce la naturaleza de los inhibidores, muchos investigadores han diseñado procedimientos para eliminar o atenuar la inhibición. Estos procedimientos, pueden realizarse antes del PCR con el fin de mejorar la calidad del DNA, o durante la reacción de amplificación, con el fin de superar el efecto negativo del factor inhibitorio.

Así, la mayoría de los procedimientos **pre-PCR** intentan separar el DNA del inhibidor, e incluyen entre otros, la centrifugación del extracto en un gradiente de sucrosa (Pääbo, 1989); la recuperación del DNA después de una electroforesis en gel de agarosa (Rollo et al. 1988; Amici y Rollo, 1992); la utilización de “kits” comerciales de purificación (Hummel y Herrmann, 1991); la precipitación selectiva de los ácidos nucleicos con espermina, o espermidina (Persson, 1992 basado en Hoopes y McClure,

---

1981); el uso de agentes quelantes como la resina Chelex 100 (Richards et al. 1992); la cromatografía de intercambio iónico (Goodyear et al. 1994) o la precipitación con isopropanol (Hänni et al. 1995). Es importante hacer notar que casi todos estos métodos implican la manipulación de las muestras y/o la adición de sustancias después de la extracción, pudiendo representar una fuente de contaminación. En la categoría pre-PCR, podemos incluir el diseño de nuevos protocolos para incrementar la pureza del DNA, como el desarrollo del método de extracción basado en sílice (Boom et al. 1990; modificado por Höss y Pääbo, 1993); un método que por su potencia en la recuperación de DNA, hace casi imposible evitar la contaminación de las muestras si es usado en un laboratorio normal (Höss, 1994). Los protocolos de reparación del DNA (Pusch et al. 1998), también son procedimientos pre-PCR, sin embargo, aunque pueden mejorar la eficiencia de la amplificación, su actuación no es necesariamente contra el factor inhibitorio.

En lo concerniente a los procedimientos **durante el PCR**, algunas estrategias utilizadas son las siguientes: i) la utilización de grandes cantidades (12.5 unidades) de *Taq* DNA polimerasa (Pääbo et al. 1988; Thomas et al. 1990). Este es un método costoso que además puede conllevar la posible pérdida de especificidad (Higuchi, 1992a), ii) la dilución del extracto usado en la reacción de amplificación (Pääbo, 1990), lo que puede disminuir la cantidad del factor inhibitorio, pero también podría reducir la cantidad de DNA por debajo de los límites de detección (Higuchi, 1992a; Francalacci, 1995), iii) la adición de albúmina de suero bovino (BSA) a la mezcla de la reacción (Pääbo et al. 1988; Hagelberg et al. 1989), lo que ayuda a eliminar la inhibición en algunas muestras, pero que sin embargo, a menudo requiere de otro procedimiento, como el tratamiento previo del DNA con Chelex al 5% (Richards et al. 1992). Además, la cantidad óptima de BSA en la reacción puede variar de acuerdo con la muestra, de 2 µg/ml (Pääbo et al. 1988) a 160 µg/ml (Hagelberg, et al. 1989), pudiendo llegar incluso hasta los 2 mg/ml (Cooper, 1992).

Es obvio que extender estos procedimientos implica un mayor riesgo de contaminación, por lo que sería ideal seguir investigando sobre la naturaleza del inhibidor, para poder diseñar métodos que requieran el menor número de pasos posible o la menor utilización de reactivos adicionales. Durante el transcurso del trabajo experimental de esta tesis, se ha descubierto un método simple para superar el efecto negativo de las sustancias inhibitorias y se han investigado algunas propiedades de estas sustancias. Los resultados serán presentados y discutidos en las secciones correspondientes.

---

## Contaminación con DNA exógeno

El extraordinario poder de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para la amplificación de cantidades ínfimas de DNA, permitió la recuperación rutinaria de secuencias de DNA antiguo, en contraste con la clonación, con la que se obtenían secuencias sólo de forma esporádica (Pääbo et al. 1988). No obstante, pronto se observó que la exquisita sensibilidad de la técnica de PCR, representa también su principal problema, pues si el extracto es contaminado con la más mínima cantidad de DNA exógeno, éste podría ser amplificado a la vez o en lugar del DNA del organismo en estudio. Si el DNA contaminante es reciente o moderno, tendrá muchas más posibilidades que el DNA antiguo de ser amplificado, pues el extenso daño molecular que presenta este último, lo hacen menos eficiente como molde para la replicación. Este fenómeno es especialmente perjudicial si el DNA contaminante proviene de otro organismo de la misma especie, aunque también puede ser problemático el DNA de especies relacionadas, como lo demuestran los informes sobre DNA extraído del ámbar (Austin et al. 1997b; Walden y Robertson, 1997). Esto es debido a que el PCR puede ser muy específico, si se busca el fragmento adecuado, o menos específico si se buscan regiones de genes muy conservativas, que podrían presentar un alto grado de homología entre especies relacionadas filogenéticamente, cercanas o incluso no tan cercanas.

En general, el DNA exógeno puede contaminar la muestra en las dos etapas siguientes: i) durante la descomposición de la muestra y todo el tiempo que permanezcan los restos en el enterramiento, debido a la posibilidad de que el DNA liberado por la descomposición de otros organismos se infiltre en los tejidos de la muestra y ii) durante la extracción, amplificación y análisis del DNA en el laboratorio, si previamente se ha extraído y amplificado DNA de organismos de la misma especie. Sin embargo, en el caso de los estudios con restos humanos, el problema se ve exacerbado, pues además de la posibilidad de que ocurra en las etapas descritas, la contaminación también podría presentarse (i) entre la muerte y el enterramiento del individuo si los ritos funerales incluyen la utilización de sangre o heces (Brown y Brown, 1992b); (ii) durante la excavación, donde los restos pueden ser contaminados por los arqueólogos y (iii) durante el análisis, a pesar de que no se hayan realizado extracciones o amplificaciones de DNA humano con anterioridad, ya que el PCR es capaz de amplificar DNA a partir de una sola célula (Zhang et al. 1992), que puede provenir incluso de la piel facial del investigador, si se expone durante la preparación de una reacción de amplificación (Kitchin, et al. 1990).

Para ilustrar la profundidad de este problema, algunos investigadores han analizado DNA extraído de animales, a partir de los que se intenta la amplificación de segmentos específicos de la especie humana. El resultado es que han encontrado secuencias humanas

---

en estos extractos, que sólo pueden provenir de un evento de contaminación (Handt et al. 1994b; Richards y Sykes, 1995).

Por otra parte, además de la eficacia para detectar DNA, el PCR posee otra característica que lo convierte en una técnica especialmente delicada, consistente en su capacidad de producir una gran cantidad de copias del segmento buscado. Cuando se produce tal cantidad de copias existe el riesgo de que se puedan difundir en el laboratorio, contaminando áreas de trabajo, material y equipo, alcanzando finalmente los reactivos utilizados tanto en la extracción como en la amplificación (Pag. 116).

Para controlar el problema de la contaminación, es necesario establecer sistemas tanto para evitarla, como para detectarla. Cómo es lógico, no es posible evitar la contaminación que se produce en las etapas anteriores a la excavación, pero sí es posible detectarla, realizando diferentes extracciones del mismo individuo y comparando los resultados. De cualquier forma, lo más importante es tener en cuenta la posibilidad de que este tipo de contaminación haya ocurrido, como en el caso de enterramientos múltiples o de restos recuperados de cubiles de carroñeros, en la interpretación de los resultados. Por otro lado, el DNA exógeno que pueda contaminar la muestra en estas etapas, será un DNA que probablemente presentará similares condiciones de degradación y daño molecular que el de la muestra en cuestión, por lo que se puede considerar un problema relativamente menor, así que el problema fundamental se presenta durante la excavación y después de ésta.

Para evitar la contaminación de los restos humanos durante la excavación, los arqueólogos deben tener en cuenta que el material destinado para análisis de DNA debe ser manejado con extremo cuidado. Lo ideal sería excavar el espécimen usando guantes, mascarilla quirúrgica y material de trabajo estéril. En cuanto a la detección, la mejor manera consiste en caracterizar el DNA de los arqueólogos que participen en la excavación, para poder contrastar su DNA con el de la muestra. Sería recomendable por tanto, que en cada excavación sólo una o dos personas se encarguen de la recuperación del material destinado para el análisis molecular.

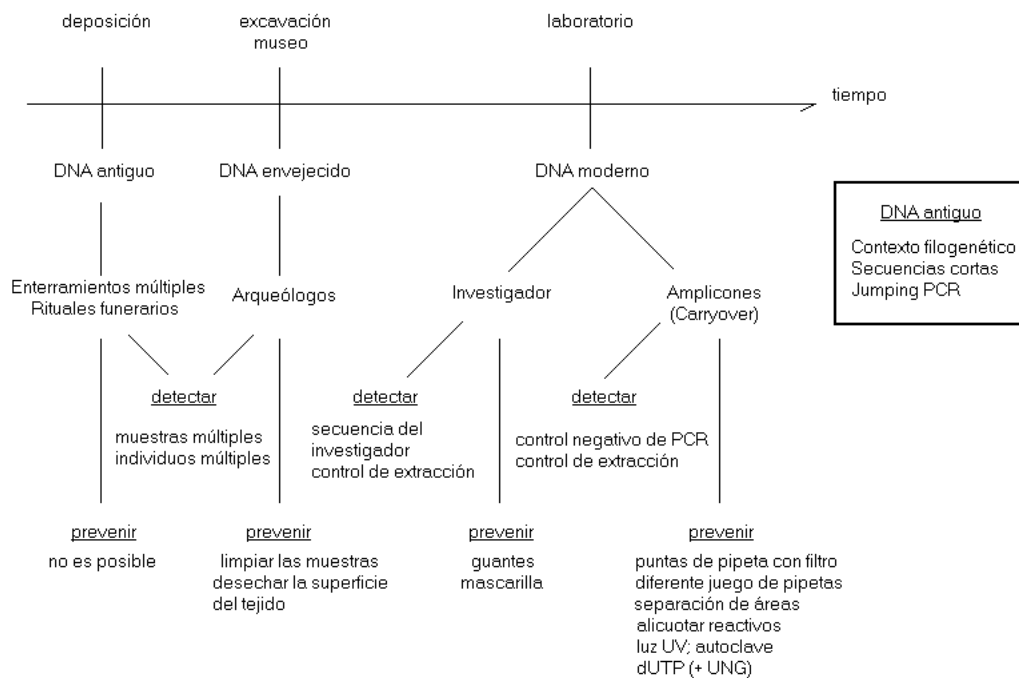
En muchos casos, las muestras han sido excavadas en tiempos en los que no se pensaba en su utilización para análisis de DNA y el manejo de las muestras pudo haberlas contaminado. Este tipo de contaminación puede ser bastante perjudicial y difícil de detectar si no se cuenta con el DNA del arqueólogo, pues diferentes muestras de un mismo individuo podrían dar la misma secuencia contaminante si la contaminación ha sido intensa (Richards y Sykes, 1995; Cooper, 1997). En estos casos resulta de primordial importancia la adecuada selección de la muestra y el tejido. Son preferibles las superficies internas de los tejidos o las zonas protegidas de la contaminación y resulta esencial la limpieza superficial de la

---

muestra, mediante tratamientos químicos o con luz UV, con el fin de inactivar el posible DNA contaminante.

La etapa siguiente, la del análisis, también representa un riesgo mayor de contaminación y varios autores han sugerido diversos procedimientos para evitarla y detectarla (Pääbo, 1989; Hagelberg et al. 1991a; Hagelberg, 1994a; Handt et al. 1994b; Francalacci, 1995; Austin et al. 1997a). Estos procedimientos incluyen:

- La separación de las áreas de trabajo. Especialmente para las actividades que se realizan antes y después del PCR. Es ideal dedicar laboratorios exclusivamente para el trabajo con DNA antiguo, equipados con todo el material y equipo necesarios, de uso también exclusivo
  - Tomar precauciones rigurosas en la preparación y manejo de todas las soluciones y el uso de material desechable en la medida de lo posible
  - Condiciones adecuadas de esterilidad y medidas de precaución para evitar la contaminación por parte del investigador, como el uso de campanas de aire filtrado, guantes, mascarillas y batas. La limpieza rutinaria de las áreas de trabajo con productos químicos o luz UV
  - Realizar el trabajo de laboratorio con la máxima concentración, sin distracciones ni conversaciones
  - Utilizar controles adecuados para monitorizar la contaminación, como la utilización rutinaria de blancos de extracción, que consiste en realizar el mismo proceso que se lleva a cabo para la extracción de DNA de la muestra, utilizando los mismos reactivos pero sin agregar la muestra en cuestión, así como blancos de PCR, en los que no se añade DNA a la mezcla de reacción. Está claro que si alguno de estos controles arroja un resultado positivo, se debe a que los reactivos están contaminados. La Figura MT-8 muestra las etapas en las que puede ocurrir contaminación y los procedimientos habituales para prevenirla y detectarla.



**Figura MT-8** Posibles fuentes de contaminación con DNA exógeno, su detección y prevención. De acuerdo con Fracalacci, 1995.

### El efecto *carrier*

En algunos laboratorios se ha observado que a pesar de que los blancos de extracción y de PCR resulten negativos, las secuencias obtenidas en algunas muestras provienen de algún DNA contaminante (Cooper, 1992; Handt et al. 1994b). Este fenómeno implica que en los reactivos de extracción o de amplificación pueden existir trazas de DNA exógeno que no son detectadas en los blancos, pero que sin embargo si producen amplificación en las muestras.

Se han propuesto dos mecanismos por los cuales es posible esta amplificación selectiva. Podría ser que el DNA contaminante sea distribuido al azar en los tubos de extracción debido a su extrema disolución, por lo que en algunos casos sería detectado pero no en otros. Dado que normalmente suele haber más muestras que blancos, las muestras tendrán más posibilidades de contener el DNA exógeno. No obstante, según las observaciones de Alan Cooper (1992) esta posibilidad es poco probable. La otra hipótesis postula que el DNA contaminante podría ser adsorbido en las paredes del tubo de polipropileno, evitando ser amplificado, pero en los tubos en los que se agrega el extracto de las muestras, el DNA de microorganismos u otras moléculas que contiene, como los azúcares, pueden arrastrar el DNA contaminante desprendiéndolo de las superficies

---

plásticas y permitiendo así su amplificación. A este efecto se le denomina efecto de transporte o efecto *carrier*.

Sea cual sea el mecanismo, esta forma insidiosa de contaminación es muy difícil de detectar y puede ser una continua fuente de preocupación en los estudios de DNA antiguo (Handt et al. 1994b), haciendo necesario el uso de criterios adicionales de autenticación.

### Autenticidad

Como lo demuestra el efecto *carrier*, el problema de la contaminación es tan difícil de resolver, que para considerar como auténtico el DNA extraído de restos antiguos es necesario aplicar una serie de criterios además de seguir los procedimientos para evitar la contaminación y la utilización de blancos. Muchos autores han delineado una serie de estrategias y criterios útiles en la autenticación de los resultados (Pääbo et al. 1989; Lindahl, 1993b; Hagelberg, 1994a; Handt et al. 1994b; Austin et al. 1997a; Yang et al. 1997), destacando principalmente:

- Caracterización del DNA obtenido. Debe presentar la fragmentación esperada y una relación inversamente proporcional entre el tamaño de los fragmentos y la eficiencia en su amplificación
  - Los análisis de prospección molecular deben ser compatibles con la persistencia del DNA en las muestras
  - Comparación de los resultados positivos con los negativos. El caso de los trabajos en ámbar es un ejemplo de la aplicación de este criterio
  - Los resultados deben ser reproducibles. Deben hacerse al menos dos extractos del mismo individuo y el DNA de los diferentes extractos debe mostrar los mismos polimorfismos. Lo ideal es la reproducción del resultado a partir de diferentes muestras analizadas en laboratorios independientes
  - Cuando las condiciones de preservación del DNA lo permitan, la determinación genética del sexo de los individuos para compararla con la determinación morfológica, puede ser un buen criterio de autenticidad, si los resultados concuerdan
    - En el caso de la identificación forense, la comparación del DNA obtenido con el de los familiares
    - El DNA debe tener sentido filogenético en relación a la especie en estudio

---

El criterio del “sentido filogenético” es más fácil de aplicar cuando se estudian especies extintas en los que la contaminación puede ser detectada cuando un análisis filogenético no sitúa las especies en estudio cerca de sus parientes biológicos (Pääbo et al. 1989). Por ejemplo, la autenticidad de la secuencia de DNA obtenida del cuagga, fue probada por el hecho de que demostró que el cuagga era un pariente cercano de las cebras actuales, sin ser idéntica a la secuencia de cualquiera de las especies analizadas.

De igual forma, las secuencias de mtDNA del mamut siberiano mostraron que el mamut estaba cercanamente relacionado con los elefantes pero no era idéntico con ninguna de las especies de elefante (Pääbo et al. 1989).

Por el contrario, en el caso de las poblaciones humanas, este criterio no es tan fácilmente aplicable, puesto que si la contaminación proviene de otro ser humano, la secuencia continuará teniendo sentido filogenético. En algunos casos sin embargo, es posible aplicar este criterio, por ejemplo, cuando se analizan poblaciones con un polimorfismo definido. Tal es el caso de las poblaciones indígenas americanas, que contienen tipos específicos de mtDNA diferentes a la de los investigadores occidentales que en la mayoría de los casos han participado en las excavaciones y llevan a cabo el análisis. De cualquier manera, es necesario contar con un banco de datos previo sobre los polimorfismos en estudio, que incluya su frecuencia y distribución geográfica, aunque esto conlleva el riesgo de que los resultados inesperados puedan ser considerados como contaminación, en lugar de considerarse descubrimientos que desafíen la ortodoxia histórica (Richards y Sykes, 1995).

En el caso de las poblaciones europeas, el problema se agudiza, pues encontrar un polimorfismo europeo, cuando los investigadores son europeos, no deja mucho margen para la identificación de la contaminación. De hecho, el problema de la contaminación previa al laboratorio, el efecto *carrier* y la falta de un buen método para detectar las secuencias contaminantes, han hecho que algunos investigadores opinen que es preferible no trabajar con poblaciones humanas (H. Poinar; S. Pääbo, comunicación personal) y que otros se muestren escépticos al extremo (Cooper, 1997). Es por todos estos problemas que uno de los principales objetivos de esta tesis sea el desarrollo de un sistema que permita la autenticación del DNA antiguo obtenido de poblaciones humanas europeas.

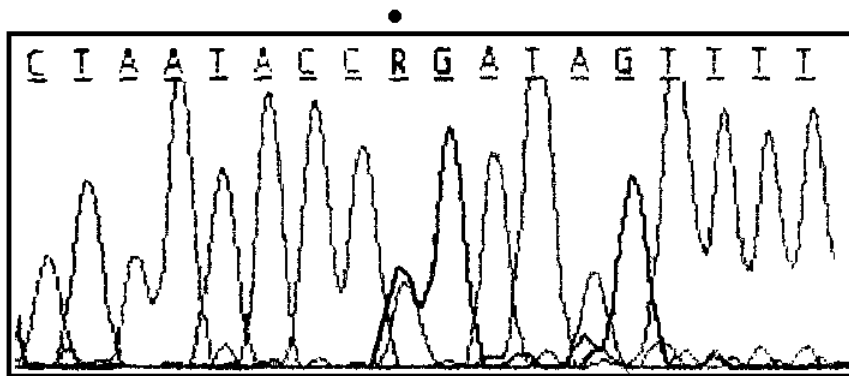
### Secuenciación directa

En algunos casos la secuenciación directa del segmento amplificado, puede dar como resultado uno o varios sitios ambiguos, es decir, sitios que presentan dos o más



---

nucleótidos diferentes (Fig.MT-9). En DNA antiguo este resultado puede deberse a varios factores, como errores de la *Taq* polimerasa inducidos por el daño molecular de las secuencias originales, amplificación de inserciones nucleares del mtDNA, presencia de secuencias contaminantes y en menor medida, la existencia de un sitio heteroplásmico auténtico. Handt y colaboradores (1996), han propuesto que para discriminar entre estas opciones es necesaria



**Figura MT-9** Histograma obtenido por secuenciación directa. El punto señala un sitio con dos picos superpuestos, representando dos nucleótidos diferentes, en este caso G y A. Tomado de Cano, 1996.

la secuenciación de múltiples clones de la muestra amplificada. Con esta aproximación es posible detectar la presencia de secuencias contaminantes, errores de la *Taq*, o sitios heteroplásmicos. No obstante, estos autores han observado que este fenómeno tiende a producirse sólo en las muestras en las que existe muy poco o nada de DNA endógeno. Si existen muy pocas copias, el efecto de los errores de la *Taq* se magnifica produciendo secuencias diferentes y también la presencia de pocas secuencias contaminantes cobra mayor relevancia. Por lo tanto, si mediante secuenciación directa se observan signos de secuencias heterogéneas, es recomendable clonar el producto de la amplificación y analizar múltiples clones (Handt et al. 1996).

### Aplicaciones y perspectivas

El hecho de poder recuperar y caracterizar DNA de material antiguo, presenta múltiples perspectivas, ya que esta vía de estudio permite prácticamente “retroceder” en el tiempo para obtener información relevante de los organismos estudiados; información que de otra manera sería imposible conocer. Las posibilidades de estudio abarcan todos los

---

niveles de la organización biológica: individual, poblacional, de especie, e incluso el molecular. Numerosas revisiones han dado cuenta de las posibilidades que ofrece el DNA antiguo (Pääbo, 1987; Rogan y Salvo, 1990; Brown y Brown, 1992b; Pääbo, 1993; Brown y Brown, 1994b; DeSalle, 1994; Roy et al. 1994; Cano, 1996; Yang, 1997) y a continuación se presenta una visión general del tipo de estudios que es posible realizar, así como de las perspectivas teóricas y algunas de las limitaciones de esta metodología.

### Zoología y Botánica

En lo referente a la zoología, se ha probado la utilidad del DNA antiguo en los estudios que ayudan a esclarecer las relaciones filogenéticas de especies extinguidas, como el cuagga (Higuchi et al. 1987), el lobo marsupial (Thomas et al. 1989) y las moas (Cooper et al. 1992). Incluso, algunas secuencias antiguas se han utilizado como grupo externo (outgroup) para esclarecer las relaciones de grupos actuales, como en el caso de los elefantes (Yang et al. 1996). Estudios similares pueden llevarse a cabo estudiando plantas antiguas.

Por otra parte, los estudios de aDNA también pueden ayudar a esclarecer cuestiones de la ecología de los animales extinguidos, ya que se ha demostrado que a partir de sus excrementos preservados es posible determinar la especie de las diferentes plantas y organismos que constituyeron su dieta, análisis que ha sido denominado “coproscopía molecular” (Poinar et al. 1998).

### Medicina Forense

Podría decirse que el estudio del DNA en restos del ámbito forense ha surgido independientemente de los estudios de DNA antiguo, pues el primer trabajo relevante fue publicado en 1985 por P. Gill y A. Jeffreys, en el que se demostraba que era factible aplicar la caracterización de las “huellas digitales” genéticas (DNA fingerprints) en el DNA obtenido a partir de impregnaciones de sangre y semen de 4 años de antigüedad hechas en tela de algodón (Gill et al. 1985). Sin embargo, algunos avances típicamente del campo del DNA antiguo, como la posibilidad de extraer DNA de huesos y dientes, han dado un fuerte impulso a los estudios del DNA forense.

El material con el que se trabaja suele ser relativamente reciente y en buen estado de conservación y esto ha propiciado la obtención de resultados sorprendentes, basados en el

---

análisis de DNA nuclear, ya sea de genes de una sola copia, o con técnicas que requieren DNA de alto peso molecular. Así, se ha informado de la determinación del sexo (Pascal et al. 1991; Akane et al. 1992; Pfitzinger et al. 1993; Mannucci et al. 1994; Kreike y Lehner, 1995) y la identificación de cadáveres del ámbito forense a partir de muestras de huesos (Hagelberg et al. 1991b) y dientes (Pötsch et al. 1992) en los que se han utilizado tanto los “fingerprints” (Gill et al, 1985), como los minisatélites o VNTRs (Forman, 1991), los microsátélites o STRs (Yamamoto et al. 1998) y el mtDNA (Sullivan et al. 1992; Lutz et al. 1996).

Estos estudios se han extendido también a los casos de relevancia histórica, como la identificación de los restos de personajes como Josef Mengele (Hagelberg, 1994a), miembros de la familia del Zar Nicolás II (Ivanov et al. 1996), de los restos de Carl Naundorff, de quien se había dicho que era hijo de Luis XVI y María Antonieta de Francia, pero que cuando fueron analizados genéticamente evidenciaron que esta suposición era improbable (Jehaes et al. 1998), e incluso se ha informado de investigaciones tan curiosas como la determinación del sexo de una muestra de sangre aparecida en una estatua de la Virgen María, que resultó ser del género femenino (Palmirota et al. 1998).

En el estudio del DNA forense, los avances han sido tan espectaculares que han producido cambios en las leyes inglesas, que ahora autorizan la colecta de raspados bucales para generar archivos de DNA de individuos sospechosos o convictos de algún crimen (Gill, 1995).

#### Datos de relevancia arqueológica y antropológica

Las contribuciones de los estudios del DNA antiguo en la arqueología y la antropología, pueden darse en los dos niveles de acción de estos campos. Por un lado, pueden ayudar a obtener datos importantes de un yacimiento en particular, enmarcándolos dentro del contexto de la población y por otro, pueden ayudar a esclarecer o a construir teorías generales sobre grupos de poblaciones, incluyendo sus relaciones y migraciones (Brown y Brown, 1994b).

En la interpretación de los sitios arqueológicos, es útil la identificación del sexo de los individuos, sobre todo en los casos en los que las condiciones de preservación, no permitan la determinación morfológica, o en el caso de individuos infantiles, en los que todavía no se han definido las diferencias sexuales en el nivel anatómico. Diversos trabajos han demostrado que es posible la determinación del sexo en restos arqueológicos

---

(Hummel y Herrmann, 1991; Faerman et al. 1995; Halbout et al. 1996; Stone et al. 1996; Palmirotta et al. 1997; Cipollaro et al. 1998; Ovchinnikov et al. 1998) y en algunos casos esta aproximación ha contribuido a esclarecer costumbres de un grupo concreto de individuos, como en el caso de los romanos de Ashkelon en Israel, que practicaban el infanticidio de los varones, contrariamente a las costumbres generales de la sociedad romana en la que las víctimas solían ser mayoritariamente del sexo femenino (Faerman et al. 1997).

También puede ser de gran utilidad la determinación de las relaciones familiares de los individuos encontrados, sobre todo en el caso de los enterramientos múltiples. Sin embargo, Brown y Brown (1994b) han expuesto la dificultad de alcanzar un buen nivel de confianza para esta determinación, pues es necesario contar con un marco de referencia de la variabilidad genética de la población que permita determinar los grados de diferencia genética correspondientes a hermanos, primos o padres e hijos, siendo necesario llevar a cabo un tipaje del DNA de varios enterramientos contemporáneos de la misma población genética, lo que a menudo no es posible debido a la falta de disponibilidad de los restos humanos necesarios. No obstante, algunos métodos pueden representar una buena aproximación, sobre todo si se combina el análisis de microsatélites (STRs) y de mtDNA, como lo demostraron Kurosaki y colaboradores (1993).

El análisis del DNA de restos arqueológicos también puede ofrecer datos acerca de las enfermedades que sufrieron las poblaciones estudiadas. La detección de enfermedades en poblaciones antiguas, puede ser importante en la evaluación de su prevalencia y en algunos casos, podría ayudar en la determinación de los movimientos migratorios de las poblaciones y las interacciones entre ellas. También podría investigarse el origen de algunas enfermedades en determinadas poblaciones, como el de la sífilis en el continente americano, lo que ayudaría a esclarecer las dudas de si fue o no introducida al nuevo mundo por los españoles (Ross, 1992).

En el DNA de restos antiguos se pueden buscar mutaciones puntuales que den origen a enfermedades genéticas si se conoce el gen específico y la localización de la mutación. Por ejemplo, se ha informado de la amplificación del gen de la fibrosis quística (Estivill et al. 1991, citado por Pérez-Pérez, 1992) y el de la  $\beta$  talasemia (Béraud-Colomb et al. 1992; 1995) en DNA antiguo. Además, también es posible determinar la presencia de cualquier enfermedad que deje su huella genética, como infecciones virales o bacterianas. Podría identificarse por ejemplo la hepatitis, la sífilis o la malaria. De hecho, se ha detectado DNA de Mycobacterium tuberculosis en restos humanos momificados (Salo et al. 1994; Nerlich et al. 1997), así como de Mycobacterium sp. (Crubézy et al. 1998) y

---

Mycobacterium leprae (Rafi et al. 1994) en tejido óseo; y de Yersinia pestis en pulpa dentaria (Drancourt et al. 1998).

Por otra parte, Rafi y col. (1994) han destacado que la amplificación de DNA de microorganismos, podría por sí misma, establecer una nueva disciplina científica, la paleobacteriología, en la que los campos de acción serían fascinantes, como la investigación sobre la teoría de la preexistencia de la resistencia a antibióticos.

Así mismo, el estudio de restos de plantas y animales relacionados con el hombre, puede ayudar en temas como el origen de su domesticación. Se han hecho algunos estudios con muestras de maíz precolombino (Rollo et al. 1988) y con semillas de trigo encontradas en yacimientos arqueológicos (Brown et al. 1994a), que demuestran la persistencia de DNA en este tipo de restos. En el caso de animales, se ha estudiado el origen del conejo europeo (Hardy et al. 1994) y no se descarta que sea posible analizar restos de ovejas y cabras (Brown y Brown, 1992b).

#### Migraciones y genealogía de poblaciones humanas

Una de las perspectivas más prometedoras en el campo del aDNA, está determinada por la posibilidad de profundizar en el estudio de las poblaciones humanas. Tradicionalmente, las relaciones filogenéticas de estas poblaciones han sido estudiadas a través de análisis genéticos en individuos vivos y con estos datos ha sido construida de forma retrospectiva la historia de las poblaciones y las relaciones entre ellas. Con este enfoque, se han desarrollado interesantes estudios que abordan temas como el origen de los indígenas americanos (Schurr et al. 1990; Horai et al. 1993; Torroni et al. 1994c; Brown et al. 1998), de los vascos (Bertranpetit et al. 1995) o de los toscanos (Francalacci et al. 1996) y la cuestión acerca de si los europeos modernos provienen de poblaciones locales de Neandertales o de inmigrantes del este (Torroni et al. 1994b; Richards et al. 1996; Comas et al. 1997). Así mismo, se han hecho muchos estudios para tratar de dilucidar el origen del Homo sapiens (Brown, 1980; Cann et al. 1987a; Wilson, et al. 1987; Horai y Hayasaka, 1990; Hasegawa y Horai, 1991; Merriwether et al. 1991; Vigilant, et al. 1991; Pesole et al. 1992, Ruvolo et al. 1993; Templeton, 1993; Horai et al. 1995; Penny et al. 1995; Zischler et al. 1995a; Tishkoff et al. 1996; Watson et al. 1997 entre otros).

No obstante, el utilizar datos actuales para inferir eventos del pasado, no deja de tener una dosis, en mayor o menor grado, de especulación. La posibilidad de obtener DNA de individuos de épocas pretéritas abre la expectativa de minimizar las inferencias

---

especulativas acerca de sucesos de la historia de las poblaciones de nuestra especie, incluyendo el siempre polémico origen del hombre moderno.

Así, aprovechando las ventajas que brinda la metodología del DNA antiguo, ya se han realizado estudios para aclarar el origen de los japoneses (Horai et al. 1991; Oota et al. 1999), de los indígenas americanos (Merriwether, 1994; Lalueza, 1996; Monsalve et al. 1996; Parr et al. 1996; Ribeiro dos Santos et al. 1996; Lalueza et al. 1997; Stone y Stoneking, 1998), de las poblaciones de la islas del Pacífico (Hagelberg y Clegg, 1993; Hagelberg et al. 1994b; Hagelberg, 1997) y de los Vascos (Izagirre et al. 1998); y no es arriesgado pensar que sea posible abordar estudios que ayuden a esclarecer incógnitas como la relación de la población aborigen australiana con otras poblaciones antiguas o actuales; investigar si los anglosajones provienen de las invasiones germánicas o de los romano-bretones; o probar si es cierta la sugerencia de que los europeos modernos provienen de migraciones de agricultores del próximo oriente, analizando restos humanos del Paleolítico y Neolítico. Por otra parte, puede completarse cada vez más el rompecabezas para el esclarecimiento del origen del Homo sapiens, como lo demuestran los estudios realizados con individuos Neandertales (Kriings et al. 1997; Ovchinnikov et al. 2000), sin olvidar la posibilidad de estudiar poblaciones antiguas africanas (Ross, 1997), como lo demuestra el trabajo de Lalueza Fox (1997).

### Evolución molecular

Es importante hacer notar que en cuanto a la identificación en medicina forense y a los estudios genealógicos y filogenéticos se refiere, todas las aplicaciones anteriormente mencionadas, han desarrollado sus métodos en base a los estudios de la variabilidad molecular, la cual a su vez ha surgido por un proceso de cambio denominado evolución molecular.

No obstante, al igual que en los estudios de la genealogía de poblaciones, los estudios para reconstruir el proceso histórico de la evolución molecular, han obtenido sus conclusiones de forma retrospectiva. Se han calculado tasas de mutación de diferentes segmentos de DNA tanto de humanos como de otras especies, analizando la variabilidad actual que presenta determinado segmento en individuos de la misma especie o de especies relacionadas (ej. Brown et al. 1979). Ahora bien, gracias al desarrollo de las técnicas de extracción de DNA de restos biológicos antiguos, es posible diseñar investigaciones introduciendo una variable temporal y esto implica que el proceso evolutivo puede ser ahora “visto” a través del tiempo de una forma directa. Lo que se requiere es contar con

---

especímenes lo suficientemente antiguos de la misma especie o al menos de la misma línea filogenética que los individuos actuales, para analizar determinado gen o segmento de DNA y poder así observar cómo y a qué velocidad evoluciona a través del tiempo. De esta forma, las tasas de evolución, podrían ser calculadas con mayor precisión.

En cuanto a lo que significa suficientemente antiguo, cabe mencionar que dependerá del tipo de DNA que se quiera estudiar, por ejemplo, como ya se ha expuesto (Pag. 21), en el caso de la región de control del DNA mitocondrial humano se han calculado tasas más rápidas que en el DNA nuclear usando métodos filogenéticos retrospectivos y todavía más rápidas mediante observaciones empíricas. En este caso, el rango actualmente aceptado para la preservación del DNA de 100,000 años encaja perfectamente para observar la evolución de esta zona de la molécula y quizá la limitación esté dada por la disponibilidad de restos humanos que conformen un amplio mosaico en tiempo y espacio. En este sentido, las poblaciones antiguas europeas podrían ser una buena opción.

Por el contrario, para analizar regiones del genoma de más lenta evolución, será necesario contar con organismos de millones de años de antigüedad, lo que prácticamente excluiría los restos no fosilizados como fuente de información genética. La situación polémica de los resultados obtenidos con restos fosilizados, no permiten de momento especular con base firme sobre esta posibilidad, por lo que será necesario esperar a entender mejor los mecanismos de preservación del DNA y determinar cuales son los límites de tiempo efectivos.

Por otra parte, los métodos de reconstrucción filogenética, no cuentan con un medio para verificar su efectividad, pues sus resultados se refieren a eventos pasados de los que nadie ha podido ser testigo. Sin embargo, con el DNA antiguo, será posible retroceder en el tiempo, para verificar si determinadas filogenias son como las predicen los métodos, lo que a fin de cuentas constituye un medio de verificación de los distintos métodos. Las posibilidades de trabajo en este campo son bastante amplias y los resultados pueden ser muy útiles y satisfactorios.

---

## Reacción en Cadena de la Polimerasa ó PCR

En 1983, Kary B. Mullis que entonces trabajaba en la corporación Cetus, estaba tratando de inventar un método de secuenciación de DNA que fuera rápido y eficiente, introduciendo algunas modificaciones al método de Sanger. El Método de Sanger (Sanger et al. 1977) se basa en la incorporación de nucleótidos marcados en una de las dos cadenas del DNA, mediante la hibridación de un oligonucleótido o *primer* a partir del cual la polimerasa empieza a sintetizar la cadena complementaria; pero el método pensado por Mullis utilizaría las dos cadenas y dos oligonucleótidos flanqueando la zona a secuenciar.

Existen varias razones por las que su método no hubiese funcionado para secuenciar DNA y una noche de primavera cuando Kary Mullis estaba pensando como resolverlas, cayó en la cuenta de que su idea tenía en realidad un potencial mucho mayor, no como método de secuenciación, sino para la obtención de un número ilimitado de copias de un fragmento concreto de DNA. Su método, que después fue denominado Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR (por sus siglas en inglés), es sorprendente por su simplicidad conceptual y por el hecho de que hubiese pasado inadvertido durante 15 años después de que estuviesen disponibles todos los elementos para su implementación (Mullis, 1990).

Algún tiempo después, se publicó el primer artículo que informó de la aplicación práctica del PCR, refiriéndose a la amplificación de secuencias de la  $\beta$ -globina para el diagnóstico prenatal de la anemia falciforme (Saiki et al. 1985). Más tarde, fue publicada una descripción del método y su potencial (Mullis y Faloona, 1987) y finalmente se publicó el método en su forma actual, en la que se utiliza una DNA polimerasa termoestable, mejorando significativamente la especificidad, la eficiencia, la sensibilidad y disminuyendo el tiempo necesario para completar el procedimiento (Saiki et al. 1988).

El PCR se difundió rápidamente y actualmente es utilizado en prácticamente todos los laboratorios en los que se analiza DNA. El gran impacto que ha tenido el PCR en el avance científico, le han merecido a Kary Mullis compartir el premio Nobel de química de 1993, en el que se hace mención de las múltiples aplicaciones del método, incluyendo la recuperación de secuencias de DNA antiguo.



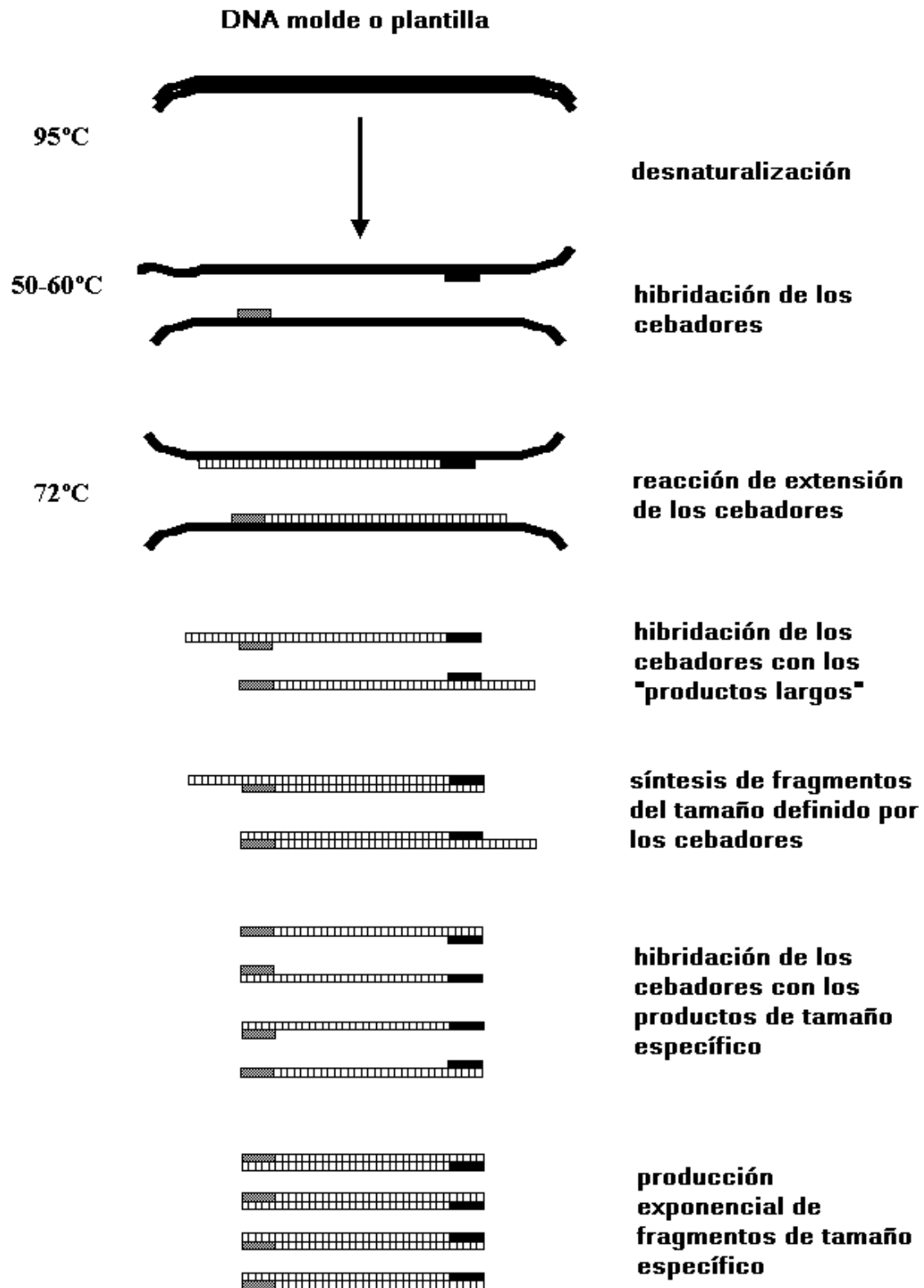
---

## Principios teóricos

El PCR es un método que permite obtener billones de copias de un fragmento de DNA, a través de un proceso iterativo de copiado, llamado amplificación, en el que el número de copias se incrementa exponencialmente en cada ciclo de replicación. Es un método específico que hace posible amplificar un determinado fragmento que inicialmente puede estar purificado o que puede ser parte de una mezcla compleja de materiales biológicos. Para su funcionamiento se vale de los principios básicos de la termodinámica y de las propiedades químicas de la molécula del DNA, como su conformación en doble cadena con apareamiento específico de bases.

Este método de replicación *in vitro* ha sido llamado también clonación sin célula (cell-free cloning) (Saiki et al. 1988) pues tiene el mismo fin que la clonación bacteriana, pero sin sus inconvenientes. De hecho, como parte esencial de su funcionamiento, utiliza el mismo tipo de enzima usada por los organismos *in vivo* para la replicación del DNA: la DNA polimerasa. Esta enzima es capaz de sintetizar una cadena complementaria de DNA en el sentido 5' – 3' utilizando una cadena sencilla como plantilla, pero partiendo de una región de doble cadena. Este proceso es conocido como reacción de extensión del *primer* o cebador y es la base de una variedad de técnicas de marcaje y secuenciación. El PCR se basa en este mismo principio, sólo que utiliza dos oligonucleótidos como cebadores, siendo cada uno complementario a cada una de las dos cadenas en cada uno de los dos extremos del fragmento de DNA que se quiere amplificar. Los *primers* se construyen de tal forma que cada reacción de extensión sintetiza el DNA en dirección a la otra (Fig.MT-10). El resultado es una síntesis *de novo* de la región flanqueada por los dos cebadores.

Para que esta reacción tenga lugar, se requieren los 4 trifosfatos de desoxinucleótido (dNTP's) que proveen la energía y los nucleósidos para la síntesis; la DNA polimerasa; los cebadores; el DNA que se quiere amplificar y que servirá de plantilla; y un tampón que contenga magnesio. Cada ciclo de replicación comienza con la separación de las dos cadenas del DNA plantilla, la hibridación de los oligonucleótidos y la reacción de extensión, después de la cual, las nuevas cadenas pueden servir nuevamente como plantillas para el siguiente ciclo.



**Figura MT-10** Representación esquemática de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los fragmentos largos se acumulan siguiendo una producción lineal, en tanto que los fragmentos de tamaño específico son producidos exponencialmente.

---

Durante el primer ciclo y los siguientes, las reacciones de extensión de cada oligonucleótido sobre la plantilla original, producirán una nueva molécula de cadena sencilla de una longitud indefinida que va más allá del sitio donde hibrida el *primer* opuesto. Estos “productos largos” se acumulan de manera lineal, es decir, la cantidad existente después de cada ciclo será linealmente proporcional al número de ciclos. Sin embargo, cada uno de estos productos servirá como plantilla para uno u otro primer durante los siguientes ciclos y su extensión por la polimerasa producirá moléculas del tamaño definido por los extremos 5' de los dos *primers*. Estas moléculas, funcionarán a su vez como plantillas para la síntesis de más moléculas del mismo tamaño (Fig.MT-10), de tal forma que la repetición cíclica de este proceso dará como resultado la acumulación exponencial de fragmentos del tamaño específico, hasta  $2^n$ , dónde  $n$  representa el número de ciclos (Saiki et al. 1988).

Sin embargo, este proceso de potenciación no es ilimitado, ya que después de cierto número de ciclos se alcanza una saturación de la reacción, en la que se acumula más cantidad de substrato plantilla-cebador de la que es capaz de procesar la polimerasa en el tiempo asignado. Cuando esto ocurre, la eficiencia de la reacción comienza a declinar y la cantidad de producto del PCR se acumula de forma lineal (Saiki et al. 1988), punto en el que se dice que la reacción ha alcanzado el “plateau” (meseta). El número de ciclos necesarios para llegar al *plateau* puede variar en función del número de moléculas iniciales, aunque normalmente ocurre alrededor de los 30 ciclos.

Para conseguir que se lleve a cabo cada uno de los pasos que conforman un ciclo, se controla la temperatura mediante un dispositivo, llamado comúnmente termociclador, que es capaz de calentar o enfriar el tubo de la reacción según sea necesario. Así, en el primer paso se consigue la separación de las cadenas del DNA o desnaturalización elevando la temperatura; durante el segundo paso, se reduce la temperatura para que los oligonucleótidos puedan formar asociaciones estables (hibridar) con las hebras separadas del DNA objetivo y servir como cebadores para la síntesis; finalmente, durante el tercer paso se utiliza la temperatura óptima para que la polimerasa lleve a cabo la reacción de extensión con la mayor eficiencia. Este paso completa un ciclo y el siguiente comienza con el regreso a la temperatura de desnaturalización. Después de 20-40 ciclos, el DNA amplificado puede ser analizado en cuanto a tamaño, cantidad, secuencia, etc., o usado en posteriores procedimientos experimentales, como por ejemplo, ser clonado.

### **Polimerasas termoestables**

---

En un principio se utilizaba para la reacción de PCR, el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli*, que funciona a temperaturas fisiológicas (Mullis y Fallona, 1987). El problema es que esta polimerasa se inactiva al inicio de cada ciclo cuando se eleva la temperatura durante la desnaturalización, haciendo necesario que entre ciclo y ciclo, se tenga que añadir una nueva cantidad de enzima. Mullis y colaboradores (Saiki, 1988) superaron este problema mediante el uso de una polimerasa termoestable, la *Taq* DNA polimerasa, aislada de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*, capaz de resistir las temperaturas utilizadas en el proceso y con una temperatura de funcionamiento óptima de 72° C. Actualmente existe una variedad de enzimas termoestables aisladas de bacterias termófilas, que se utilizan en su forma nativa o modificada. También existen polimerasas recombinantes, obtenidas mediante la expresión del gen en *E. coli*.

La polimerasa más común, la *Taq* DNA polimerasa, se caracteriza por su carencia de *proofreading*, actividad de exonucleasa de sentido 3' – 5' que presentan algunas polimerasas para corregir los errores que puedan cometer en el apareamiento de bases. No obstante, Eckert y Kunkel (1990) han calculado que la tasa de error de la *Taq* puede ser tan baja como  $10^{-5}$ , por lo que se considera que la *Taq* tiene una fidelidad lo suficientemente alta para todas las aplicaciones del PCR, incluyendo el diagnóstico. Otra característica peculiar de la *Taq*, es que genera extremos cohesivos al agregar una o dos Adeninas al final del fragmento sintetizado (Clark, 1988). Esto puede ser de utilidad para la manipulación del DNA amplificado mediante técnicas de DNA recombinante.

La *Tth* DNA polimerasa es aislada de *Thermus thermophilus*. En presencia de  $Cl_2Mn$  esta enzima es capaz de funcionar adecuadamente como transcriptasa reversa, por lo que también se utiliza para la amplificación de DNA a partir de RNA, proceso conocido como RT-PCR. La *Tth*, es resistente a la presencia de formamida en la mezcla de PCR, así que puede ser usada cuando se pretenda disminuir la temperatura de desnaturalización del DNA con este reactivo. No presenta actividad de exonucleasa 3' – 5' y al igual que la *Taq*, agrega una A en el extremo 3'.

Otras polimerasas utilizadas son la *Pfu*, aislada de *Pyrococcus furiosus* y la *Pwo*, aislada de *Pyrococcus woesei* que se caracterizan por presentar una mayor fidelidad en la replicación, debido a su capacidad de *proofreading*. Estas polimerasas producen fragmentos con extremos romos. Cuando se amplifican secuencias muy grandes, del orden de 2 a 15 Kb, es recomendable la utilización de enzimas con una máxima fidelidad como éstas.

---

## Resultados sub-óptimos

A pesar de su sencillez, el PCR puede a veces dar resultados que no son del todo satisfactorios, como una baja eficiencia en la producción, la amplificación de fragmentos diferentes al buscado debido a la hibridación incorrecta de los *primers*, que también puede producir otro tipo de problemas.

### Baja eficiencia

La baja eficiencia se caracteriza por la obtención de muchas menos copias de las esperadas en una reacción. El PCR es un proceso exponencial, así que los factores negativos que actúen durante los primeros ciclos, tendrán un efecto mucho mayor al final, dando como resultado una producción reducida. Por ejemplo, si al inicio de la reacción existen excesivas copias de la secuencia objetivo, es posible que después de la desnaturalización compitan con los *primers* y se hibriden entre sí (Mullis y Faloona, 1987). También es posible que los *primers* no estén diseñados adecuadamente presentando una baja eficiencia en la hibridación, o que el fragmento de DNA que se pretende amplificar presente daños o este bloqueado por estructuras secundarias (Gibbs, 1990). En DNA antiguo, la presencia de inhibidores puede reducir la eficiencia, aunque por lo general se espera una producción mucho menor de la que se obtiene con DNA moderno debido al extremadamente bajo número de secuencias originales intactas.

### Amplificaciones inespecíficas

Las amplificaciones de segmentos no deseados son conocidas como amplificaciones inespecíficas y la mayoría de ellas pueden ser observadas en un gel de agarosa como bandas definidas de distintos pesos moleculares tanto de mayor como de menor tamaño del fragmento esperado, aunque también pueden ser observadas como “barridos” o *smears* compuestos por un continuo de fragmentos de diferentes tamaños. Si no se utiliza la temperatura de hibridación adecuada, los cebadores pueden hibridar de manera inespecífica, es decir en sitios donde la homología no sea del 100%. Cuando estos híbridos son extendidos por la polimerasa, dan lugar a los productos inespecíficos. A veces un mal diseño de los primers puede ser responsable de la presencia excesiva de estos productos, a pesar de que se utilice la temperatura adecuada. Por otra parte, también

---

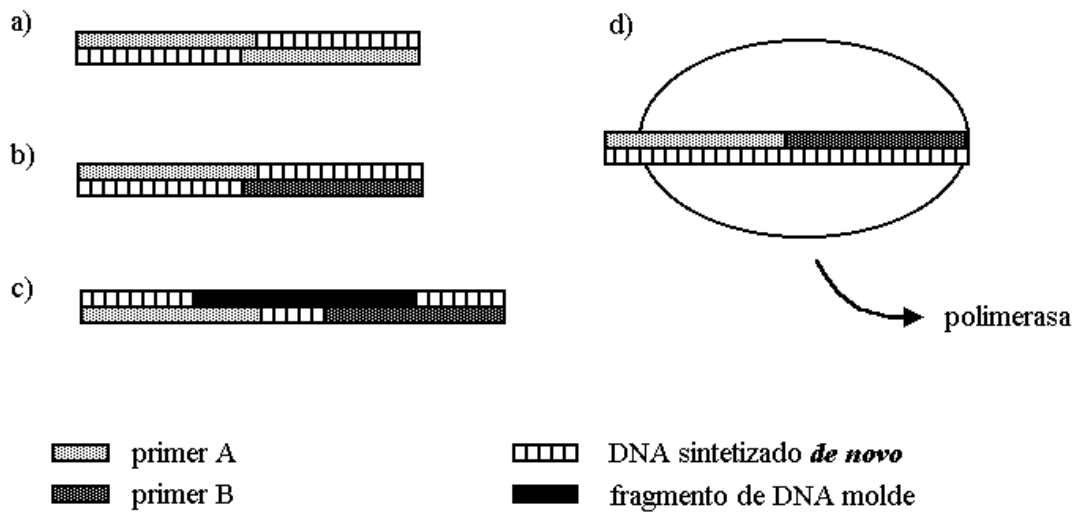
existe la posibilidad de que algunos fragmentos de DNA presentes en la muestra original hagan las veces de cebadores, iniciando el proceso de copiado inespecífico.

### Oligomerización de los cebadores

Este fenómeno es más conocido como formación de dímeros de cebadores o *primer-dimers* y consiste en la polimerización de los oligos que son de cadena sencilla para quedar convertidos en DNA de doble cadena. El proceso se inicia cuando dos cebadores se hibridan por sus extremos 3', favoreciendo la reacción de extensión (Chou et al. 1992), aunque también es posible que se unan sin mediar entre ellos hibridación de bases, pues la polimerasa puede estabilizar momentáneamente su yuxtaposición (Higuchi, 1992b).

También se ha detectado la presencia de 1 a 10 pares de bases en medio de dos *primers* y es posible que esto se deba a la intervención de fragmentos de DNA presentes en la reacción que contengan secuencias contiguas que sean suficientemente similares a cada uno de los extremos de los cebadores, como para servir de “puentes” de unión entre ellos (Kwok et al. 1990). Estrictamente hablando, un dímero está formado por dos moléculas iguales, pero en el PCR es más común la unión entre dos *primers* diferentes. No obstante, el término *primer-dimers* se ha generalizado para designar a todas las estructuras formadas con la intervención de los cebadores. En la Fig. MT-11 se muestran diferentes variantes de *primer-dimers*.

En general, la oligomerización se ve favorecida por la presencia de un número reducido de moléculas de DNA plantilla y puede hacer más difícil el análisis de muestras con estas características (Chou et al. 1992), por lo que en el DNA antiguo pueden representar un problema. Por otra parte, un mal diseño de los *primers* también puede favorecer el fenómeno de la oligomerización.



**Figura MT-11** Oligomerización de los cebadores: a) hibridación entre dos *primers* iguales, b) hibridación entre *primers* diferentes, c) unión de dos *primers* por mediación de un fragmento de DNA y d) yuxtaposición de los *primers* por mediación de la DNA polimerasa.

### Artefactos

Bajo ciertas circunstancias, el PCR puede producir moléculas quiméricas, es decir, secuencias de DNA que no existen previamente, sino que son creadas durante la reacción debido a la unión de segmentos no relacionados. Este tipo de fragmentos pueden confundir la interpretación del resultado, sobre todo si alguno de ellos resulta del mismo tamaño del fragmento esperado. Su formación está inducida por el daño molecular (Pääbo et al. 1990), así que en el DNA antiguo pueden llegar a ser un problema serio. De hecho se han identificado este tipo de secuencias mosaico al amplificar DNA antiguo (Lawlor et al. 1991; Francalacci et al. 1992).

### Optimización de la reacción

La optimización de una reacción de PCR consiste en encontrar las condiciones óptimas que permitan la mayor eficiencia en la obtención de un segmento específico de DNA con la mínima presencia de artefactos, *primer-dimers* y amplificaciones inespecíficas, e incluye la optimización de los componentes del tampón de reacción, de la

---

temperatura y la duración de los pasos del ciclo, así como un adecuado diseño de los *primers*.

### Componentes del tampón de reacción

Actualmente, las casas comerciales incluyen junto con la DNA polimerasa que ofrecen, el tampón optimizado para su funcionamiento y normalmente contiene Tris 10 mM (a un pH de entre 8.4 y 9.0), KCl 50 mM,  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  1.5 mM, gelatina y detergentes no iónicos como NP40 o Tween 20 en muy baja concentración (0.01%). Algunas casas comerciales y algunos investigadores suelen añadir otras sustancias, por razones de compatibilidad con el tampón en el que viene la enzima o con el fin de mejorar la eficiencia de la polimerasa. En la mezcla de reacción, también se deben incluir concentraciones suficientes de los 4 dNTP's, los *primers*, la DNA polimerasa y el DNA molde o plantilla.

La optimización de la cantidad necesaria de estos componentes debe hacerse de forma empírica para cada protocolo de amplificación, aunque normalmente se añaden 200  $\mu\text{M}$  de dNTP's, 1  $\mu\text{M}$  de cada *primer* y de 0.1 a 2 unidades de polimerasa, en un volumen final que puede variar de 12.5 a 100  $\mu\text{l}$ . La cantidad de DNA molde, depende de su origen y la calidad en la que se encuentre. Para una solución de DNA moderno, es posible utilizar desde 20 ng hasta 10  $\mu\text{g}$  con buenos resultados (Mullis y Faloona, 1987), aunque normalmente se usan menos de 500ng tratándose de DNA total. En general, no es recomendable añadir ninguno de estos componentes en exceso, ya que esto podría reducir la especificidad del PCR.

La concentración de iones de magnesio es un factor crítico, pues una cantidad insuficiente puede inactivar la polimerasa y el exceso puede reducir su fidelidad (Eckert y Kunkel, 1990; 1991). Los componentes de la reacción incluyendo el DNA molde, proteínas y agentes quelantes contenidos en la muestra (ej. EDTA), pueden reducir la cantidad de magnesio libre, que también se ve influida por la composición de los *primers* y la concentración de dNTP's que tienden a unirse al magnesio (Taylor, 1991). Por estas razones, es importante determinar empíricamente la concentración óptima de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  para cada sistema, por lo que algunos tampones comerciales no contienen este componente sino que vienen acompañados de una solución de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  25 mM, para que se pueda añadir la concentración final adecuada, que suele ser de entre 1 y 3 mM.



---

## Perfil de los ciclos

La temperatura y duración de los tres pasos de un ciclo de PCR, deben ser optimizados empíricamente, buscando la mayor eficiencia y la menor duración de todo el proceso. En general es recomendable que los tiempos de incubación de cada ciclo se minimicen en la medida de lo posible (Taylor, 1991).

Desnaturalización. La separación de las dos cadenas del DNA que servirá de plantilla, se consigue mediante la ruptura de los puentes de hidrógeno que las une, elevando la temperatura a 90-95° C durante 30 segundos o un minuto, aunque algunos autores recomiendan realizar un paso inicial único de desnaturalización de entre 5 y 10 minutos, para obtener una desnaturalización completa en el primer ciclo.

Hibridación. El tiempo para la hibridación de los *primers* suele estar entre 30 segundos y 2 minutos. La temperatura específica de hibridación, también llamada temperatura de *annealing* (templado), de cada *primer* depende del número y composición de sus bases. Es recomendable que se construyan los oligos de forma que sus temperaturas de hibridación estén en un rango de entre 40 y 60° C. La temperatura en este paso también es un factor crítico, ya que cada oligonucleótido presenta una temperatura de hibridación óptima. Si durante este paso, se supera esta temperatura, es probable que los *primers* no se hibriden al DNA plantilla y no se obtenga producto alguno. Si por el contrario, la temperatura se mantiene muy por debajo del óptimo, la hibridación podría presentarse de forma inespecífica. Así, mientras más cerca se mantenga la temperatura del óptimo de hibridación de los dos cebadores, obtendremos una mayor especificidad. Es importante, que cuando se diseñen los *primers* se busque que sus temperaturas de hibridación sean similares.

Extensión. Durante este paso, la temperatura debe ser idónea para el funcionamiento de la polimerasa. El fragmento Klenow de la DNA polimerasa I actúa a temperaturas de entre 25 y 37°C (Mullis y Fallona, 1987), pero las polimerasas termoestables utilizadas actualmente funcionan alrededor de los 70°C. Esto tiene la ventaja de que a esta temperatura las hibridaciones inestables de los *primers*, pueden ser desnaturalizadas. El tiempo necesario para la reacción de extensión, está en relación con el tamaño del fragmento a amplificar. De acuerdo con Taylor (1991), dos minutos por kilobase son más que suficientes. Algunos autores recomiendan también realizar un paso final de 5 a 10 minutos de extensión, con el fin de dar tiempo a que la polimerasa termine todos los fragmentos que haya empezado y que no haya podido terminar en el ciclo correspondiente.

---

## Diseño de los cebadores

Para diseñar *primers* cuya temperatura de hibridación esté entre 40 y 60°C, es necesario “jugar” con el número y composición de sus bases, lo que se consigue buscando zonas adecuadas en el DNA plantilla. Es bueno evitar zonas repetitivas o de alta variabilidad. El tamaño suele estar entre 15 y 30 pb y el contenido óptimo de Gs y Cs esta entre 40 y 60%. Es importante que los oligos presenten entre ellos un contenido similar de Gs y Cs y que no contengan estructuras secundarias (Taylor, 1991), ni corrimiento de bases (repetición consecutiva de una misma base). También es muy importante que la complementariedad entre ellos sea mínima, ya que de lo contrario, tendrán una mayor tendencia a hibridarse entre sí que con el DNA objetivo, favoreciendo la formación de *primer-dimers*. Algunos autores han investigado el efecto que puede tener en la eficiencia del PCR el tipo de bases que tengan los oligos en sus extremos 3', no obstante no parece haber un criterio unificado debido a que las condiciones de cada reacción, como la concentración de dNTP's, pueden influir en la eficiencia, haciendo difícil la comparación de los resultados obtenidos por diferentes investigadores (Kwok et al. 1990).

Existen varios programas informáticos concebidos para buscar zonas adecuadas para el *annealing*, útiles en la selección de las secuencias para los cebadores. Estos programas también analizan las posibilidades que tienen los oligos de hibridarse entre sí y la diferencia entre su composición de bases y sus temperaturas de *annealing*. Algunos suelen incluir manuales sumamente completos en los que se detallan las consideraciones teóricas relacionadas con un buen diseño de *primers*, como el Primer Premier 4 y el PrimerDesing 1.12b. Utilizar un programa es bastante recomendable, pues buscar visualmente dos secuencias adecuadas que cumplan todos los requisitos puede ser una labor que consuma una gran cantidad de tiempo. Como nota precautoria, vale la pena mencionar que cada programa se basa en criterios particulares tanto para el diseño de los cebadores como para el cálculo de la temperatura de hibridación, por lo que no es de extrañar que dos programas diferentes den como resultado distintos oligonucleótidos al analizar el mismo segmento de DNA, o incluso que cada programa calcule una temperatura de hibridación diferente para el mismo oligo.

## Estrategias para una mayor especificidad

---

Además de optimizar los componentes y el perfil de los ciclos, diversos autores han diseñado estrategias para aumentar la especificidad de la reacción, pues en algunos casos a pesar de todos los esfuerzos, siguen ocurriendo amplificaciones inespecíficas. A continuación se exponen algunas de estas estrategias.

### Nested PCR

Esta fue la primera estrategia para mejorar la especificidad del PCR (Mullis y Faloona, 1987) y consiste en realizar una segunda reacción de PCR utilizando *primers* que amplifiquen un fragmento interno del amplificado en la primera reacción. Este método, fue utilizado originalmente para superar los problemas relacionados con la relativamente baja especificidad del PCR cuando se usa la DNA polimerasa de *E. coli* y su uso ha decrecido con la introducción de la *Taq* (Gibbs, 1990). Actualmente se utiliza para la amplificación de secuencias raras, o para aplicaciones del PCR en la que se requiera de una reacción inicial de condiciones poco estrictas que permitan, por ejemplo, la amplificación múltiple de secuencias relacionadas; como los miembros de una familia de genes o fragmentos que codifiquen para proteínas que tengan una relación funcional (Gibbs, 1990).

### Hot start PCR

La técnica de “Hot Start” o inicio caliente, se realiza con el fin de evitar la polimerización de las hibridaciones inespecíficas de los *primers* con el DNA plantilla o con ellos mismos. El procedimiento consiste en evitar que la polimerasa tenga actividad antes de que todo el DNA que exista en la muestra esté desnaturalizado. A pesar de tener una temperatura óptima, todas las DNA polimerasas son capaces de conducir la síntesis del DNA en un rango más o menos amplio de temperatura, por lo que estando todos los componentes presentes, la reacción de extensión puede llevarse a cabo incluso a temperatura ambiente; cuando la formación de híbridos inespecíficos es más que probable.

Inicialmente, algunos autores describieron el procedimiento sin establecer su finalidad y lo realizaban manualmente, poniendo todos los componentes necesarios para el PCR excepto la *Taq*, que se agregaba una vez que los tubos hubiesen alcanzado la temperatura de extensión (72° C), es decir, en el paso final del primer ciclo (Frohman et

---

al. 1988; Ward et al. 1989). Newton y col. (1989) agregaban el enzima después de los primeros 5' de desnaturalización y en su artículo expresaron su intuición de que el Hot Start evitaría la amplificación de productos inespecíficos.

Posteriormente, investigadores de la corporación Cetus corroboraron esta intuición y buscaron un método con el que no fuese necesario abrir los tubos una vez alcanzada la temperatura de desnaturalización, pues además de incrementar el riesgo de contaminación, puede haber variaciones de la temperatura una vez que se retiran los tubos de la fuente de calor, haciendo que no se pueda controlar de manera precisa lo que ocurre en tubos diferentes. Así, Chou y col. (1992) informaron de la disponibilidad de una parafina especial (AmpliWax), que puede separar algún componente esencial de la reacción, hasta que la temperatura la funde permitiendo que por convección se mezcle con los demás componentes.

Después, la casa Perkin-Elmer Applied Biosystems introdujo la AmpliTaq Gold, una polimerasa que no se activa sino hasta después de 10 minutos a 94° C, con lo que se alcanza el objetivo del Hot Start (Moretti, et al. 1998). La polimerasa viene unida a una proteína (un anticuerpo) que le impide llevar a cabo la polimerización, pero a temperaturas elevadas esta unión se rompe dejando libre la polimerasa para su función. Actualmente, algunas casas comerciales ofrecen anticuerpos que presentan estas características, con lo que es posible convertir la polimerasa “de siempre” en una polimerasa de Hot Start.

### Touch down PCR

Esta estrategia fue diseñada para la optimización de la temperatura de hibridación de los cebadores y consiste en empezar el primer ciclo con una temperatura de *annealing* muy alta, por ejemplo 70° C, e ir disminuyéndola uno o medio grado en cada ciclo, hasta alcanzar una temperatura moderada, para después continuar los demás ciclos con esta temperatura. Así, durante los primeros ciclos, que son los más críticos, se tendrá la máxima especificidad y después cuando ya exista un número suficiente de fragmentos específicos, se reduce la temperatura aumentando la eficiencia de los *primers* en la hibridación. Además se tiene la ventaja de que es posible utilizar el mismo perfil para diferentes parejas de *primers*. El nombre de este método viene por analogía con el campo de fútbol o rugby americano, en el que la numeración de las yardas va disminuyendo desde el medio del campo hasta la línea de meta, en donde se anota un “touch down” que es el equivalente al ensayo del rugby europeo.

---

## Otras aplicaciones y estrategias del PCR

Actualmente existe una multitud de estrategias que permiten ampliar las aplicaciones del PCR. Así por ejemplo, con la PCR mutagénica, es posible introducir mutaciones en una secuencia para observar su efecto en la expresión del gen. Con técnicas como Vector PCR, Linker PCR o Anchor PCR, es posible amplificar segmentos de los que no se conozca la secuencia de uno de los extremos. La estrategia Multiplex PCR consiste en la amplificación de varios segmentos en una misma reacción y es la base de métodos como la PCR cuantitativa y el diagnóstico fiable de enfermedades y determinación del sexo. Los detalles de éstas y otras técnicas se pueden consultar en libros como “PCR Protocols. A guide to methods and applications” (Innis et al. 1990), “PCR. A practical approach” (McPherson et al. 1991) y en artículos de revisión como el de R. Gibbs (1990). Aunque a cada momento se publican nuevas aplicaciones o nuevas estrategias.

## Contaminación cruzada (*carryover*) y su prevención

Uno de los problemas más graves del PCR es que la contaminación con DNA exógeno puede resultar en la obtención de falsos positivos, especialmente si la muestra original contiene muy pocas moléculas como en el caso del DNA antiguo. Como se ha expuesto en otra sección, el DNA contaminante puede provenir de las células de organismos de la misma especie o de especies relacionadas introducidas durante diferentes etapas del análisis. Sin embargo, el problema de la contaminación se complica cuando se amplifica el DNA mediante PCR, por el hecho de que el PCR es capaz de producir un número muy grande de copias del mismo fragmento, que tienen el potencial de contaminar los reactivos tanto de las extracciones como de las amplificaciones subsecuentes.

A este traslado de productos de PCR, también llamados amplicones, se le denomina contaminación cruzada o “*carryover*” para diferenciarla de la contaminación con DNA proveniente de una fuente natural (Kwok y Higuchi, 1989). Para ilustrar el potencial de contaminación que tienen los amplicones, Kwok y Higuchi (1989) han hecho notar que una reacción de PCR puede generar  $10^{12}$  copias de un fragmento de DNA en 100  $\mu$ l y si fuese posible diluirlos uniformemente en una piscina olímpica, una alícuota de 100  $\mu$ l de líquido de la piscina contendría 400 moléculas amplificables. Más

---

aún, la décima parte de un microlitro de una reacción, transportada en una punta de pipeta, podría contener  $10^9$  copias de la secuencia amplificada, en tanto que un microgramo de DNA humano contiene solamente  $1.4 \times 10^5$  copias de un gen de una sola copia (Kwok y Higuchi, 1989). Así mismo, un picolitro ( $10^{-6}$   $\mu$ l) podría contener 10,000 moléculas (Walder et al. 1993).

Para controlar este tipo de contaminación, es necesario evitar la transferencia de DNA entre las muestras y entre el control positivo y negativo, por lo que es de vital importancia tener extremo cuidado en la manipulación de las muestras amplificadas. La transferencia de los amplicones contaminantes de un sitio a otro puede darse también a través de la piel, el pelo y la ropa de los investigadores (Kitchin et al. 1990; Rys y Persing, 1993). Las condiciones recomendadas para el manejo de las muestras son similares a las que usan los microbiólogos para el manejo y cultivo de microorganismos (Kwok y Higuchi, 1989; Cimino et al. 1990b) o incluso más extremas (Kitchin et al. 1990), e incluyen:

- Separación física de las áreas de preparación de PCR y de las áreas donde se almacenan y manipulan los productos, incluyendo la separación de material, equipo y batas.
- Autoclavado de las soluciones y de los tubos. Esto es útil hasta cierto punto, pues fragmentos pequeños de DNA pueden permanecer intactos, sobre todo si se utiliza una temperatura baja.
- Alicuotar los reactivos, lo que reduce el riesgo de contaminar las soluciones “stock” y permite eliminar poco material si existe contaminación.
- Utilizar guantes, cambiándolos frecuentemente, pues podrían facilitar el transporte de amplicones. Evitar exponer otras superficies de la piel cuando se prepara una reacción, utilizando batas y mascarillas quirúrgicas o caretas de plástico transparente.
- Evitar las salpicaduras al abrir los tubos, ya que pueden escapar aerosoles cargados con una gran cantidad de copias.
- Usar pipetas de desplazamiento positivo o puntas con filtro capaces de retener aerosoles.
- Premezclar los reactivos para minimizar el número de veces que se requiere abrir los tubos y el número de veces que se introducen las pipetas en los reactivos. Esto tiene además, la ventaja de que se reduce el error de pipeteo que se presenta con cantidades inferiores a 1  $\mu$ l.
- El DNA que se quiere amplificar debe añadirse al final, después de que se han puesto en el tubo todos los reactivos.

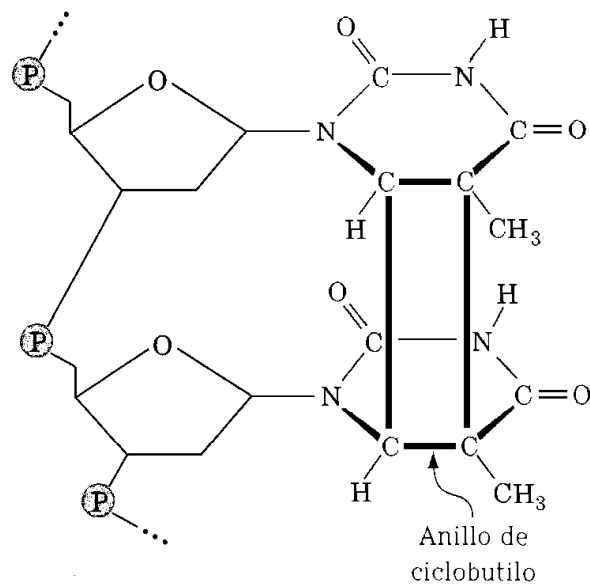
- 
- Escoger adecuadamente los controles positivos y negativos. El DNA para el control positivo no debe estar muy concentrado. Si se procesan muchas muestras, es recomendable incluir más de un control negativo.

También, debe tenerse precaución con los equipos que se utilizan para el análisis de los amplicones. Las cubetas de electroforesis, las superficies de los transiluminadores, las centrifugas o los baños, pueden representar una fuente muy importante de contaminación y la mayoría de estos objetos pueden limpiarse si es necesario con HCl 1 M (Kwok y Higuchi, 1989), aunque lo más importante es ser consciente de su potencial contaminante.

Además, algunos autores (Rys y Persing, 1993; Espy et al. 1993) recomiendan el uso de por lo menos un sistema de esterilización como los que se describen a continuación.

#### Luz UV

Ha sido uno de los primeros métodos utilizados para controlar la contaminación (Sarkar y Sommer, 1990a) y consiste en la irradiación con luz ultravioleta de los reactivos antes de realizar un PCR, con el fin de inactivar los amplicones que puedan contener. Este método tiene la ventaja de que elimina también el DNA contaminante que proviene de fuentes naturales. La radiación UV (200-300 nm) induce la formación de un anillo de ciclobutilo entre Timinas adyacentes en la misma hebra de DNA, formando un dímero de Timina intracatenario (Fig.MT-12). De la misma forma, se producen dímeros de Citosina y de Timina-Citosina, parecidos a los de Timina, aunque con una menor frecuencia. Tales dímeros de pirimidina distorsionan localmente la estructura de bases del DNA, evitando que sea útil como molde para la replicación (Voet y Voet, 1992, p. 1039).



**Figura MT-12** Dímero de ciclobutiltimina, que se forma tras la irradiación con UV, entre dos residuos de timina adyacentes en una misma hebra de DNA. Los enlaces del anillo de ciclobutilo distorsionan localmente la estructura de bases apareadas impidiendo la replicación. Tomado de Voet y Voet, 1992.

Aunque originalmente se utilizó este método con fragmentos de alrededor de 700 pb obteniendo buenos resultados (Sarkar y Sommer, 1990a), algunos autores observaron una menor eficiencia con fragmentos pequeños (~250 pb), atribuyéndolo a la menor probabilidad que tienen de ser afectados por la irradiación (Cimino et al. 1990a). No obstante, Ou y col. (1991) han demostrado que es más importante la longitud de onda de la luz UV utilizada, la distancia de la muestra de la fuente de luz y el tiempo de exposición. La contaminación con un fragmento de 110pb fue completamente eliminada exponiendo la solución de 5 a 10 minutos a una distancia de 2.5 cm de una fuente de luz de 254nm. Similares resultados fueron obtenidos por Fox y colaboradores (1991), quienes al igual que Ou y col. observaron que con la exposición adecuada, se puede reducir la contaminación 1000 veces.

De cualquier manera, el tamaño y la secuencia pueden influir en el resultado de este método y de otros procedimientos de esterilización (Espy et al. 1993), por lo que el tiempo de exposición necesario para cada tipo de amplicón, debe ser determinado empíricamente (Fox et al. 1991), teniendo en cuenta además que una exposición prolongada puede dañar los *primers*, sobre todo si contienen Timinas adyacentes, a pesar de ser de un tamaño reducido (Ou et al. 1991). Por estos motivos, el tiempo de exposición a la luz UV debe considerarse crítico. En general es recomendable la amplificación de fragmentos de más de



---

240 pb (Espy et al. 1993), aunque en DNA antiguo es más difícil obtener fragmentos de este tamaño (Pag. 53 y 83).

Por otra parte, este método tiene el inconveniente de que no es posible esterilizar todos los componentes de la mezcla de reacción. A diferencia de los dNTP's, la *Taq* DNA polimerasa es bastante sensible a la luz UV (Ou et al. 1991) y por razones obvias, la muestra de DNA molde tampoco puede ser irradiada. Estas limitaciones han hecho que algunos investigadores consideren que la utilización de UV no es un buen método para el control de la contaminación por *carryover*, pues si en la muestra de DNA que se quiere amplificar existe contaminación por amplicones, no será posible eliminarla.

En este sentido, Cimino y col. (1990b) han propuesto que un buen método debe permitir la destrucción de los amplicones de forma selectiva, mediante algún mecanismo que permita su eliminación después de cada PCR. A este tipo de procedimiento le han denominado, esterilización post-PCR. En concreto, proponen la utilización de sustancias derivadas de isopsoralen, que pueden ser activadas con luz UV y que resisten las temperaturas del PCR. El procedimiento consiste en agregar estas sustancias a la mezcla antes de la reacción y una vez concluida, activarlas con luz UV para que produzcan daños en los amplicones que impidan su replicación posterior.

Los daños que causan estas sustancias no alteran el análisis de los productos mediante hibridación con sondas específicas, ni la determinación de su tamaño mediante geles de electroforesis (Cimino et al. 1990b), no obstante, es muy probable que impidan la secuenciación y no se sabe que efectos podrían tener en el funcionamiento de las enzimas de restricción. Además, pueden requerir de otras sustancias para contrarrestar el efecto negativo que pueden presentar en la eficiencia del PCR (Rys y Persing, 1993). Por otra parte, este tipo de sustancias fotosensibilizadoras podrían ser de utilidad en el tratamiento con luz UV del material y equipo, ya que de acuerdo con Sarkar y Sommer (1990b), la inactivación con luz UV es mucho menos eficiente para eliminar el DNA en superficies secas.

#### dUTP y Uracil N-glicosilasa

Uno de los métodos más elegantes para la eliminación selectiva de los amplicones, consiste en la utilización rutinaria de dUTPs en lugar de dTTPs para la síntesis del DNA durante el PCR, de tal forma que todos los amplicones así producidos puedan ser eliminados de la mezcla de reacciones de amplificación sucesivas

---

incubándola con Uracil N-glicosilasa (UNG). El DNA que contiene Uracilo (U-DNA) es degradado por la UNG, pero no el DNA normal, por lo que los *primers* y el DNA de la muestra pueden resistir el tratamiento (Longo et al. 1990).

Con este método es posible reducir la contaminación al menos  $3 \times 10^9$  veces (Rys y Persing, 1993), aunque no está exento de inconvenientes. La incubación con UNG debe hacerse justo antes de empezar los ciclos y para inactivar el enzima es necesario extender hasta 15 minutos el primer paso de desnaturalización a 94°C, lo que puede tener un efecto negativo en la actividad de la polimerasa (Glenn y Braun, 1992). La UNG puede presentar cierta actividad residual después del PCR, haciendo necesario mantener los tubos a 72° C al final de los ciclos (Glenn y Braun, 1992) y/o pasarlos rápidamente a 4° C (Rys y Persing, 1993). No es posible utilizar las cepas bacterianas estándar para la clonación, pues contienen enzimas que degradan el U-DNA y por otra parte, el análisis de fragmentos de sitios de restricción puede ser menos informativo, ya que algunas enzimas de restricción no funcionan con U-DNA (Glenn y Braun, 1992). El procedimiento es costoso, pues además de requerir dUTPs, necesita la UNG, que puede ser un poco más cara que la polimerasa (Glenn y Braun, 1992; Rys y Persing, 1993).

En el DNA antiguo puede haber sitios con Uracilo producidos por la desaminación de la Citosina y aunque los estudios de S. Pääbo (1989) indican que este tipo de daño se produce de forma limitada, vale la pena tener en cuenta que si se utiliza la UNG para el control de la contaminación en DNA antiguo, existe la posibilidad de perder información. Es necesario investigar este tema con más profundidad. Cabe resaltar que los amplicones producidos con anterioridad al uso rutinario de dUTPs, no podrán ser eliminados y al igual que con otros métodos selectivos, tampoco es posible eliminar el DNA proveniente de fuentes naturales.

Por otra parte, la eficiencia de este procedimiento puede variar según la longitud y la composición de la secuencia del amplicón, siendo más susceptibles los fragmentos mayores de 150 pb y los que tienen un bajo contenido de Gs y Cs (Espy et al. 1993).

### Residuos de ribosa en el extremo 3'

Este método también permite la eliminación selectiva de los amplicones. Descrito por Walder y col. (1993), consiste en la utilización de cebadores modificados con un residuo de ribosa en el extremo 3', para producir fragmentos con un puente ribonucleotídico interno sensible al tratamiento con RNasa o con NaOH. Los *primers* terminados con cualquiera de los cuatro residuos de ribosa funcionan de igual manera

---

que los *primers* compuestos completamente por DNA y la polimerasa puede extenderlos y copiarlos eficientemente. Cómo esta modificación no influye en la temperatura de hibridación, no es necesario modificar los protocolos si anteriormente se utilizaban *primers* normales. Es un método que permite tanto la esterilización pre-PCR, como la post-PCR.

Para la esterilización pre-PCR se utiliza RNasa A, siendo necesario por tanto, que los *primers* terminen en C o U y que los amplicones sean desnaturalizados elevando la temperatura. La RNasa A es bastante estable a altas temperaturas y podría destruir los nuevos productos de la reacción. Para evitar esto se debe incluir  $\beta$ -mercaptoetanol en la mezcla antes de iniciar los ciclos, ya que esta substancia inactiva la RNasa de manera irreversible pero no altera el funcionamiento de la *Taq*. El tratamiento con RNasa puede realizarse sobre la muestra con todos los componentes, pues no destruye los *primers* ni el DNA que se quiere amplificar. Con este tratamiento se consigue reducir la contaminación  $10^4$  veces, aunque tiene el inconveniente de que es necesario abrir los tubos después de la esterilización para añadir el  $\beta$ -mercaptoetanol.

Para la esterilización post-PCR se incuba la muestra con NaOH y es posible reducir la contaminación de  $10^4$  a  $10^9$  veces (Rys y Persing, 1993; Walder et al. 1993), aunque tiene los inconvenientes de que requiere la apertura de los tubos una vez concluido el PCR para agregar el NaOH, con lo que se pueden liberar amplicones y de que los fragmentos resultantes son más cortos, por lo que se requerirían *primers* internos para su secuenciación.

### **PCR y DNA antiguo**

A pesar de que la fragmentación y el daño molecular que presenta el DNA antiguo dificulten el control del *carryover* debido a que sólo permiten la amplificación de fragmentos muy cortos, el PCR es una herramienta imprescindible para el análisis del aDNA, ya que permite superar los problemas que conlleva trabajar con un DNA escaso y dañado. De acuerdo con Pääbo y colaboradores (1989), en el DNA antiguo las moléculas intactas son amplificadas preferentemente en relación a las moléculas dañadas, pues estas últimas no son replicadas si presentan enlaces cruzados o son reproducidas más lentamente si contienen sitios sin base que reduzcan la velocidad de la polimerasa durante los críticos primeros ciclos.

---

De cualquier modo, algunas moléculas con lesiones menores, como la desaminación de bases, que pueden provocar errores en el proceso de copiado, también serán amplificadas. Los errores así producidos, además de los que genere la *Taq* de manera natural, estarán contenidos en algunas de las moléculas del producto final. Sin embargo, dado que estos errores se producen en sitios al azar, cada molécula original y las que descendan de ella, presentarán errores en sitios diferenciados, por lo que su contribución a la secuencia obtenida a partir de todo el conjunto no será apreciable. Estos errores sólo pueden ser detectados mediante la clonación de moléculas individuales del producto del PCR (Pääbo et al. 1989).

No obstante, cuando el número de secuencias originales intactas es muy reducido o nulo, el PCR puede dar como resultado secuencias ambiguas y/o artefactos (Pääbo et al. 1990), que pueden deberse tanto a la presencia de secuencias contaminantes como a un fenómeno conocido como PCR saltarina (Jumping PCR). En estos casos es imprescindible la clonación del producto para determinar el origen de las diversas secuencias (Handt et al 1996). Por otra parte, el Jumping PCR y otras estrategias pueden ser utilizadas en la reconstrucción de secuencias de DNA antiguo. De igual forma, algunos métodos de PCR permiten cuantificar el DNA de la muestra, ya sea globalmente o de manera específica en relación al número de moléculas endógenas intactas que existen inicialmente en una muestra. En esta sección se describen algunos de estos métodos.

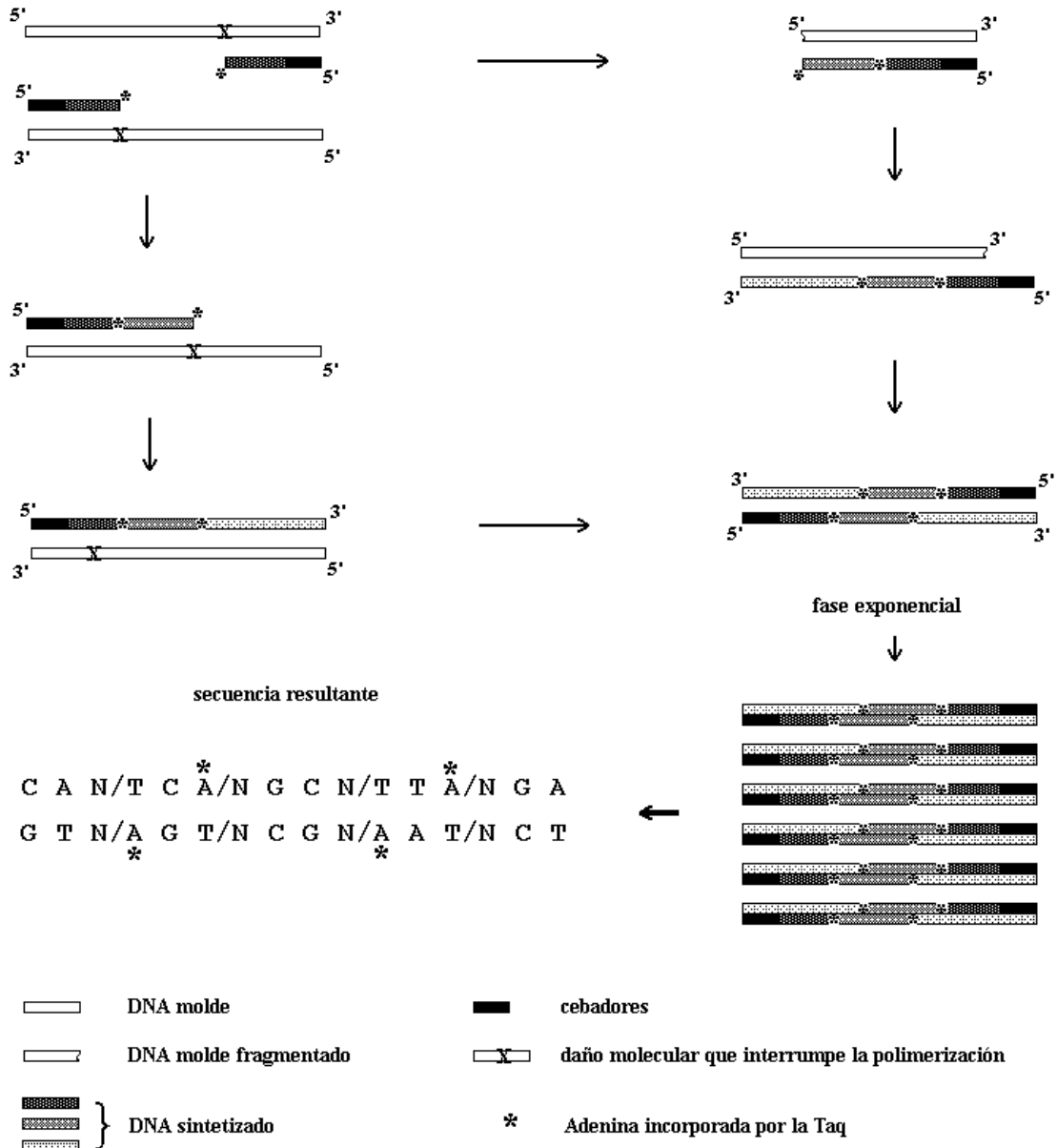
### Jumping PCR

Cuando las moléculas de DNA que contienen la secuencia objetivo están fragmentadas o presentan daños capaces de bloquear la polimerización, como en el DNA antiguo, existe la posibilidad de que el PCR lleve a cabo una recombinación mediante la unión de copias de segmentos diferentes a través de un proceso conocido como Jumping PCR.

Este proceso se inicia cuando la polimerización se detiene prematuramente en los sitios donde haya ocurrido la ruptura de la cadena o en los sitios dañados, produciendo copias incompletas que posteriormente pueden hibridarse con otros segmentos de la secuencia objetivo, para ser extendidos hasta otro sitio dañado aumentando su tamaño (Fig.MT-13). Cuando la sucesión de este proceso durante algunos ciclos genera secuencias mosaico que alcanzan el tamaño comprendido entre los dos *primers*, se inicia

la fase exponencial de la reacción (Pääbo et al. 1989; Pääbo et al. 1990; Handt et al. 1994b).

La reconstrucción de secuencias mediante Jumping PCR puede ser útil si se amplifican genomas haploides o mtDNA, ya que son homogéneos. Sin embargo, cuando existen moléculas contaminantes o cuando se analizan genomas diploides o poliploides, el Jumping PCR puede generar secuencias erróneas a través de esta recombinación *in vitro* (Pääbo et al. 1989; Handt et al. 1994b).



**Figura MT-13** Fenómeno del “Jumping PCR” inducido por daño molecular y/o fragmentación. La ‘N’ en la secuencia representa el nucleótido que contiene el fragmento original en esa posición. Cada Adenina ilegítima (y su complementario Timina) indica el sitio donde se produjo el daño o la ruptura de la cadena (ver texto).

---

Por otra parte, debido a que la *Taq* agrega una Adenina cuando termina la síntesis de un fragmento, el Jumping PCR puede ser usado también para evaluar la cantidad, frecuencia y localización de las lesiones en una muestra de DNA antiguo, ya que es posible detectar los sitios donde fue interrumpida la síntesis al observar en ellos Adeninas o Timinas ilegítimas (Fig.MT-13). Si la cantidad de moléculas dañadas es menor que la cantidad de moléculas intactas, estos cambios no serán detectados mediante secuenciación directa, pero si pueden ser observados comparando esta secuencia con las obtenidas a partir de la secuenciación de múltiples clones. No obstante, si la cantidad de moléculas dañadas es muy superior a las moléculas intactas, la secuenciación directa mostrará estos artefactos (Pääbo et al. 1990). También se ha propuesto que la observación del fenómeno de Jumping PCR en una muestra, puede ser un criterio más de autenticidad, pues indicaría que el DNA es de origen antiguo (Handt et al. 1994b).

### Pre-PCR

Para aprovechar el efecto que puede tener el Jumping PCR en la reconstrucción de secuencias de DNA antiguo, Francalacci y Warburton (1992) diseñaron un método basado en una reacción de preamplificación (pre-PCR) en la que se incluyen todos los componentes del PCR excepto los dos *primers*. Durante esta reacción, algunos fragmentos existentes en la muestra pueden hibridarse con secuencias complementarias iniciando la extensión, produciendo fragmentos más largos después de separarse y volverse a unir a otros fragmentos en cada ciclo.

Para llevar a cabo esta reacción, se realizan 5 ciclos utilizando una temperatura alta de *annealing* (60°C) para evitar hibridaciones inespecíficas. Francalacci y Warburton observaron que si después de este procedimiento, se lleva a cabo un PCR normal (incluyendo los *primers*), se obtiene una mayor eficiencia en comparación con las muestras no tratadas. Además, al analizar una muestra amplificada con este método, de DNA bovino (Bos taurus) contaminada con DNA humano, no detectaron mediante secuenciación directa la formación de quimeras bovino-humano ni la presencia de Adeninas/Timinas atribuibles a la incorporación ilegítima por parte de la *Taq*. No obstante, es de esperar que con este método ocurra lo mismo que con el Jumping PCR, en el que cobra mayor relevancia la formación de quimeras y errores de la *Taq* en presencia de pocas moléculas endógenas intactas. Otro inconveniente del método, es que requiere

---

la apertura de los tubos después del pre-PCR con el fin de añadir los *primers* y una nueva cantidad de enzima, lo que representa un riesgo de contaminación.

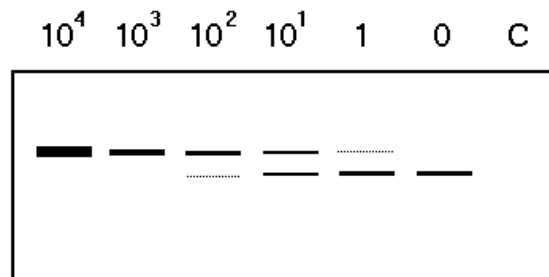
### PCR cuantitativa

Algunos autores han utilizado el potencial del PCR para intentar resolver el problema que supone la cuantificación del DNA antiguo (Pag. 59). Utilizando una serie de *primers* hexanuclótidos con secuencias diferentes compuestas al azar, es posible copiar todo el DNA existente en una muestra y si los nucleótidos incorporados están marcados radioactivamente o con fluorescencia, también es posible estimar cuántas copias de DNA se han producido. El producto de esta reacción es comparado con el que resulta de reacciones similares utilizando concentraciones de DNA conocidas para determinar el número de moléculas iniciales en la muestra, si se asume que existe una relación entre la cantidad de producto marcado y la concentración inicial y que la reacción está estandarizada en el sentido de que el resultado es consistente permitiendo la comparación de muestras diferentes. Con éste método, Per Persson (1992) estimó que con su protocolo de extracción de DNA de hueso, obtenía 200 ng por gramo de tejido. No obstante, esta aproximación tiene el inconveniente de que cuantifica todo el DNA de la muestra de manera inespecífica, por lo que no es posible determinar que porción pertenece al individuo estudiado. Otro inconveniente, es que en el DNA antiguo existen inhibidores y otros factores que pueden conducir a una estimación errónea, pues el resultado no será comparable al obtenido con DNA moderno.

Otra aproximación que supera algunos de estos inconvenientes está basada en el concepto de PCR competitiva, en la que se utilizan estándares internos que quedan sujetos a las mismas condiciones de inhibición y de composición de reactivos que la muestra a cuantificar. En dicha muestra se introduce, a manera de control, un número conocido de moléculas de un segmento específico de DNA de tamaño diferente al DNA objetivo, para realizar una amplificación en la que compiten los dos moldes. La cuantificación se lleva a cabo amplificando una serie de muestras que contengan diferentes cantidades del DNA control, también llamado testigo o *reporter*, evaluando el resultado mediante electroforesis. En las muestras en las que existan más copias del DNA testigo, la banda correspondiente será más intensa, en tanto que la banda del DNA objetivo será menos intensa o inexistente. Por el contrario si el DNA objetivo está presente en un número mayor de copias, se observará el resultado inverso. De esta forma, las muestras que contengan el mismo número de moléculas iniciales de los dos segmentos de DNA, darán como resultado dos bandas de la misma intensidad y dado que se conoce la cantidad de moléculas iniciales del DNA

---

control, la cantidad de moléculas originales del DNA objetivo puede ser deducida (Fig.MT-14).



**Figura MT-14** Ilustración esquemática de la PCR competitiva. La línea superior corresponde a las amplificaciones del DNA control, del que se añade un número conocido de copias en cada reacción (ver texto). En este caso se observa que existen aproximadamente 10 copias del DNA objetivo. C= control negativo. Tomado de Handt et al. 1994b.

Ahora bien, el testigo puede ser un segmento completamente distinto al DNA objetivo, requiriendo para la reacción competitiva, el uso de dos parejas diferentes de *primers* (Chelly et al. 1988). No obstante, con esta variante del método, existe la posibilidad de que el resultado se vea alterado por la diferencia en la eficiencia de la hibridación de los distintos *primers* utilizados.

Gilliland y colaboradores (1989; citado por Gibbs, 1990) superaron este problema construyendo un fragmento de DNA idéntico al DNA objetivo, con la excepción de que le insertaron un pequeño segmento para poder distinguirlo en el gel de agarosa. De este modo, se utilizan los mismos *primers* para amplificar los dos segmentos en competencia, reduciendo las variables que influyen en el resultado. Nótese que también es posible utilizar como DNA control un segmento que presente una delección de algunos pares de bases con respecto al DNA objetivo, lo que brinda un amplio margen para la construcción de fragmentos de DNA que sirvan como estándares internos (Förster, 1994).

El uso de la cuantificación competitiva para el análisis de DNA antiguo fue primero sugerida (Handt et al. 1994b) y posteriormente utilizada (Handt et al. 1996) por el grupo de S. Pääbo. También ha sido utilizada en DNA antiguo por C. Lalueza (1994), aprovechando ingeniosamente la presencia de la delección de 9 pb, que presentan determinadas poblaciones en la región codificante V del mtDNA, para obtener el DNA control.



---

Mediante la cuantificación es posible determinar si existen moléculas amplificables en una determinada muestra y algunos autores han propuesto que puede ser utilizada como criterio para excluir o detectar contaminación, ya que si se determina la existencia de pocas copias y sin embargo se obtienen amplificaciones muy intensas, el resultado sería motivo de sospecha (Handt et al. 1994b). Por otra parte, se ha estimado que si se inicia una reacción de amplificación a partir de menos de 40 copias originales, los resultados pueden ser influidos por el efecto Jumping PCR. Por lo tanto, si en una muestra se detecta un número menor de copias, los resultados deben tomarse con precaución (Handt et al. 1996). No obstante, de acuerdo con los resultados obtenidos por Kolman y Tuross (2000) la cuantificación del DNA no puede ser utilizada para detectar la contaminación de las muestras de manera fiable.

El inconveniente que puede tener la técnica de la cuantificación competitiva, aparte de los costos de la construcción del *reporter* y del riesgo de contaminación al manipular las muestras, es la presencia de daño molecular en las moléculas endógenas del DNA antiguo, que pueden disminuir la eficiencia de su amplificación en comparación con el estándar. Sin embargo, esto sólo ocasionaría una subestimación de las moléculas iniciales, por lo que las estimaciones pueden ser válidas si se consideran como mínimas.

Actualmente, la casa Perkin-Elmer comercializa un sistema en el que el testigo es una molécula fluorescente incorporada en los *primers* que es liberada durante la reacción de extensión. Mediante un sistema de detección, se mide el aumento de la concentración del *reporter* en la solución, que será proporcional al número de moléculas amplificadas. Por el momento, esta cuantificación “en tiempo real” no se ha usado en DNA antiguo, pero podría ser de gran utilidad, ya que tiene la ventaja de que no requiere la apertura de los tubos para la cuantificación y no depende de ningún estándar de comparación. El inconveniente es que los instrumentos de detección tienen un costo elevado, además de que se tendría que evaluar si la modificación de los *primers*, interfiere en la hibridación con el DNA antiguo que presenta daños y sustancias inhibitorias.