

OBTENCIÓN DE ADN ÚTIL PARA ANÁLISIS DE TIPAJE GENÉTICO A PARTIR DE RESTOS ÓSEOS HUMANOS ANTIGUOS

✉ Eileen Riego,¹ Ricardo Leonart,¹ Ma. Victoria Saínz de la Peña,² Fermín Amaro,³ Ketty Bacallao,³ Marta Santiesteban,² Felipe Rolo,⁴ Luis Herrera,¹ Madelyn Blanco⁴ y José de la Fuente¹

¹Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Apartado postal 6162, La Habana, Cuba. E-mail: orsup@cigb.edu.cu; Fax: (53 7) 21 8070 33 8008. ²Laboratorio Central de Criminalística. La Habana, Cuba. ³Instituto de Medicina Legal. La Habana, Cuba. ⁴Laboratorio de Investigaciones del SIDA, La Habana, Cuba.

ABSTRACT

Although several methods have been described to extract human DNA from bone tissues, the results are variable and sometimes the purified DNA is not suitable for polymerase chain reaction analysis. Specially for forensic applications where PCR mediated typing of short tandem repeats STR loci is imperative, the presence of inhibitors of the *T. aquaticus* DNA polymerase is often an insoluble difficulty. Here we describe methods which has been used in our laboratory for some time already to do the genetic typing of several short tandem repeats loci on genomic DNA extracted from ancient bone remains as well as the amplification and sequencing of the hypervariable region of the human mitochondrial DNA from the same specimens. The usefulness of the method was documented even with bone remains 2 000 years old. These results are important not only from the forensic point of view but also for the applications of the so called "molecular archaeology techniques" to help trace back the origins of ancient human populations.

Key words: genetic typing, bone, polymerase chain reaction, PCR, short tandem repeats, STR, mitochondrial DNA

Biotecnología Aplicada 1998;15:25-29

RESUMEN

En ocasiones resulta de vital importancia para la aplicación de técnicas forenses el tipaje del ADN a partir de muestras óseas. Con frecuencia, sin embargo, la aplicación de estas técnicas se ve fuertemente afectada por factores tales como la inhibición de actividad enzimática de la ADN polimerasa de *T. aquaticus* que queda en estas preparaciones de ADN, los bajos rendimientos, el alto grado de degradación de los ácidos nucleicos extraídos, etc. Varios autores reportan procedimientos para la purificación de ADN a partir de muestras óseas, sin embargo, los resultados son muy variables en términos de rendimiento y utilidad del material extraído como sustrato de reacciones tales como la reacción en cadena de la polimerasa. Aquí se describe un procedimiento que rinde ADN útil para el tipaje genético de fragmentos repetidos cortos en tandem y ADN mitocondrial humano a partir de restos óseos antiguos. Este método se ha usado de forma rutinaria en nuestro laboratorio para estudios forenses y de poblaciones aborígenes antiguas.

Palabras claves: tipaje genético, hueso, reacción en cadena de la polimerasa, PCR, fragmentos repetidos cortos en tandem, STR, ADN mitocondrial

Introducción

La introducción de conocimientos generados por los constantes avances de la biología molecular a ramas más tecnológicas, tales como las ciencias forenses, ha permitido grandes avances en la identificación de individuos, sus restos, etc. Técnicas tales como el llamado "DNA fingerprinting", que en español pudiera traducirse como "huellas digitales genéticas", son una muestra de ello.

Más recientemente, la implementación del análisis de los fragmentos cortos repetidos (short tandem repeated polymorphisms, STR) a partir de ADN genómico, ha permitido un salto cualitativo en estas técnicas (1-3). Con la aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha logrado trabajar

con cantidades ínfimas de muestra y obtener los resultados más rápidamente. Otra técnica que recientemente se ha comenzado a usar y ha mostrado gran versatilidad para el tipaje genético, es el análisis de los polimorfismos (también mediante el uso del PCR) de la región de control del ADN mitocondrial humano (4-6).

Si bien la aplicación de estas nuevas metodologías es relativamente sencilla para examinar muestras biológicas frescas, su uso en especímenes antiguos (por ejemplo, huesos provenientes de enterramientos) se hace más difícil debido, entre otras causas, a la poca cantidad de ADN amplificable que queda en estos, su estado de degradación y a la presencia de

1. Robertson JM, Sgueglia JB, Badger CA, Juston AC, Ballantyne J. Forensic applications of a rapid, sensitive, and precise multiplex analysis of the four short tandem repeat loci HUMWVF13/A, HUMTH01, HUMF13A01, and HUMFES/FPS. *Electrophoresis* 1995;16:1568-1576.

2. Gill P, Kimpton CP, Urquhart A, Oldroyd N, Millican ES, Watson SK, Downes TJ. Automated short tandem repeat (STR) analysis in forensic casework - a strategy for the future. *Electrophoresis* 1995;16:1543-1552.

compuestos que inhiben fuertemente la actividad enzimática de la ADN polimerasa de *T. aquaticus*.

En este trabajo se reporta una metodología que permite de forma reproducible la extracción de ADN a partir de restos óseos antiguos. El ADN extraído por estos procedimientos ha sido usado de forma rutinaria en nuestro laboratorio para el tipaje de STR y ADN mitocondrial para trabajos de identificación forense y estudios poblacionales de comunidades indígenas precolombinas de nuestro país.

Materiales y Métodos

Muestras

Se utilizaron muestras óseas provenientes de enterramientos en zona de selva tropical con edades entre 35 y 2 000 años, esta última fechada mediante C^{14} (7); el estado de conservación varió en dependencia del tipo de muestra. Aquellas provenientes de enterramientos por 35 años en tierra selvática mostraban buena consistencia pero variaban en cuanto a color. Los restos provenientes de enterramientos aborígenes con más de 2 000 años, por estar dentro de una cueva, presentaron en algunos casos un alto grado de calcificación y la muestra se disgregaba fácilmente al ser manipulada (muestra A en la Figura 1).

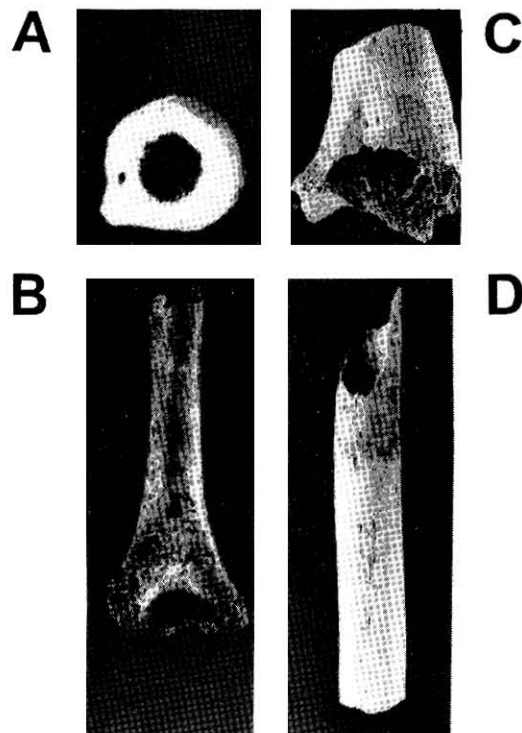


Figura 1. Fotografías de algunos de los restos óseos de enterramientos antiguos empleados para la extracción de ADN y tipaje genético. A y B, restos de aproximadamente 2 000 años de antigüedad; C y D, restos de 700 años de antigüedad.

Flujo de trabajo

Se organizó un flujo de trabajo destinado a reducir al máximo el riesgo de contaminaciones, siguiendo las principales medidas reportadas como efectivas por la literatura (8). En resumen, se separaron físicamente las áreas de trabajo pre y post-PCR, se destinó equipamiento exclusivo para cada área, se reguló el acceso de personal a estas, se hizo uso de equipos de flujo laminar para el montaje de las reacciones y la purificación del ADN, y se usó en todo momento vestuario estéril, guantes y pipetas a prueba de aerosoles. En cada extracción se incluyeron controles negativos en paralelo que contenían todos los componentes a excepción de la muestra ósea, y el PCR fue además controlado mediante reacciones sin ADN.

Extracción de ADN

Fragmentos pequeños de muestra (preferiblemente de huesos largos) fueron pulverizados en N_2 líquido. El polvo (5 g) fue descalcificado en presencia de 50 mL de 0,5 M EDTA pH 7,5; tres veces durante 12 h con agitación. Para cada cambio de solución se centrifugó la muestra durante 10 min a 1 800 x g. La muestra se lavó tres veces con agua destilada estéril. El precipitado final se resuspendió en solución tampón de extracción (Tris-HCl pH 8, 10 mM, EDTA 10 mM, NaCl 100 mM, SDS 2 %, proteinasa K 0,5 mg/mL) y se incubó con agitación ocasional durante 12 h a 56 °C. Seguidamente se añadió Proteínasa K adicional para alcanzar la concentración de 1 mg/mL y se incubó de igual forma durante otras 5 h. El material no digerido fue eliminado por centrifugación y el sobrenadante se extrajo con fenol / cloroformo / alcohol isoamílico (25:24:1) tres veces. Las trazas de fenol que quedaron tras las extracciones fueron eliminadas mediante una extracción con éter dietílico. El éter remanente se eliminó mediante calentamiento de la fase acuosa a 56 °C durante 15 min. El sobrenadante así obtenido fue concentrado y dializado usando Centricon 100 (Amicon, USA). El concentrado se lavó con tres volúmenes de agua destilada estéril. El ADN fue conservado a -20 °C.

Cuantificación de ácidos nucleicos

La cantidad de ADN total humano presente en las muestras fue estimada mediante el kit de cuantificación de ADN "Quantiblot"® (Perkin Elmer Part No. N808-0114, USA).

Tipaje de ácidos nucleicos

Análisis de STR. Alícuotas de ADN fueron usadas en reacciones de amplificación en cadena de la polimerasa (PCR) que contenían juegos de oligonucleótidos diseñados para amplificar los alelos HUMCSF1PO,

3. de Pancorbo MM, Castro A, Alonso S, Fernández-Fernández I, Barbero C, García-Orad A et al. Genetic typing with HUMTH01, HUMVWA31A and HUMFES/FPS short tandem repeat loci, D1S80 variable number tandem repeat and HLA-DQ0 of recent and from XII-XIII centuries spongy bone. *Electrophoresis* 1995; 6:1612-1616.

4. Budowle B, Adams DE, Comey CT, Merrill CR. Mitochondrial DNA: A possible genetic material suitable for forensic analysis. In: Lee HC, Gaensslen RE, editors. *Advances in Forensic Sciences. Year Book Medical Publishers, Chicago*. 1990:76-97.

5. Holland MM, Fisher DL, Mitchell LG, Rodriguez WC, Canik JJ, Merrill CR, Weedn YW. Mitochondrial DNA sequence analysis of human skeletal remains: identification of remains from the Viet Nam war. *J Forensic Sci* 1993; 38:542-553.

6. Wilson MR, DiZinno JA, Polansky D, Replogle J, Budowle B. Validation of Mitochondrial DNA sequencing for forensic casework analysis. *Int J Legal Med* 1995;108:68-74.

7. La Rosa G, Robaina R. *Infanticidio y costumbres funerarias en aborígenes de Cuba*. Multigraf, La Habana, 1994.

8. Sensabaugh GF, Blake ET. DNA analysis in biological evidence: Applications of the polymerase chain reaction. In: Saferstein R, editor. *Forensic Science Handbook III. Regents/Prentice Hall, New Jersey* 1993:416-452.

HUMTHO1, HUMTPOX, HUMF13A, HUMFES/FPS, HUMF13B, HUMHPRTB, HUMvWA, HUMLPL y amelogenina (1-3). En todos los casos las reacciones (25 μ L, volumen total) se llevaron a cabo en presencia de KCl 50 mM, Tris-HCl pH 9,0 a 25 °C 10 mM, MgCl₂ 1,5 mM, Triton® X-100 0,1 %, 0,2 mM cada dNTP, 12,5 pmol de cada oligonucleótido, y 0,5 - 10 unidades de Taq Polimerasa (Heber Biotec SA, CIGB, La Habana, Cuba). En cada caso particular se probaron diferentes cantidades de ADN en la reacción (0,1 - 2,5 ng) y se incluyó albúmina de suero bovino acetilada (170 μ g/mL, Biolabs, USA).

Se utilizó para el ciclado térmico un Minicycler™ (MJResearch, USA), empleando dos programas: Programa 3 (para los marcadores F13B, FESFPS, HPRTB, LPL, y vWA), 96 °C por 2 min, 10 ciclos de (94 °C por 1 min, 60 °C por 1 min, 70 °C por 1,5 min), y 20 ciclos de (90 °C por 1 min, 60 °C por 1 min, 70 °C por 1,5 min); Programa 5 (para los marcadores Amelogenina, CSFIPO, F13A01, TH01 y TPOX), 96 °C por 2 min, 10 ciclos de (94 °C por 1 min, 64 °C por 1 min, 70 °C por 1,5 min), y 20 ciclos de (90 °C por 1 min, 64 °C por 1 min, 70 °C por 1,5 min).

Parte del producto de PCR (2,5 μ L) fue añadido a 2,5 de solución tampón de aplicación (NaOH 10 mM, formamida 95 %, bromofenol azul 0,05 %, Xylene cyanol 0,05 %), desnaturalizado a 95 °C por 2 min, y aplicado en un gel desnaturalizante de poliacrilamida (acrilamida 6 %, urea 7 M, TBE 1X) de 27,5 cm x 21,5 cm x 0,4 mm. La corrida fue a corriente constante (25 W), para una temperatura del gel de aproximadamente 55 °C. Luego de la corrida, el gel fue teñido usando un kit de tinción con plata según las instrucciones del fabricante (Promega, USA). La asignación de alelos se realizó por comparación visual con marcadores alélicos de talla suministrados por el mismo fabricante.

Análisis de ADN mitocondrial

Se realizaron reacciones de PCR usando las mismas condiciones descritas en el acápite anterior excepto que se emplearon cuatro pares de oligonucleótidos descritos (9) para amplificar las regiones hipervariables HV1 y HVII del ADN_{mh}. Se usó el programa MITO para la amplificación: 96 °C por 2 min y 36 ciclos de (94 °C por 1 min, 60 °C por 1 min, 72 °C por 1 min). El producto de PCR fue verificado en gel de agarosa (1,2 %, TBE 1X). El producto en la talla correcta se extrajo del gel mediante adsorción a sílica (GENO-BIND™ Clontech, USA) y 1 ng de banda se usó como sustrato para un segundo PCR. Una vez concluido este, fue extraído con cloroformo y la fase acuosa sometida a precipitación durante 15 min a 0 °C luego de añadirle 1/10 vol de NaAcO 3 M y 0,6 vol isopropanol. La mezcla fue centrifugada 10 min a temperatura ambiente (12 000 rpm), y el

pellet fue secado y disuelto en 15 μ L de agua destilada estéril. Siete microlitros de este ADN se usaron para secuenciación directa de doble cadena según procedimientos descritos (Sequenase Version 2.0 DNA sequencing kit, USB, USA).

Resultados y Discusión

Para este trabajo se emplearon huesos con diferente tiempo de enterramiento en condiciones ambientales típicas del trópico, oscilando entre 35 y aproximadamente 2 000 años (Figura 1). Estas últimas muestras fueron fechadas mediante métodos radioisotópicos (7).

Varios métodos han sido descritos por la literatura para la extracción de ADN de restos óseos (10-14), aunque con frecuencia se reportan resultados variables con algunas muestras en lo que respecta a rendimiento y calidad del ADN extraído. Es notoria también la influencia del tipo de terreno y las condiciones ambientales de la zona sobre el estado de conservación de los restos y a su vez sobre el rendimiento y calidad del ADN obtenido, entendida esta última como una medida de la factibilidad de usar ese ADN como sustrato de reacciones enzimáticas tales como digestiones con enzimas de restricción, amplificación enzimática, etc. Aunque este fenómeno lo pudimos corroborar como tendencia, es importante notar que tanto el rendimiento como la "amplificabilidad" del ADN extraído fueron parámetros muy variables, incluso para restos provenientes de un mismo enterramiento. Esta falta aparente de regularidad entre las características del material óseo y la cantidad y calidad del ADN extraído se debe muy probablemente a la existencia de contaminantes y otras variables desconocidas hasta el momento y no controladas en los experimentos.

En este estudio se presenta un procedimiento que cuando se aplicó a diferentes muestras óseas permitió la obtención de ADN humano (Figura 2) apropiado para la amplificación enzimática de diferentes *loci* tanto genómicos como de ADN mitocondrial. En

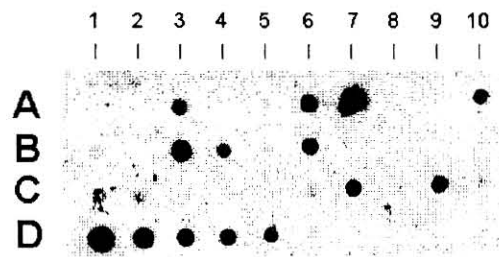


Figura 2. Resultados de la detección mediante dot blot de ADN humano en las muestras procesadas mediante el protocolo descrito. Filas A, B y C, muestras experimentales; fila D, curva patrón de cantidades conocidas de ADN humano, que incluye de izquierda a derecha: 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,312 y 0,156 ng. Las posiciones D9 y D10 corresponden a controles negativos.

9. Wilson MR, Polansky D, Butler J, DiZinno JA, Replogle J, Budowle B. Extraction, PCR amplification and sequencing of mitochondrial DNA from human hair shafts. *Biotechniques* 1995; 18: 62-669.

10. Graham DE. The isolation of high molecular weight DNA from whole organisms or large tissue masses. *Analyt Biochem* 1978;85:609-613.

11. Pääbo S, Gifford JA, Wilson AC. Mitochondrial DNA sequences from a 7 000-years-old brain. *Nucl Acid Res* 1988;16:9775-9789.

12. Hagelberg E, Clegg JB. Isolation and characterization of DNA from archaeological bone. *Proc R Soc Lond B* 1991;244 45-50.

13. Hochmeister MN, Budowle B, Borer UV, Eggmann U, Comey CT, Dirnhofer R. Typing of deoxyribonucleic acid (DNA) extracted from compact bone from human remains. *J of Forensic Sciences* 1991;36:1649-1661.

14. Corach D, Penacino G, Sala A. Cadaveric DNA extraction protocol based on cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB). *Acta Medicinæ Legalis* 1994;35-36.

nuestras condiciones, este método permitió rendimientos superiores que cuando las mismas muestras fueron extraídas con algunos de los procedimientos

reportados (13, datos no mostrados). Las cantidades de ADN humano total obtenidas oscilaron entre 0,1 y 0,8 ng por gramo de hueso. Estos resultados están dentro del rango de los rendimientos reportados por otros autores (13).

En todos los casos el ADN extraído fue susceptible de ser usado para genotipar varios *loci* genómicos (STR, Figura 3) y caracterizar los polimorfismos presentes en la región de control del ADN mitocondrial humano de los restos (Figura 4). En varias de las muestras, no obstante, se hizo necesario el uso de albúmina de suero bovino para inactivar una actividad inhibidora de la Taq polimerasa que no fue posible obviar por simple dilución del ADN (Figura 3). Esta esporádica aparición de inhibidores de la enzima en muestras provenientes de enterramientos

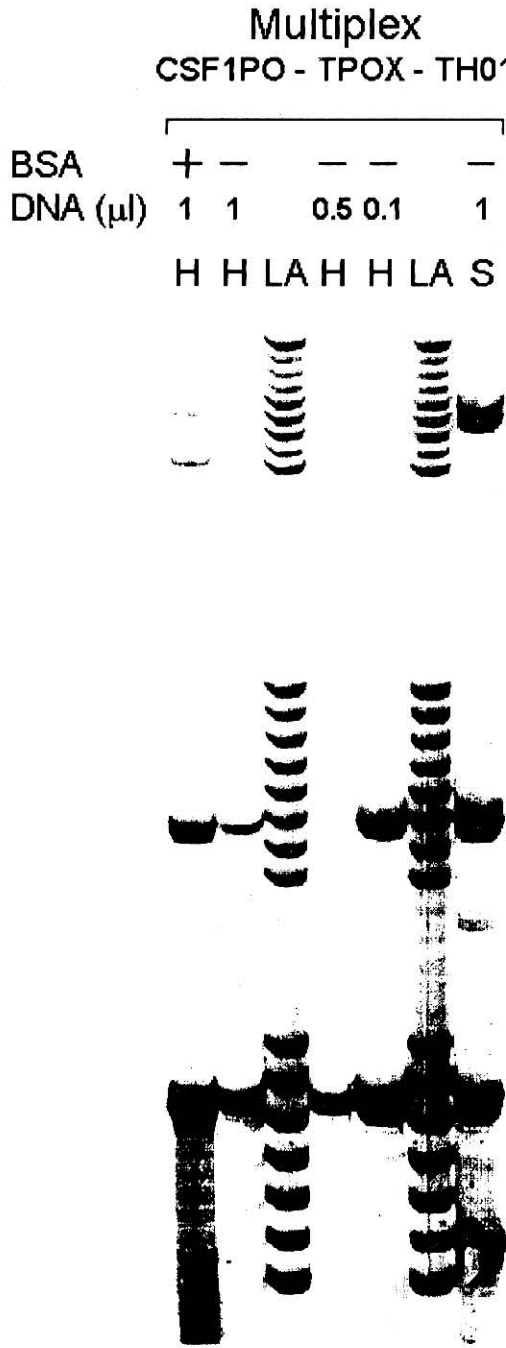


Figura 3. Resultado del genotipaje de alelos tipo STR mediante PCR usando como sustrato el ADN humano extraído por el procedimiento descrito. Efecto de la dilución del templado y la adición de BSA sobre la amplificación de los alelos. H, amplificación a partir de muestras de hueso de 35 años de antigüedad; S, amplificación a partir de muestras de sangre (control positivo); LA, marcador de peso molecular que contiene todos los posibles alelos (*ladder* alélico).



Figura 4. Autorradiograma de gel de secuencia del ADN mitocondrial, amplificado a partir de dos muestras diferentes de ADN total humano antiguo; A, de hueso de 35 años de antigüedad; B, a partir de sangre de un supuesto familiar (control positivo). Las flechas señalan algunas de las diferencias encontradas en la región hipervariable I.

ha sido descrita por varios autores (3, 13, 15). En todos los casos se siguió rigurosamente el diseño organizativo descrito para evitar o minimizar posibles eventos de falsos positivos. Estas precauciones se hicieron aun más necesarias por el hecho de que en nuestras condiciones las reacciones de PCR fueron extremadamente sensibles, llegándose a amplificar cantidades de templado del orden de los picogramos. La presencia en todos los experimentos de los apropiados controles, así como los resultados

consistentes obtenidos cuando se hicieron varias réplicas de cada muestra, permitieron descartar esta posibilidad.

Esta metodología ha sido ya utilizada de forma rutinaria en nuestro laboratorio para la identificación de muestras con interés forense, análisis de paternidad, y en el caso de muestras más antiguas, para estudios poblacionales con restos de aborígenes precolombinos en nuestro país (manuscritos en preparación).

15. Hagelberg E, Hedges R. Ancient bone DNA amplified. *Nature* 1989;342:485.

Recibido en mayo de 1997. Aprobado en octubre de 1997.

REDBIO'98

III ENCUENTRO LATINOAMERICANO DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL
3RD. LATIN-AMERICAN MEETING ON PLANT BIOTECHNOLOGY



La Habana, Cuba, del 2 al 5 de junio de 1998
Havana, Cuba, on June 2-5, 1998

"Seguridad Alimentaria y Biotecnología en América Latina y el Caribe"

Incluye conferencias plenarias, simposios, talleres, mesas redondas y sesiones de posters. Sesionará una feria comercial, se promoverán encuentros para la promoción de negocios y alianzas estratégicas y se celebrarán cursos y tours pre y post encuentro.

Para más información dirigirse a:

Secretaría Técnica
Dra. María Cristina Pérez
Agencia de Ciencia y Tecnología
CITMA, La Habana, Cuba
Teléfono: (53-7) 81 6245
Fax: (53-7) 33 9460
E-mail: redbio98@bioca.cigb.edu.cu