

¿QUÉ NOS DICEN LAS PROTEÍNAS SOBRE LOS FÓSILES DE ORCE?

Enrique García Olivares

Departamento de Bioquímica y
Biología Molecular III e Inmunología
Universidad de Granada

RESUMEN

PALABRAS CLAVE

Albúmina.
Anticuerpo.
Epítipo.
Fósil.
Proteínas.

Los métodos inmunológicos se han utilizado para obtener datos moleculares que arrojan luz sobre las adscripciones de los fósiles de Venta Micena. Con estas técnicas se ha demostrado la presencia de proteínas séricas preservadas: albúmina, IgG y transferrina en estos fósiles. Estas investigaciones también demostraron la especificidad de especie de las proteínas fósiles, ayudando así a resolver las controversias científicas que surgieron en torno a los datos morfológicos del cráneo de Orce y otros fósiles de Venta Micena.

ABSTRACT

KEYWORDS

Albumin.
Antibody.
Epitope.
Fossil.
Protein.

Immunological methods have been used to obtain molecular data that shed light on the species ascriptions of the Venta Micena fossils. These methods showed that the fossils contained well-preserved serum proteins, i.e., albumin, IgG, and transferrin. This research also demonstrated the species specificity of fossil proteins, thus helping to resolve scientific controversies that arose regarding the morphological data used to ascribe the Orce skull and other Venta Micena fossils to hominins.

PALEONTOLOGÍA MOLECULAR

Todos los seres vivos presentan escrita en el código genético su propia historia evolutiva. El análisis de las secuencias de los ácidos nucleicos o de la secuencia de aminoácidos de las proteínas de un ser vivo permite su identificación con una determinada especie o su ubicación en un árbol filogenético. Así, los árboles evolutivos construidos a partir del ADN o proteínas han contribuido a clarificar las relaciones evolutivas entre las es-

pecies vivientes. La morfología también está controlada por el ADN y las proteínas; sin embargo, la información genética que aporta la morfología es más indirecta y difícil de interpretar, ya que en la configuración de las estructuras de un ser vivo, intervienen numerosos genes y complejas interrelaciones. A menudo se presentan en la naturaleza fenómenos de convergencia o evolución paralela, que determinan la semejanza de una o varias características morfológicas entre especies no relacionadas. Por otra parte, la estructura ósea de un ser vivo está influida por estímulos externos y por las actividades físicas realizadas a lo largo de su vida. A pesar de todo, en paleontología clásica, la identificación y clasificación de especies se ha basado exclusivamente en los aspectos morfológicos del registro fósil. Independientemente de los aspectos morfológicos, el análisis de biomoléculas que sobreviven en los fósiles podría ser de gran ayuda en la identificación y clasificación de estos restos, sobre todo cuando están fragmentados y su clasificación morfológica es polémica. La paleontología molecular se ocupa de esta tarea.

PRESERVACIÓN DE BIOMOLÉCULAS EN FÓSILES

El grave inconveniente que limita el alcance de la paleontología molecular es que, si las biomoléculas sobreviven en los restos fósiles, deben de encontrarse alteradas y en muy baja concentración. Cuando muere un animal, la mayor parte de sus biomoléculas, así como el organismo en sí, desaparece rápidamente. Algunas enzimas del propio organismo inician un proceso de autólisis, que es potenciado por bacterias. Otros agentes como el agua, el oxígeno, y valores extremos de pH y temperatura, pueden ocasionar la eliminación de todo rastro orgánico del animal. Sin embargo, en circunstancias especiales en las que se produce una rápida deshidratación o un rápido enterramiento en ambiente anaerobio, los tejidos duros (huesos, conchas, etc.) e incluso blandos (piel, músculo, etc.) pueden sobrevivir, y en ellos algunas biomoléculas. No obstante, estas moléculas no se conservan intactas. Las proteínas suelen encontrarse desnaturalizadas y fraccionadas en péptidos.

La molécula que más se ha investigado en los tejidos de especies extinguidas, huesos antiguos o restos fósiles es el ADN, como portador directo de la información genética. Sin embargo, el ADN suele fraccionarse en secuencias de sólo unos cientos de pares de bases que contienen abundantes lesiones, como sitios sin base, pirimidinas oxidadas y entrecruzamientos de cadenas. De hecho, la mayoría de los estudios que se centraron en el ADN concluyeron que es poco probable que esta molécula sobreviva más de unos cientos de miles de años. Aunque lo ideal es leer la información

genética directamente a partir de la secuencia de nucleótidos del ADN, las proteínas también proporcionan información útil, aunque indirecta, sobre las secuencias de aminoácidos. A diferencia del ADN, algunas proteínas, en determinadas condiciones, pueden persistir en los fósiles durante millones de años. Las proteínas se unen a la fase mineral (hidroxiapatita) del hueso, y esta unión proporciona una protección considerable frente a la degradación por agentes exógenos. Además, la cantidad de cristales de hidroxiapatita aumenta tras la muerte, y esto puede favorecer la encapsulación de proteínas, lo que permite detectarlas en fósiles tan antiguos en los que con toda probabilidad el ADN se encuentra totalmente degradado. Sin embargo, en comparación con el ADN, las proteínas no son amplificables en el laboratorio, por lo que su concentración no puede aumentarse, como puede hacerse con el ADN mediante técnicas de reacción en cadena de la polimerasa. Aunque los primeros estudios de proteínas en fósiles realizados entre los años 50 y 70 identificaron aminoácidos y péptidos en fósiles de hasta millones de años de antigüedad, estos estudios no aportaron información sobre la especificidad de especie de estas biomoléculas, es decir, sobre su adscripción o parentesco con otras especies.

DETECCIÓN DE PROTEÍNAS FÓSILES MEDIANTE TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS

Jerold M. Lowenstein, de la Universidad de California en San Francisco, fue el primero en identificar el mensaje genético contenido en las proteínas fósiles aplicando una técnica inmunológica, el radioinmunoanálisis (RIA), capaz de detectar específicamente proteínas en cantidades tan bajas entre 10^{-9} y 10^{-12} gramos. Sabemos que las proteínas sufren profundos cambios con el tiempo, como agregación, fragmentación y racemización de sus aminoácidos. Sin embargo, estas moléculas, aunque fragmentadas o alteradas, en algunos casos retienen secuencias de aminoácidos intactas, que pueden ser reconocidas mediante anticuerpos específicos, incluso en fósiles con decenas de millones de años.

Así, Lowenstein ha identificado colágeno humano, la proteína más abundante del hueso, en muestras fósiles de *Homo sapiens* de 20.000 años, *Homo neanderthalensis* de 50.000 años, *Homo erectus* de 0,5 millones de años y *Australopithecus robustus* de 1,9 millones de años (1, 2). Otra proteína muy abundante en hueso, la osteocalcina, ha sido detectada mediante anticuerpos por diversos autores en huesos fósiles de bóvidos de 13 millones de años, en dientes de roedores de 30 millones de años, e incluso en huesos de dinosaurios más de 75 millones de años. En el caso de un fósil

de bóvido, se observó que la osteocalcina aún conservaba su capacidad funcional de fijar calcio.

Especialmente interesante es la detección de proteínas en el *Ramapiteco*. Este animal, que vivió hace 8-20 millones de años, fue considerado por algunos paleoantropólogos de los años sesenta como un homínido, lo que sugería que el linaje humano se había separado del de los monos hace alrededor de 20 millones de años. Los datos moleculares, sin embargo, contradecían esta fecha. El estudio de las albúminas de chimpancé, gorila y humana mediante técnicas inmunológicas había determinado que estas tres especies habían divergido de un antecesor común hacía sólo 5 millones de años. Si esta conclusión era correcta, el *Ramapiteco* no podía ser humano (3).

Lowenstein produjo anticuerpos inyectando un extracto de este fósil en un conejo. Estos anticuerpos reaccionaron más intensamente con sueros de gorila, orangután y gibbon que con sueros de chimpancé o humano. Según estos resultados, el *Ramapiteco* se encontraba genéticamente tan cercano a los monos asiáticos como a los africanos, y más alejado de la especie humana (4). Hoy día los paleontólogos excluyen al *Ramapiteco* del linaje humano y lo consideran próximo al orangután.

EL CASO DEL HOMBRE DE ORCE

Los fósiles de Orce asignados a homínidos por Josep Gibert, del Instituto Paleontológico de Sabadell, incluyen un fragmento de cráneo, el denominado Cráneo de Orce (VM-0), una diáfisis humeral (VM-1960) y un fragmento distal de un húmero (VM-3691) (5). Estos restos han sido encontrados en el yacimiento de Venta Micena cerca de la población de Orce, en la provincia de Granada. La antigüedad de este yacimiento ha sido estimada en 1,3 millones de años, lo que supondría la presencia más antigua de homínidos en Europa y la posible colonización de Europa por homínidos desde el sur, a través del estrecho de Gibraltar. En la actualidad existe un acuerdo generalizado de que los primeros humanos ocuparon la zona de Orce hace entre 1,3 y 1,2 millones de años, basándose en un número limitado de herramientas de piedra y en pruebas de acciones antrópicas en huesos detectadas en el yacimiento de Venta Micena 3. Otras pruebas proceden de yacimientos cercanos: se descubrieron dos molares humanos, probablemente del mismo individuo, en el yacimiento de Barranco León, y en los yacimientos de Fuentenueva-3a y Barranco León-5 se hallaron artefactos líticos. Sin embargo, como es usual en Paleontología con posibles restos humanos, los fósiles de Orce han levantado

fuertes polémicas. Frente a la posición de Gibert y colaboradores, algunos paleontólogos mantienen que el cráneo de Orce pertenece a un équido y que los húmeros son demasiado incompletos para ser identificados con seguridad (6). No obstante, reputados paleoantropólogos como Phillip V. Tobias, tras un examen minucioso de los fósiles asignados a los homínidos, apoyó las conclusiones de Gibert (7).

ANÁLISIS INMUNOLÓGICO DE LAS PROTEÍNAS DE LOS FÓSILES DE VENTA MICENA

Dadas las incertidumbres morfológicas de los fósiles de Venta Micena, estos fósiles fueron estudiados mediante técnicas inmunológicas. Teniendo en cuenta que los fósiles de Orce están datados alrededor de 1,3 millones de años, esta edad sobrepasaba el límite de detectabilidad del ADN en huesos, por lo que la posibilidad de encontrar esta biomolécula era muy improbable. La alternativa con estos fósiles era el análisis de proteínas, ya que estas biomoléculas sobreviven periodos mucho más prolongados que el ADN.

El estudio de las proteínas de los fósiles de Venta Micena se llevó a cabo en dos centros independientes: en la Universidad de California, en San Francisco, por el grupo de Lowenstein, y en la Universidad de Granada por Borja y García Olivares. Lowenstein utilizó el RIA para la detección inmunológica de las proteínas fósiles, mientras que Borja y García Olivares emplearon una técnica equivalente al RIA, el ELISA (Enzyme-Linked-Immunesorbent-Assay).

Tanto en Granada como en San Francisco se estudiaron los fósiles atribuidos a homínidos VM-0 y VM-1960 (de Venta Micena, Orce), y CV-1 y CV-2, dos fragmentos de húmero encontrados en Cueva Victoria, un yacimiento de la provincia de Murcia con una edad algo inferior a la de Venta Micena. En ambas universidades se analizaron además fósiles de distintos mamíferos de Venta Micena y Cueva Victoria. Un extracto del Cráneo de Orce fue estudiado con anticuerpos frente a albúmina de distintas especies, y ambos grupos encontraron una mayor reactividad con anticuerpos dirigidos frente a albúmina humana, mientras que la reactividad de este fósil con otros anticuerpos, especialmente con anti-albúmina de caballo, fue muy inferior.

La conclusión, por tanto, era que la albúmina detectada en el cráneo de Orce se encontraba más cercana a la especie humana que a otras especies. Lowenstein además detectó colágeno y transferrina con reacciones inmunológicas semejantes a las proteínas humanas en el cráneo de Orce (VM-

0). Resultados semejantes fueron obtenidos con el húmero VM-1960, también atribuido a un homínido. Sin embargo, ninguno de los dos grupos detectó albúmina en los fósiles atribuidos a homínidos CV-1 y CV-2 de Cueva Victoria. En el estudio de otros mamíferos, ambos grupos observaron reacciones semejantes a albúmina de caballo en fósiles de équidos, y el grupo de San Francisco detectó reacciones semejantes a albúmina de bisonte en dos fósiles de bóvidos (8). Todos estos resultados confirmaban la presencia de proteínas en fósiles de más de un millón de años y demostraban que es posible identificar características de especie en estas proteínas fósiles mediante reacciones inmunológicas.

Otra novedad de estos resultados fue la detección de albúmina, proteína que se evidenciaba por primera vez en unos fósiles tan antiguos. Aunque el colágeno había sido identificado previamente en fósiles de millones de años, en principio, la detección de albúmina parecía improbable, ya que esta proteína es mucho menos abundante en hueso que el colágeno y, por otra parte, al ser muy soluble, se pensó que sería «lavada» rápidamente del hueso durante el proceso de degradación. Sin embargo, según ha señalado Noreen Tuross, de la Smithsonian Institution de Washington, el fenómeno clave de la preservación de las proteínas: la encapsulación de estas biomoléculas en los cristales de hidroxiapatita parece afectarles especialmente a la albúmina, lo que explicaría la detección de esta proteína en los fósiles de Venta Micena. El colágeno, aunque muy abundante en hueso, es una molécula muy poco informativa genéticamente, ya que su secuencia de aminoácidos es muy repetitiva y semejante de una especie a otra. Por el contrario, la albúmina proporciona mayor información evolutiva. El hecho de que esta proteína haya evolucionado más rápidamente que el colágeno supone una ventaja en estos tipos de estudios, ya que la albúmina permite diferenciar mejor las especies.

Uno de los puntos más importantes en la paleontología molecular es poder discriminar si las biomoléculas detectadas forman parte integral del fósil o proceden de contaminación exógena. Aunque la posibilidad de contaminación es improbable, por ejemplo, en el caso de la albúmina de caballo detectada en los fósiles de équidos, la albúmina humana encontrada en VM-0 y VM-1960 podría proceder de contaminación producida por el contacto con sudor o saliva durante el estudio de estos fósiles por los paleontólogos. También se ha sugerido que filtraciones procedentes de restos humanos recientes hubieran contaminado los fósiles. Esta última posibilidad fue fácilmente excluida, ya que se analizó tierra recogida del lugar donde se habían encontrado los fósiles de homínidos y no se detectó albúmina. Las proteínas fósiles se encuentran unidas a la fase mineral del hueso, de la que hay que liberarlas tratando la muestra con una disolución

descalcificante de EDTA. Las proteínas procedentes de la contaminación exógena no están unidas a la fase mineral y, por tanto, pueden ser extraídas sin necesidad de disolver el hueso, simplemente con un lavado en una disolución salina (PBS). La detección de albúmina no ligada a la fase mineral se puede observar al analizar un hueso fresco recién extraído que contiene la albúmina procedente de la sangre retenida, y que es fácilmente lavada con PBS. Esta albúmina no ligada a la fase mineral ha podido detectarse incluso en huesos que han estado enterrados durante diez años. Los fósiles VM-0 y VM-1960 no contenían albúmina no ligada, y la albúmina sólo fue detectada cuando se disolvió la fase mineral mediante EDTA. Por tanto, la albúmina de VM-0 y VM-1960 formaba parte integral de estos fósiles y no procedía de contaminación exógena, por lo que al ser albúmina autóctona y encontrarse cercana a la albúmina humana, ambos fósiles podían ser considerados como pertenecientes a homínidos.

A pesar de su persistencia, las proteínas fósiles se fraccionan o desnaturalizan inevitablemente, aunque pueden sobrevivir algunas secuencias de aminoácidos detectables con anticuerpos. En los estudios anteriores, se han utilizado suero sanguíneo de un animal previamente inmunizado contra una proteína. Este suero contiene anticuerpos diferentes, cada uno de los cuales reconoce una parte independiente (epítipo) de la proteína utilizada en la inmunización (antisuero policlonal). Para estudios moleculares más precisos se pueden utilizar anticuerpos monoclonales. Este anticuerpo purificado reconoce un único epítipo en la proteína. Probando de forma independiente diferentes anticuerpos monoclonales contra la albúmina humana, es posible analizar los distintos epítipos de esta molécula individualmente, y determinar cuáles de ellos han sobrevivido en la albúmina fósil. En los estudios de la reactividad de los anticuerpos monoclonales anti-albúmina humana con extractos de los fósiles VM-0 y VM-1960, se observó que cada uno de los anticuerpos monoclonales mostraban un grado de reactividad diferente. Una mayor o menor reactividad indicaba un mejor o peor grado de conservación de los diferentes epítipos reconocidos en la albúmina fósil. Los anticuerpos monoclonales, por tanto, no sólo permitieron confirmar los datos obtenidos con anticuerpos policlonales, sino que también brindaron la oportunidad de analizar la integridad de diferentes epítipos de la proteína.

PALEOPROTEÓMICA Y LOS FÓSILES DE VENTA MICENA

La paleoproteómica es un campo de la ciencia molecular relativamente joven, pero en rápido crecimiento, en el que la tecnología de secuenciación basada en la proteómica se utiliza para identificar especies y proponer

relaciones evolutivas entre taxones extintos. Como enfoque complementario de la paleogenómica, el estudio de las proteínas antiguas tiene el potencial de revelar filogenias más antiguas y completas debido a la relativa estabilidad de los aminoácidos en las proteínas en comparación con los ácidos nucleicos en el ADN. La espectrometría de masas (MS, mass spectrometry) proporciona información sin precedentes sobre proteomas modernos y antiguos, y puede obtener datos de secuencias de proteínas de organismos extintos, así como de artefactos históricos y prehistóricos. Desde la aplicación seminal de la MS a la paleoproteómica (9), los protocolos de extracción y análisis, el software para el procesamiento de datos, las bases de datos de proteínas y la instrumentación de alta precisión han experimentado avances significativos. Estos avances son potencialmente aplicables al estudio de los fósiles de Venta Micena. La combinación de los conocimientos previos en la inmunodetección de proteínas fósiles con los recientes avances en los métodos de MS permitirá acceder al gran caudal de información potencial que encierra el registro fósil de Venta Micena y contribuirá al crecimiento de la paleoproteómica. Aunque la investigación paleoproteómica del siglo XX utilizaba tecnologías menos potentes y protocolos menos estrictos en comparación con las herramientas disponibles actualmente para evaluar la contaminación, confirmar la endogeneidad y autenticar la asignación de especies, el cuerpo de conocimiento proporcionado ha allanado el camino para el extraordinario desarrollo de la paleoproteómica del siglo XXI.

BIBLIOGRAFÍA

1. Lowenstein JM. Immunological reactions from fossil material. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1981 May 8;292(1057):143-9. Epub 1981/05/08. doi: 10.1098/rstb.1981.0022. Cited in: Pubmed; PMID 6167997.
2. Lowenstein JMaS, G. Immunological methods in molecular palaeontology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1991;333:375-80. doi:10.1098/rstb.1991.0087.
3. Lowenstein JM. Fossil proteins and evolutionary time. *Pontif Acad Sci Scr Var.* 1983;50:151-162.
4. Lowenstein JM, Molleson T, Washburn SL. Piltdown jaw confirmed as orang. *Nature.* 1982 1982/09/01;299(5881):294-294. doi:10.1038/299294a0.
5. Gibert J, Ribot F, Ferrandez C, Martinez B, Caporicci R, Campillo D. Anatomical study: comparison of the cranial fragment from venta micena, (orce; Spain) with fossil and extant mammals. *Human Evolution.* 1989 1989/08/01;4(4): 283-305. doi:10.1007/BF02437268.
6. Agusti J, Moya-Sola S. On the identity of the cranial fragment attributed to homo-sp in Venta Micena, Granada, Spain. *Estudios Geologicos (Madr-*

- id). 1987 1987;43(5-6):535-538. Cited in: Pubmed; PMID BIOSIS:PREV 198835077401.
7. Tobias P. Some comments on the case for Early Pleistocene hominids in South-Eastern Spain. *Human Evolution*. 2006;13(2):91-96.
 8. Borja C, Garcia-Pacheco M, Olivares EG, Scheuenstuhl G, Lowenstein JM. Immunospecificity of albumin detected in 1.6 million-year-old fossils from Venta Micena in Orce, Granada, Spain. *Am J Phys Anthropol*. 1997 Aug; 103(4):433-41. Epub 1997/08/01. doi:10.1002/(SICI)1096-8644(199708)103:4<433::AID-AJPA1>3.0.CO;2-O. Cited in: Pubmed; PMID 9292161.
 9. Asara JM, Schweitzer MH, Freimark LM, Phillips M, Cantley LC. Protein sequences from mastodon and *Tyrannosaurus rex* revealed by mass spectrometry. *Science*. 2007 Apr 13;316(5822):280-5. Epub 2007/04/14. doi:10.1126/science.1137614. Cited in: Pubmed; PMID 17431180.



