

# DETECCIÓN INMUNOLÓGICA DE INMUNOGLOBULINA G EN HUESOS FÓSILES DE 1,6 MILLONES DE AÑOS DE VENTA MICENA, ORCE (GRANADA, ESPAÑA) Y SUS POSIBLES APLICACIONES Y PERSPECTIVAS EN PALEOPATOLOGÍA

Immunological detection of Immunoglobulin G in fossil bones dated at 1.6 myr old from Venta Micena, Orce (Granada, Spain) and its posible applications and perspectives in Paleopathology

**Jesús M. TORRES**  
**Concepción BORJA**  
**Enrique G. OLIVARES**  
Unidad de Inmunología  
Instituto de Biotecnología  
Universidad de Granada

---

**RESUMEN:** Hemos estudiado la presencia de inmunoglobulina G (Ig G) en huesos fósiles de équidos procedentes de Venta Micena (Granada, España) datados de 1.6 millones de años (m.a.), y de Atapuerca (0,12 m.a.) (Burgos, España). Además, estudiamos la presencia de dicha proteína en los fósiles presumiblemente asignados a homínidos VM-1960 y VM-3691 (1.6 m.a.) de Venta Micena y CV-1 y CV-2 (1,4 m.a.) de Cueva Victoria (Murcia, España).

Las muestras tomadas de los diferentes especímenes fueron reducidas a un fino polvo y su estructura mineral se disolvió en una solución de ácido etilendiaminotetracético (EDTA). Los diferentes extractos fósiles se probaron con anticuerpos frente a Ig G humana y frente a Ig G de caballo mediante el empleo de dos métodos inmunológicos diferentes: Dot-blotting (DB), y una modificación de éste, Dot-blotting cuantitativo (QDB). Mediante DB detectamos la presencia de Ig G en algunos de los fósiles objeto de estudio, la cual fue cuantificada mediante QDB. Los équidos fósiles de Venta Micena y Atapuerca dieron reacciones más potentes con los anticuerpos frente a Ig G de caballo que con los anticuerpos frente a Ig G humana. Los fósiles VM-3691 y VM-1960 reaccionaron más fuertemente con los anticuerpos frente a Ig G humana que con los anticuerpos frente a Ig G de caballo, mientras que no fue posible detectar la presencia de la proteína en los fósiles CV-1 y CV-2. Estos resultados muestran que es posible detectar Ig G especie-específica en fósiles de una antigüedad en torno a 1,6 millones de años. El análisis inmunológico de proteínas fósiles puede ayudar a resolver algunas controversias de carácter paleontológico.

**PALABRAS CLAVE:** Ig G, homínido, équido, Venta Micena, Atapuerca, hueso fósil, Dot-blotting, Dot-blotting cuantitativo.

---

**ABSTRACT:** We studied the presence of immunoglobulin G in equid and hominid fossil bones from Venta Micena, Orce (Granada), dated at 1.6 Myr old. Samples taken from the specimenes were crushed to a fine powder and submitted to a sequential extraction protocol of proteins in three stages. In each stage were taken aliquots of the fossil extract and were tested with antibodies against horse IgG and against human IgG with two immunological methods: Dot-blotting (DB) and a modification of this method, Quantitative Dot-blotting (QDB). Once demonstrated the presence of fossil IgG, we outline ourselves to prove furthermore, the state of conservation of the protein. For this purpose we accomplished experiments of Immunoblotting (Protein Electrophoresis, transfer to membrane and Immunodetection), demonstrating in principle, that the protein is partially integral. Immunoglobulin G is an essential protein in the immune response and we outline ourselves its detection associated with some bacterial antigens important in pathology.

**KEY WORDS:** IgG, hominid, equid, Venta Micena, fossil bones.

---

## INTRODUCCIÓN

Numerosos trabajos han demostrado recientemente que las biomoléculas especie-específicas pueden persistir en algunos fósiles. Estas moléculas frecuentemente se encuentran en escasa proporción y resulta difícil identificarlas con certeza; no obstante, cuando persisten y somos capaces de detectarlas, los análisis de proteínas y de ADN constituyen una herramienta fiable para la clasificación de fósiles, especialmente cuando las interpretaciones anatómicas son controvertidas o discrepantes (SMITH y LITTLEWOOD, 1994). Aunque algunos estudios han demostrado la presencia de ADN especie-específico en fósiles de plantas de millones de años (POINAR, CANO y POINAR, 1993) y en insectos preservados en ámbar (CANO *et al.*, 1993), un estudio más reciente sugiere que la presencia de ADN antiguo en fósiles preservados en ámbar es dudosa (AUSTIN *et al.*, 1997). Sin embargo, se ha detectado ADN en muestras de millones de años de antigüedad (PÄÄBO, HIGUCHI y WILSON, 1989; HOSS *et al.*, 1996), y se ha conseguido secuenciar ADN mitocondrial de un hueso fósil de Neanderthal (30.000-100.000 años) (KRINGS *et al.*, 1997). No obstante, la rápida degradación de esta biomolécula en hueso ha conducido a algunos autores a sugerir que la detección de ADN en huesos fósiles está limitada a especímenes de una edad no superior a 100.000 años (POINAR *et al.*, 1996; LINDHAL, 1997).

Por el contrario, las proteínas han sido identificadas mediante diferentes métodos inmunológicos en huesos fósiles de millones de años de antigüedad. Lowenstein, utilizando el radioinmunoensayo, detectó colágeno especie-específico y factores del suero en fósiles tan antiguos como *Homo erectus* (0,5 m.a.), *Australopithecus robustus* (1,9 m.a.) (Lowenstein, 1981) y *Ramapithecus* (8 m.a.) (LOWENSTEIN, 1983). Además, se ha encontrado colágeno en un hueso de unos 10 m.a. (ROWLEY *et al.*, 1986) y se ha extraído osteocalcina de huesos fósiles de bóvidos de 13 m.a. y de un diente de roedor de unos 30 m.a. (ULRICH *et al.*, 1987). La osteocalcina extraída de los huesos de bóvidos todavía conservaba residuos de ácido gamma-carboxiglutámico funcionalmente activos después de 13 m.a. (ULRICH *et al.*, 1987); moluscos de 70 m.a. dieron reacciones inmunológicas positivas (DE JONG *et al.*, 1974), y se observaron al microscopio electrónico fibrillas de colágeno de un hueso de dinosaurio de 200 m.a. (WYCKOFF, 1972). Estos resultados muestran claramente que las proteínas de algunos huesos fósiles, aunque fragmentadas, pueden persistir en el tiempo y conservar bastantes de sus propiedades inmunológicas, proporcionándonos una útil información genética durante periodos de millones de años. La preservación de las proteínas en los huesos fósiles parece estar favorecida por el hecho de que dichas proteínas se encuentran embebidas en la fase mineral del hueso, proporcionándole una protección considerable a la degradación por las condiciones ambientales (SMITH *et al.*, 1985; BERMAN, ADDADI y WEINER, 1988).

Comparando con el colágeno y la osteocalcina (proteínas más abundantes en hueso), la albúmina o la inmunoglobulina G, aunque presentes en menores concentraciones en hueso, proporcionan mucha más información evolutiva debido a su mayor tasa de evolución (WILSON, CARLSON y WHITE, 1977). La albúmina ha ayudado a resolver la filogenia de varios grupos ya extinguidos como son los mamuts, mastodontes, lobo de Tasmania y quagga (LOWENSTEIN, 1981; LOWENSTEIN, SARICH y RICHARDSON, 1981; LOWENSTEIN y RYDER, 1985; RAINEY *et al.*, 1984; SHOSHANI *et al.*, 1985; LOWENSTEIN y SCHEUENSTHUL, 1991). En algunos casos, las proteínas plasmáticas aparecen mejor preservadas que el colágeno en el hueso ya que el hueso comienza a enriquecerse en proteínas plasmáticas por encima de niveles *in vivo* (TUROSS, 1989). En un estudio previo, nuestro grupo en la Universidad de Granada y el grupo de Lowenstein en la Universidad de California, en San Francisco, independientemente, mostró que se puede detectar albúmina especie-específica mediante ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) o mediante RIA (Radio Immuno Assay) en fósiles de diferentes especies de Venta Micena (Granada, España) (BORJA *et al.*, 1997). Estos estudios, llevados a cabo de forma independiente por los dos grupos, condujeron a la asignación como homínidos de fósiles tan controvertidos como el fragmento de cráneo VM-0 y el fragmento de húmero VM-1960, ambos datados en torno a 1,6 m.a. (ZIHLMAN y LOWENSTEIN, 1996; PALMQVIST, 1997; GIBERT *et al.*, 1998). En el presente estudio mostramos que la Ig G también puede ser detectada mediante *Dot-blotting* (DB) y una modificación de este método denominada *Dot-blotting* cuantitativo (QDB) en huesos fósiles de équido de 0,12 m.a. procedentes de Atapuerca y en huesos fósiles de équidos y homínidos de 1,6 m.a. de Venta Micena.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Fósiles y extractos de hueso*

En la tabla 1 figura la lista de fósiles objeto de estudio. Para evitar la contaminación externa durante el proceso de extracción y estudio, se mantuvieron rigurosas condiciones de asepsia y se utilizó material estéril. Las muestras se tomaron del interior del fósil y fueron reducidas a un fino polvo. Se procedió a una extracción secuencial de proteínas utilizando tres diferentes medios: en primer lugar, el polvo se mantuvo

durante 10 días en agitación a temperatura ambiente en una solución de PBS (Phosphate Buffered Saline) antes de ser sometido a descalcificación. A continuación se centrifugó a 2.500 rpm, el sobrenadante se alicuotó y el precipitado se resuspendió en una solución 0,2 M de EDTA, pH 7,4 y se mantuvo en agitación otros 10 días. Se volvió a centrifugar, se alicuotó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió por última vez en una solución 0,5 M de ácido acético. Se mantuvo otros 10 días en agitación continua, se centrifugó y se volvió a alicuotar el sobrenadante. Los sobrenadantes recogidos y alicuotados se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Los fósiles de équidos se extrajeron a una concentración de 5 mg de hueso por mL de solución de extracción, mientras que los fósiles de homínidos se extrajeron a una concentración de 3,5 mg./mL. También se sometió a extracción a dos diferentes concentraciones, 3 mg/mL y 15 mg/mL una vértebra de burro de unos 100 años de antigüedad encontrada en Orce (cerca de Venta Micena).

### **Antisueros**

Utilizamos dos anticuerpos policlonales aislados por afinidad y marcados con peroxidasa, Goat anti-human Ig G y Rabbit anti-horse Ig G (Sigma, St. Louis).

### **Detección de Ig G por Dot-blotting**

En una membrana de nitrocelulosa (Biorad, Richmond) se marcaron con un punzón los diferentes círculos que van a contener cada una de las muestras. A continuación se depositaron 5 mL de cada extracto fósil objeto de estudio o de una solución nativa de Ig G humana o de caballo. Las soluciones utilizadas para la extracción de los fósiles se utilizaron como control negativo. Todas las muestras fueron estudiadas por duplicado. La membrana se incubó 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  con objeto de que las proteínas se fijan a la membrana. Después de lavar la membrana con una solución PBS-0,05 % Tween 20 tres veces durante 10 minutos cada vez; la membrana se bloqueó con una solución de gelatina 1 % en PBS durante una hora a temperatura ambiente y durante toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ , con objeto de evitar las uniones inespecíficas del antisuero a la membrana. Se volvió a lavar la membrana con una solución PBS-0,05 % Tween 20  $3 \times 10$  minutos y se añadió el anticuerpo anti-Ig G correspondiente diluido en PBS-0,05 % Tween 20. Una vez incubado el anticuerpo durante una hora a temperatura ambiente, se lavó de nuevo la membrana con PBS-Tween y se reveló la reacción antígeno-anticuerpo. El revelado se llevó a cabo mediante la incubación durante 5-15 minutos de una solución de 3,3'-diaminobenzidina (Sigma) y 0,003 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  en PBS. La reacción enzimática se detuvo lavando abundantemente con agua destilada y para disminuir el *background* de fondo se utilizaron 10 mL de una solución de ácido sulfúrico 1/8 al 0,05 %.

### **Detección de Ig G por Dot-blotting cuantitativo**

La técnica de *Dot-blotting* descrita anteriormente nos proporciona unos resultados de forma semi-cuantitativa (intensidad de tinción), y por ello hicimos una modificación de este método para obtener resultados de forma cuantitativa. El desarrollo de la técnica sigue los mismos pasos que en el DB hasta la incubación del anticuerpo anti-Ig G correspondiente. Una vez incubado el antisuero, se procede a cortar los círculos en los que ha tenido lugar la reacción antígeno-anticuerpo y cada círculo se transfiere a un pocillo de una placa microtiter de 96 pocillos (ELISA). El revelado se lleva a cabo mediante la adición a cada pocillo de una solución de 0,4 mg./mL de ortho-phenylenediamine dihydrochloride (Sigma) en tampón fosfato-citrato pH 5 y  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 0,02 %. Se deja transcurrir la reacción durante 30 minutos en oscuridad, se detiene mediante la adición de 50 mL de ácido sulfúrico 1/8 y se lee a una absorbancia de 492 nm en un lector de placas de ELISA. Nuevamente se utilizan como control negativo las distintas soluciones empleadas para la extracción de proteínas. Los valores de absorbancia obtenidos con los extractos fósiles, tanto en la reacción directa como en la reacción cruzada, se extrapolan en las distintas curvas de calibración de Ig G humana y de caballo para determinar la cantidad de proteína en los fósiles. Cuando un fósil corresponde o está cercano en la escala evolutiva a la especie frente a la cual se dirige el anticuerpo, la cantidad de Ig G detectada es mayor que cuando se utiliza un anticuerpo de una especie no relacionada (Fig. 1).

Aunque la cantidad de proteína detectada en un fósil es útil para hacer comparaciones entre especies, no puede ser considerada como un valor absoluto, ya que estas proteínas fósiles se encuentran probablemente desnaturalizadas y parcialmente fragmentadas en comparación con las Ig G nativas utilizadas para la obtención de las curvas de calibración (Fig. 1). Además, la Ig G humana cuantificada en los fósiles de équidos y la Ig G de caballo cuantificada en los fósiles de homínidos reflejan reacciones cruzadas de los anticuerpos frente a Ig G de distintas especies. Es por ello por lo que utilizamos el término "ng.-equivalente", para denotar que las cantidades de proteína detectadas no son valores absolutos (BORJA *et al.*, 1997).

### **Detección de proteínas mediante immunoblotting**

Como dijimos anteriormente, las proteínas fósiles probablemente se encuentren desnaturalizadas y parcialmente fraccionadas debido a los distintos procesos diagenéticos que han ido ocurriendo a lo largo del tiempo. Con objeto de estudiar no ya sólo la presencia de proteínas, sino su estado de conservación nos planteamos la detección mediante la técnica de *immunoblotting*. El fundamento de esta técnica consiste en la separación de la mezcla de proteínas contenidas en el extracto fósil en base a su tamaño. La electroforesis SDS-PAGE se lleva a cabo en condiciones desnaturalizantes con objeto de que el SDS (detergente aniónico) dote de carga neta negativa a todas las proteínas y el único parámetro que discrimine la movilidad de las proteínas en el campo eléctrico sea su peso molecular. Así, las proteínas de mayor tamaño avanzarán más despacio en el gel, mientras que las proteínas de menor peso molecular progresarán más rápidamente, ya que experimentan un menor retardo en el gel. Para el caso concreto de la Ig G, se consigue, debido a las condiciones desnaturalizantes, la separación de las distintas subunidades que componen la molécula, lo cual es importante desde el punto de vista de la especificidad. En un mismo experimento se puede comparar la movilidad electroforética de las proteínas fósiles confrontándolas con patrones de la misma proteína nativa y observando si han ocurrido fenómenos de agregación o fragmentación que derivarían en alteraciones en la movilidad respecto al patrón.

Para ello procedimos a una extracción de proteínas de los équidos fósiles de Venta Micena VM-3037 y VM-3032. El procedimiento de extracción es el mismo que se describió anteriormente. La técnica consiste en una separación electroforética de las proteínas en geles SDS-PAGE (Mini Protean II Electrophoresis Cell, Biorad) seguida de la transferencia de las proteínas (Mini Trans-Blot Cell, Biorad) a una membrana PVDF (Hybond-P, Amersham). La transferencia se llevó a cabo en un tampón Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20 %, durante una hora a un voltaje constante de 100 voltios. Una vez transferidas las proteínas a la membrana, ésta se bloqueó con gelatina al 1 % en PBS durante una hora a temperatura ambiente y toda la noche a 4 °C para evitar las uniones inespecíficas del antisuero a la membrana. A continuación se lava la membrana con PBS-0,1 % Tween 20 dos veces durante 2 minutos cada vez y se incuba el antisuero correspondiente durante una hora a temperatura ambiente. Se lava la membrana abundantemente con PBS-0,1 % Tween 20 y se procede a la inmunodetección por quimioluminiscencia (ECL-Plus Western Blotting Detection System, Amersham). Éste es un sistema de detección ultrasensible basado en la oxidación de la diacilhidracida cíclica del luminol. La peroxidasa unida al anticuerpo, en presencia del sustrato quimioluminiscente, oxida al luminol y se produce la emisión de luz, que puede ser captada por un film de rayos X. Por último, se procede al revelado de la película.

## **RESULTADOS**

### **Detección de Ig G en fósiles de Atapuerca asignados a équidos**

Los fósiles de Atapuerca asignados a équidos fueron estudiados por DB y QDB. Los resultados obtenidos con estos dos métodos fueron paralelos. En todos los casos, los extractos en PBS fueron negativos. El anticuerpo anti-horse Ig G dio reacciones positivas con los fósiles AT83.1S y AT83.1I en EDTA y reacciones mucho más débiles o no reaccionó con los otros fósiles probados. Todos los fósiles de Atapuerca fueron positivos en los extractos de ácido acético. La reactividad de los extractos en ácido acético fue mayor que aquella en los extractos en EDTA (Figs. 2 y 3). Mediante QDB, los fósiles fueron probados con anticuerpos anti-horse Ig G y anti-human Ig G. La cantidad de Ig G de caballo fue mayor que la cantidad de Ig G humana que aparecía debido a reacción cruzada (Fig. 3). CATTANEO *et al.* (1995) han sugerido la importancia de la integridad del hueso para la supervivencia de las proteínas en huesos antiguos. Estos autores creen que la exposición directa del hueso a las condiciones ambientales implica una peor preservación de las proteínas. Nosotros hemos estudiado muestras de dos équidos fósiles de Atapuerca (AT83.1 y AT83.2) tomadas en la superficie (más expuesta, AT83.1S y AT83.2S) y tomadas del interior (más protegida, AT83.1I y AT83.2I). Las cuatro muestras fueron positivas para Ig G de caballo en QDB, y no encontramos diferencias significativas entre la cantidad total de Ig G detectada en estos fósiles (Fig. 3); es decir, no encontramos en estos fósiles una relación claramente establecida entre la cantidad de Ig G detectada y el lugar (superficie o interior) donde la muestra fue tomada.

### **Detección de Ig G en fósiles de Venta Micena asignados a équidos**

Los fósiles de Venta Micena asignados a équidos se estudiaron por DB y QDB. En ambos métodos, el anticuerpo anti-horse Ig G dio reacciones positivas con el extracto EDTA de todos los fósiles estudiados. Los extractos en PBS fueron negativos en todos los casos y sólo encontramos una débil reacción positiva en el extracto en ácido acético de los fósiles VM-3032 (por DB y QDB) y VM-3037 (por DB) (Figs. 4 y 5).

Mediante QDB, los fósiles fueron probados con anticuerpos anti-horse Ig G y anti-human Ig G. Este último anticuerpo sólo dio una débil reacción positiva con el extracto VM-3037 EDTA, siendo negativo para el resto de los fósiles de caballo. La cantidad de Ig G de caballo fue mayor que la cantidad de Ig G humana que aparecía debido a reacción cruzada (Fig. 5).

#### ***Detección de Ig G en fósiles de Venta Micena y Cueva Victoria asignados a homínidos***

Los fósiles de Venta Micena y Cueva Victoria asignados a homínidos se estudiaron mediante DB y QDB. En ambos métodos el anticuerpo anti-human Ig G dio reacciones positivas con los extractos en EDTA de los fósiles VM-3691 y VM-1960. Los extractos en PBS y ácido acético de estos fósiles fueron negativos. Todos los extractos de los fósiles CV-1 y CV-2 fueron negativos para la presencia de Ig G (Figs. 6 y 7). Mediante QDB, los fósiles fueron probados también con anticuerpos anti-horse Ig G. Estos anticuerpos reaccionaron, aunque débilmente, con el extracto en EDTA de VM-3691 y VM-1960, y como el anticuerpo anti-human Ig G, fue negativo para el resto de los extractos. De cualquier forma, la cantidad de Ig G de caballo detectada en estos dos fósiles fue menor que la cantidad de Ig G humana. Los fósiles CV-1 y CV-2 fueron negativos con el anticuerpo anti-horse Ig G (Fig. 7).

#### ***Comparación de la cantidad de Ig G detectada en diferentes especímenes***

La cantidad total de Ig G de los distintos fósiles objeto de estudio fue representada frente a su edad y comparada con un hueso más reciente, una vértebra de burro de unos 100 años de antigüedad. En general, observamos un descenso en la cantidad de Ig G conforme aumenta la edad del fósil (Fig. 8).

#### ***Detección de Ig G en fósiles de Venta Micena asignados a équidos mediante immunoblotting***

Se estudió el fósil de Venta Micena VM-3037 en EDTA, en el cual se había detectado una cantidad significativa de Ig G en DB y QDB. De igual forma se estudió una cantidad conocida de Ig G de caballo nativa para poder comparar su comportamiento con el de la proteína fósil (Fig. 9). En la muestra de Ig G nativa comercial se detectaron dos bandas correspondientes a las dos cadenas de la proteína, como lo demuestran sus pesos moleculares: cadena pesada (H) 58 KD y cadena ligera (L) 27 KD. En la muestra correspondiente al fósil encontramos una banda coincidente en peso molecular con la cadena H de la Ig G nativa, mientras que no detectamos banda alguna correspondiente a la cadena ligera. El anticuerpo utilizado en la detección de Ig G fue un anti-horse Ig G policlonal, el cual presenta un mayor número de epítomos de reconocimiento en la cadena H, como puede observarse en la diferencia de intensidad de las bandas de la Ig G nativa, y es por ello por lo que en la muestra fósil no es posible detectar la cadena L, ya que la cantidad de proteína es muy inferior, y sólo incrementando el tiempo de exposición al film de rayos X conseguimos una detectabilidad suficiente para poner de manifiesto la cadena H.

## **DISCUSIÓN**

Hemos demostrado que la Ig G sobrevive en huesos fósiles de équidos y homínidos de 1,6 m.a. de Venta Micena y en huesos fósiles de équidos de 0.12 m.a. del yacimiento de Atapuerca. También mostramos que la inmunorreactividad de esta proteína es consistente con la especie asignada a cada fósil. La eficacia del DB en la detección de proteínas fósiles fue descrita por primera vez por ROWLEY *et al.* (1986), el cual detectó colágeno en fósiles de 10 millones de años. La pequeña cantidad de muestra necesaria para el DB y el QDB (5?L) hacen que este método sea muy apropiado para el estudio de proteínas fósiles, especialmente cuando la cantidad de muestra disponible es muy pequeña. La modificación metodológica del DB desarrollada por nosotros en el QDB para obtener resultados cuantitativos obvia el problema principal que plantea el DB, en el cual los resultados pueden expresarse únicamente de forma semicuantitativa.

La detección en los fósiles équidos de Ig G, inmunológicamente más cercana a Ig G de caballo moderna que a la Ig G humana, hace improbable que la presencia de esta proteína en los fósiles se deba a contaminación exógena. Sin embargo, los fósiles asignados a homínidos pueden haberse contaminado con material humano durante su manipulación por los paleontólogos, contaminación que quedaría enmascarada en la reacción inmunológica con anticuerpos frente a proteínas humanas. No obstante, esto es poco probable, como lo demuestra el hecho de que se produzcan resultados negativos en el extracto en PBS de los fósiles. De las tres extracciones consecutivas obtenidas para cada fósil, équido u homínido, se detectó Ig G en los extractos en EDTA y/o ácido acético, mientras que no se detectó Ig G en los extractos en PBS (Figs. 2-7). Esto indica que para que las proteínas puedan ser liberadas es necesario disolver la estructura mineral del hueso. La Ig G forma un componente integral de la estructura del hueso, aunque no está íntimamente unida al mismo, y esta presencia en el hueso fósil no se debe a contaminación exógena.

La mayor cantidad de Ig G en los fósiles équidos y homínidos de Venta Micena se encontró en el extracto en EDTA (Figs. 4-7), mientras que en los fósiles de Atapuerca, la mayor cantidad de Ig G se encontró en el extracto en ácido acético (Figs. 2 y 3). Esto refleja diferencias en la solubilidad de las proteínas de fósiles procedentes de distinto emplazamiento. La solubilidad de las proteínas está probablemente influenciada por factores físico-químicos que afectan el proceso de fosilización de los distintos especímenes. La edad del fósil es un factor importante en la preservación de las biomoléculas (LOWENSTEIN, 1981). En general, hemos observado que la cantidad de Ig G disminuye con el aumento de la edad del fósil (Fig. 8). Sin embargo, la edad del fósil no puede ser utilizada como un criterio absoluto, ya que en algunos casos se ha comprobado que fósiles más antiguos contenían cantidades superiores de biomoléculas (ULRICH *et al.*, 1987; POINAR *et al.*, 1996). Por ejemplo, no hemos detectado Ig G en los fósiles CV-1 y CV-2, los cuales son más recientes que los fósiles de Venta Micena, mientras que, por otro lado, la cantidad de Ig G en el fósil VM-3032 está más cercana a las cantidades de proteína detectadas en los fósiles de Atapuerca (Fig. 8). Los factores ambientales parecen, por tanto, jugar un papel más importante que la edad en la preservación de las biomoléculas (EGLINTON y LOGAN, 1991).

CATTANEO *et al.* (1993) enterraron durante meses huesos humanos y de animales en un jardín de Sheffield, en Gran Bretaña, y después estudió la presencia de proteínas mediante ELISA. Estos autores no detectaron Ig G en huesos enterrados más allá de dos meses, llevando a PALMQUIST a sugerir que esta proteína no puede ser detectada en huesos que sobrepasan esa edad. Por el contrario, TUROSS y STATHOPOLOS (1993) demostraron que la Ig G de huesos fósiles podía ser separada por electroforesis e identificada por *Western-blotting*. En esta línea, POINAR (1993) destaca que, en el estudio de biomoléculas antiguas, las conclusiones obtenidas a partir de material no fosilizado no pueden ser comparadas a los especímenes fósiles. Un hueso fósil es un espécimen único, que sólo bajo unas condiciones muy particulares comienza a fosilizarse. Estas condiciones son responsables no sólo de la existencia del fósil, sino probablemente también de la preservación de las biomoléculas (EGLINTON y LOGAN, 1991). Los huesos fósiles de miles o millones de años no son comparables con los huesos recientes enterrados bajo las condiciones existentes en un jardín durante dos meses. Una vez que el animal muere, las proteínas tienden a desaparecer en un periodo corto de tiempo en condiciones normales (jardín, cementerio). Sin embargo, bajo las condiciones singulares que conducen a la fosilización, como ocurre en Venta Micena o Atapuerca, las proteínas probablemente se encuentran "congeladas" dentro de la fase mineral del hueso, permaneciendo así preservadas durante miles o millones de años. La fase mineral del hueso parece ser eficiente en la labor de preservación de proteínas (SMITH *et al.*, 1985; BERMAN, ADDADI y WEINER, 1998) no sólo en la parte interna del hueso, sino también en la parte externa, más expuesta a las condiciones ambientales (Fig. 3).

La inmunoglobulina G de los équidos fósiles, tanto de Venta Micena como de Atapuerca, reaccionó de la manera que esperábamos: Detectamos mayores cantidades de Ig G de caballo que de Ig G humana por reacción cruzada (Figs. 3 y 5). La Ig G de los fósiles VM-1960 y VM-3691 reaccionaron de acuerdo con su asignación de homínidos, mientras que los fósiles CV-1 y CV-2 fueron negativos para la Ig G (Fig. 7). Estudios independientes de los fósiles VM-1960, CV-1 y CV-2 llevados a cabo en la Universidad de Granada y en la Universidad de California para la presencia de albúmina especie-específica dieron resultados concordantes con los resultados para la Ig G: VM-1960 contenía albúmina inmunológicamente más cercana a la albúmina humana reciente, mientras que en CV-1 y CV-2 no fue posible la detección de albúmina (BORJA *et al.*, 1997).

La detección de Ig G mediante inmunoblotting (Fig. 9) demuestra ya no sólo la presencia de proteínas en huesos fósiles, sino también que dichas proteínas se han conservado prácticamente intactas durante al menos 1,6 m.a. Este hallazgo estaría en concordancia con el hecho que mencionábamos anteriormente, y es que las proteínas, bajo las particulares condiciones que conducen a la fosilización, quedan atrapadas en la fase mineral del hueso, conservando, al menos en principio, su estructura. En este sentido, nos proponemos estudiar a continuación la relación existente entre la estructura de la proteína y su funcionalidad, parámetros altamente relacionados en cualquier biomolécula.

Nuestros resultados demuestran que la Ig G se puede preservar en huesos fósiles a lo largo de 1,6 m.a. bajo ciertas circunstancias. De cualquier forma, es necesario seguir investigando. Los fósiles positivos para la Ig G tienen que ser estudiados frente a un número mayor de antisueros anti-Ig G de diferentes especies de mamíferos con objeto de llegar a precisar mejor la clasificación filogenética. El empleo de anticuerpos monoclonales frente a la inmunoglobulina G debe constituir una herramienta importante en el estudio de la preservación de los diferentes epítomos de la molécula de Ig G (BORJA *et al.*, 1997).

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado con la beca PB-1222 de la DGICYT y con la colaboración de La Diputación de Barcelona. Los autores agradecen a J. Gibert del Instituto Paleontológico Dr. M. Crusafont de Sabadell (España) y a B. Martínez, del Museo Paleontológico de Orce, por permitirnos tomar muestras de los fósiles de Venta Micena y Cueva Victoria y por su información paleontológica; E. Aguirre y A. Arribas, del Museo Nacional de Ciencias Naturales, de Madrid, por permitirnos tomar muestras de los fósiles de Atapuerca y por su información paleontológica acerca de los mismos.

## LEYENDAS DE LAS FIGURAS

**FIGURA 1.** *Dot-blotting* cuantitativo mostrando las reacciones de los anticuerpos anti-human Ig G y anti-horse Ig G frente a los extractos en EDTA del fósil homínido VM-3691 (2) y del fósil équido VM-3032 (ù). Las absorbancias obtenidas con los extractos fósiles tanto en la reacción directa como en la reacción cruzada fueron extrapoladas en las curvas de calibración de Ig G humana e Ig G de caballo para determinar la cantidad de proteína en los fósiles. La línea de puntos (---) representa el *background*. La cantidad de Ig G humana detectada en el fósil VM-3691 por reacción directa fue mayor que la cantidad de Ig G de caballo detectada por reacción cruzada. Lo contrario se observó en el caso del fósil VM-3032, donde la cantidad de Ig G de caballo detectada por reacción directa fue claramente superior que aquella debida a reacción cruzada con Ig G humana.

**FIGURA 2.** *Dot-blotting* mostrando por duplicado la reacción del anticuerpo anti-horse Ig G con los extractos en PBS, EDTA y ácido acético (flechas) de los fósiles équidos de Atapuerca. El nombre de cada fósil se encuentra en la parte superior de la correspondiente reacción. En la parte superior de la membrana aparece la reacción del anticuerpo con cantidades decrecientes de Ig G de caballo nativa moderna.

**FIGURA 3.** Cantidades de Ig G humana (barras negras) e Ig G de caballo (barras blancas) detectadas en los extractos en PBS, EDTA y ácido acético de los fósiles équidos de Atapuerca mediante QDB. Las cantidades de Ig G de caballo fueron superiores a las de Ig G humana. Se utilizaron como control los diferentes medios de extracción.

**FIGURA 4.** *Dot-blotting* mostrando por duplicado las reacciones del anticuerpo anti-horse Ig G con los extractos en PBS, EDTA y ácido acético (flechas) de los fósiles équidos de Venta Micena. El nombre de cada fósil se encuentra en la parte superior de la correspondiente reacción. En la parte superior de la membrana aparece la reacción del anticuerpo con cantidades decrecientes de Ig G de caballo nativa moderna.

**FIGURA 5.** Cantidades de Ig G humana (barras negras) e Ig G de caballo (barras blancas) detectadas en los extractos en PBS, EDTA y ácido acético de los fósiles équidos de Venta Micena mediante QDB. Las cantidades de Ig G de caballo fueron superiores a las de Ig G humana. Se utilizaron como control los diferentes medios de extracción.

**FIGURA 6.** *Dot-blotting* mostrando por duplicado las reacciones del anticuerpo anti-human Ig G con los extractos en PBS, EDTA y ácido acético (flechas) de los fósiles homínidos de Venta Micena y Cueva Victoria. El nombre de cada fósil se encuentra en la parte superior de la correspondiente reacción. En la parte superior de la membrana aparece la reacción del anticuerpo con cantidades decrecientes de Ig G humana nativa moderna.

**FIGURA 7.** Cantidades de Ig G humana (barras negras) e Ig G de caballo (barras blancas) detectadas en los extractos en PBS, EDTA y ácido acético de los fósiles homínidos de Venta Micena y Cueva Victoria mediante QDB. Las cantidades de Ig G humana fueron superiores a las de Ig G de caballo. Se utilizaron como control los diferentes medios de extracción.

**FIGURA 8.** Cantidades totales de Ig G (suma de las cantidades detectadas en los extractos EDTA y ácido acético) detectadas en una vértebra de burro de unos 100 años de antigüedad encontrada en Orce, y en los fósiles équidos y homínidos de Atapuerca, Venta Micena y Cueva Victoria. Los círculos abiertos (-) representan la cantidad de Ig G detectada en cada fósil, mientras que los círculos cerrados (2) representan la media y desviación estándar de las cantidades detectadas en los diferentes fósiles de cada lugar.

**FIGURA 9.** *Immunoblotting* que muestra la reacción del anticuerpo anti-horse Ig G con una cantidad conocida de Ig G nativa moderna en comparación con la Ig G del extracto en EDTA del fósil équido VM-3037. Se muestran los pesos moleculares correspondientes a las dos cadenas de la Ig G de caballo nativa.

## BIBLIOGRAFÍA

- AUSTIN JJ, ROSS AJ, SMITH AB, FORTEY RA, THOMAS RH (1997) Problems of reproducibility. Does geologically ancient DNA survive in amber?preserved insects?. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 264:467-474.
- BERMAN A, ADDADI L, WEINER S (1988) Interactions of urchin macromolecules with growing calcite crystals-a study of intracrystalline proteins. *Nature* 331:546-548.
- BORJA C, GARCÍA-PACHECO M, OLIVARES EG, SCHEUENSTUHL G, LOWENSTEIN JM (1997) Immunospecificity of albumin detected in 1.6 million-year-old fossils from Venta Micena in Orce, Granada, Spain. *Am J Phys Anthropol* 103:433-441.
- CANO RJ, POINAR HN, PIENIAZEK NJ, ACRAA, POINAR GO (1993) Amplification and sequencing of DNA from a 120-135 million-year-old weevil. *Nature* 363:536-538.
- CATTANEO C, GELSTHORPE K, PHILLIPS P, SOKOL RJ (1993) Blood residues on stone tools: indoor y outdoor experiments. *World Archaeol* 25:29-43.
- CATTANEO C, GELSTHORPE K, PHILLIPS P, SOKOL RJ (1995) Differential survival of albumin in ancient bone. *J Archaeol Sci* 22:271-276.
- DE JONG EW, WESTBROEK P, WESTBROEK JF, BRUNING JW (1974) Preservation of antigenic properties of macromolecules over 70 Ma. *Nature* 252:63-64.
- EGLINTON G, LOGAN GA (1991) Molecular preservation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 333:315-328.
- FRANC S, MARZIN E, BOUTILLON MM, LAFONT R, LECHÊNE DE LA PORTE P, HERBAGE D (1995) Immunochemical and biochemical analyses of 20000-25000-year old fossil cartilage. *Eur J Biochem* 234:125-131.
- GIBERT J, CAMPILLO D, ARQUÉS JM, OLIVARES EG, BORJAC, LOWENSTEIN J (1998) Hominid status of the Orce cranial fragment reasserted. *J Hum Evol* 34:203-217.
- HÖSS M, DILLING A, CURRANTA, PÄÄBO S (1996) Molecular phylogeny of the extinct ground sloth *Myiodon darwini*. *Proc Natl Acad Sci* 93:181-185.
- KRINGS M, STONE A, SCHMITZ RW, KRAINITZKI H, STONEKING M, PÄÄBO S (1997) Neanderthal DNA?sequences and the origin of modern humans. *Cell* 90:19-30.
- LINDAHLT (1997) Facts and artifacts of ancient DNA. *Cell* 90:1-3.
- LOWENSTEIN JM (1981) Immunological reactions from fossil material. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 292:143-149.
- LOWENSTEIN JM (1983) Fossil proteins and evolutionary time. *Pontif Acad Sci Scrip Var* 50:151-162.
- LOWENSTEIN JM, RYDER OA (1985) Immunological systematics of the extinct quagga (Equidae). *Experientia* 41:1192-1193.
- LOWENSTEIN JM, SARICH VM, RICHARDSON BJ (1981) Albumin systematics of the extinct mammoth and Tasmanian wolf. *Nature* 291:409-411.
- LOWENSTEIN JM, SCHEUENSTUHL G (1991) Immunological methods in molecular Paleontology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 333:375-380.
- PÄÄBO S, HIGUCHI RG, WILSON AC (1989) Ancient DNA and the polymerase chain reaction. The emerging field of molecular archaeology. *J Biol Chem* 264:9709-9712.
- PALMQVIST P (1997) A critical reevaluation of the evidence for the presence of hominids in lower pleistocene times at Venta Micena, Southern Spain. *J Hum Evol* 33:83-89.
- POINAR GO Jr (1993) Reply to Tomas Lindahl: Recovery of antediluvian DNA. *Nature* 365:700.
- POINAR HN, CANO RJ, POINAR GO (1993) DNA from an extinct plant. *Nature* 363:677.
- POINAR HN, HÖSS M, BADA JL, PÄÄBO S (1996) Amino acid racemization and the preservation of ancient DNA. *Science* 272:864-866.
- RAINEY WE, LOWENSTEIN JM, SARICH VM, MAGOR DM (1984) Sirenian molecular systematics including the extinct Steller's sea cow (*Hydrodamalis gigas*). *Naturwissenschaften* 67:343-346



- ROWLEY MJ, RICH PV, RICH TH, MACKAY IR (1986) Immunoreactive collagen in avian and mammalian fossils. *Naturwissenschaften* 73:620-623.
- SHOSHANI J, LOWENSTEIN JM, WALZ DA, GOODMAN M(1985) Proboscidean origins of mastodon and mammoth demonstrated immunologically. *Paleobiology* 11:429-437.
- SMITH AJ, MATTHEWS JB, WILSON C, SEWELL HF (1985) Plasma proteins in human cortical bone: *in vitro* binding studies. *Calcif Tissue Int* 37:208-210.
- SMITH AB, LITTLEWOOD DTJ(1994) Paleontological data and molecular phylogenetic analysis. *Paleobiology* 20:259-273.
- TUROSS N, BEHRENSMEYER AK, EANES ED, FISHER LW, HARE PE (1989) Molecular preservation y crystallographic alterations in a weathering sequence of wildebeest bones. *Applied Geochem* 4:261-270.
- TUROSS N, STATHOPOLOS L (1993) Ancient proteins in fossil bones. *Methods Enzymol* 224:121-129.
- ULRICH MM, PERIZONIUS WR, SPOOR CF, SANDBERG P, VERMEER C (1987) Extraction of osteocalcin from fossil bones and teeth. *Biochem Biophys Res Commun* 149:712-719.
- WILSON AC, CARLSON SS, WHITE TJ (1977) Biochemical evolution. *Annu Rev Biochem* 46:573-639.
- WYCKOFF RWG (1972) The biochemistry of animal fossils. Bristol: *Scientifica*.
- ZIHLMAN AL, LOWENSTEIN JM (1996) ASpanish Olduvai? *Curr Anthropol* 37:695-697.

Tabla 1. Lista de fósiles estudiados en este trabajo.

Fósil	Asignación	Anatomía	Edad (m.a.)	Encontrado en
VM-1960	Homínido	Fragmento de húmero	1,6	Venta Micena, Orce
VM-3691	Homínido	Fragmento de húmero	1,6	Venta Micena, Orce
CV-1	Homínido	Fragmento de húmero	1,4	Cueva Victoria, Murcia
CV-2	Homínido	Fragmento de húmero	1,4	Cueva Victoria, Murcia
VM-3032	Équido	Fragmento de tibia1	1,6	Venta Micena, Orce
VM-3064	Équido	Fragmento de tibia	1,6	Venta Micena, Orce
VM-3037	Équido	Fragmento de tibia	1,6	Venta Micena, Orce
VM-3008	Équido	Metatarso	1,6	Venta Micena, Orce
VM-3016	Équido	Metatarso	1,6	Venta Micena, Orce
AT-83.1	Équido	Fémur derecho	0,12	Atapuerca, Burgos
AT-83.2	Équido	Mandíbula	0,12	Atapuerca, Burgos
AT-85	Équido	Sacro	0,12	Atapuerca, Burgos

ICONOGRAFÍA

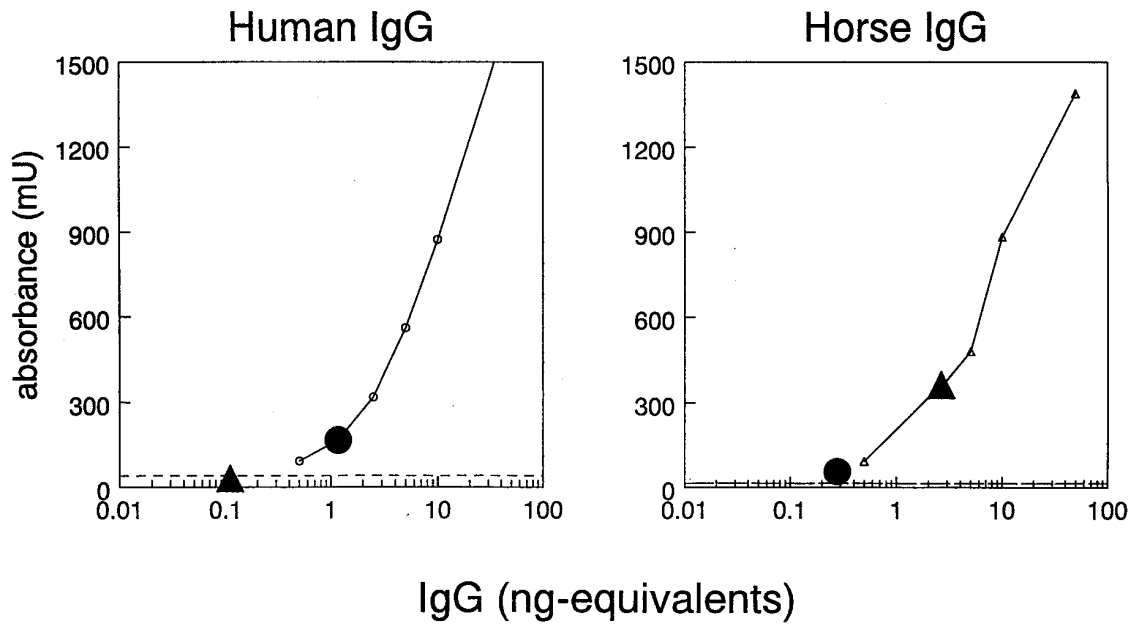


Figura 1

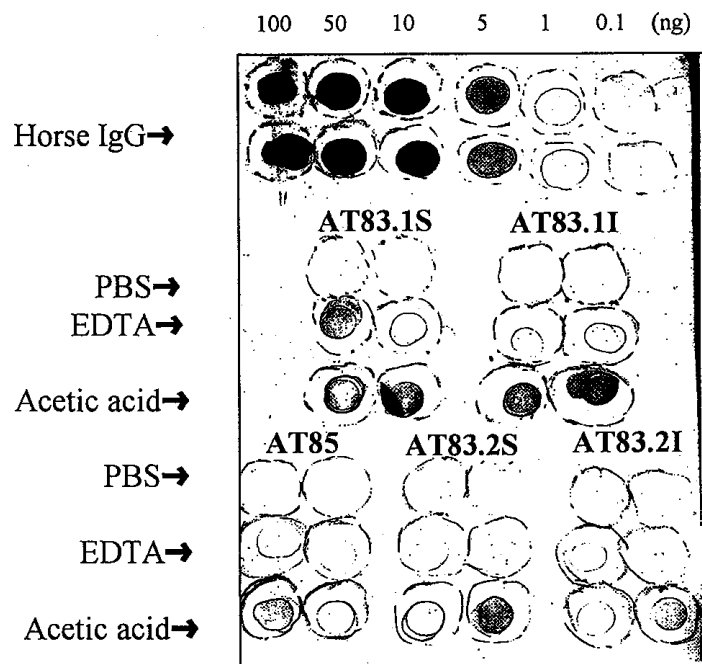


Figura 2

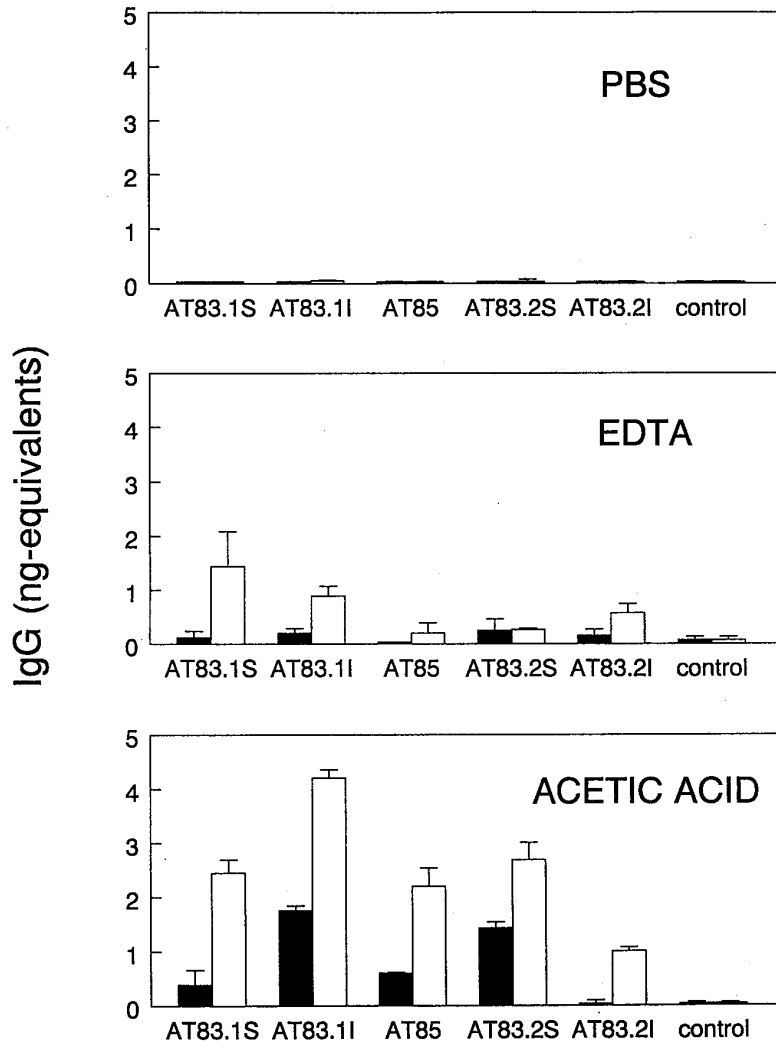


Figura 3

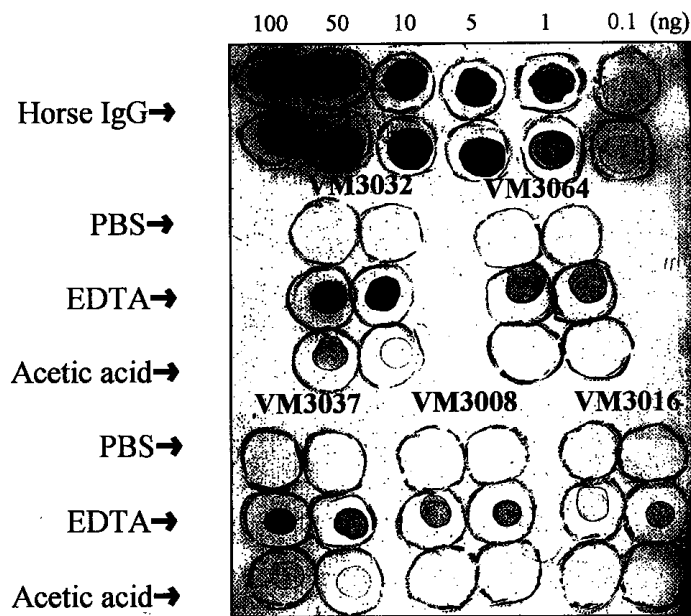


Figura 4

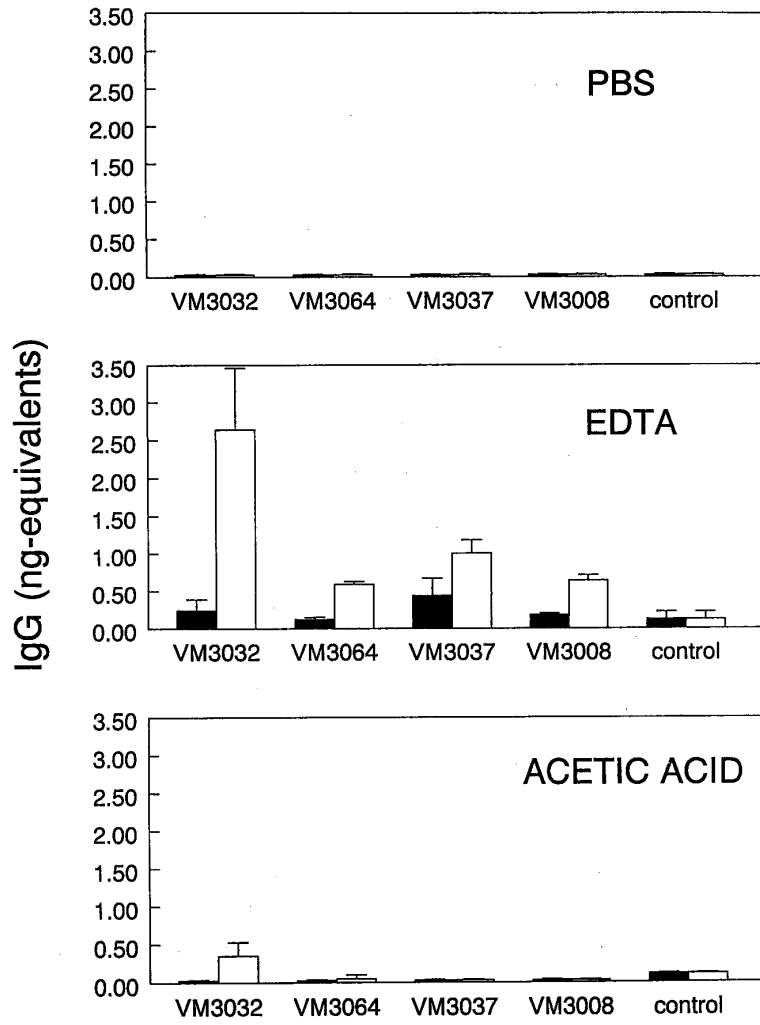


Figura 5

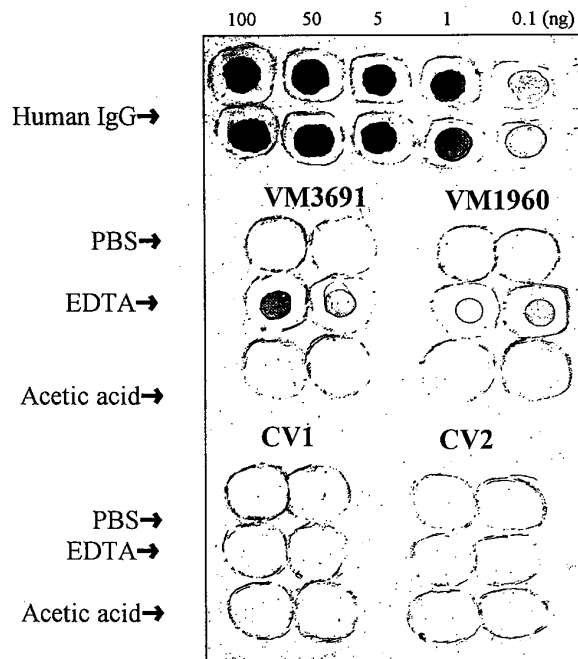


Figura 6

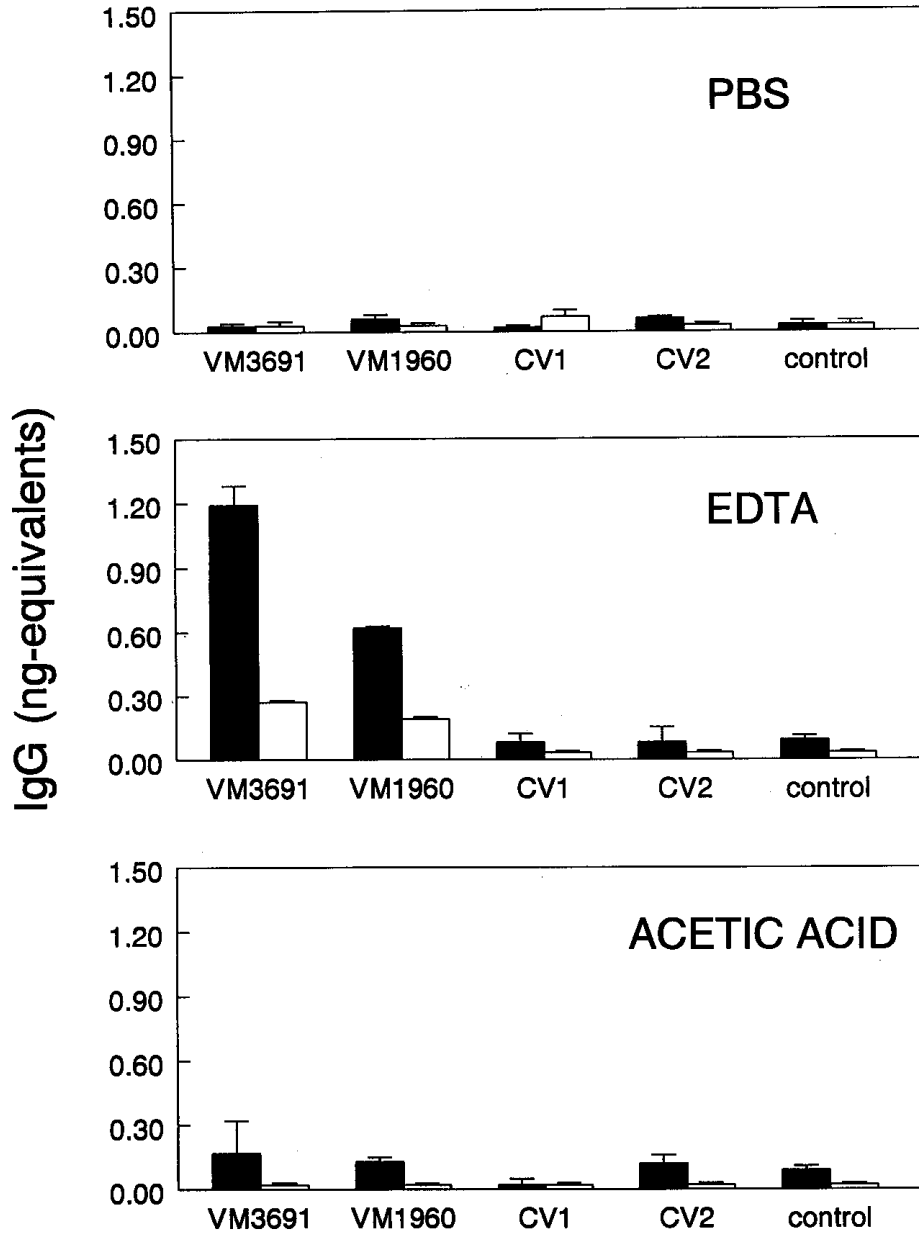
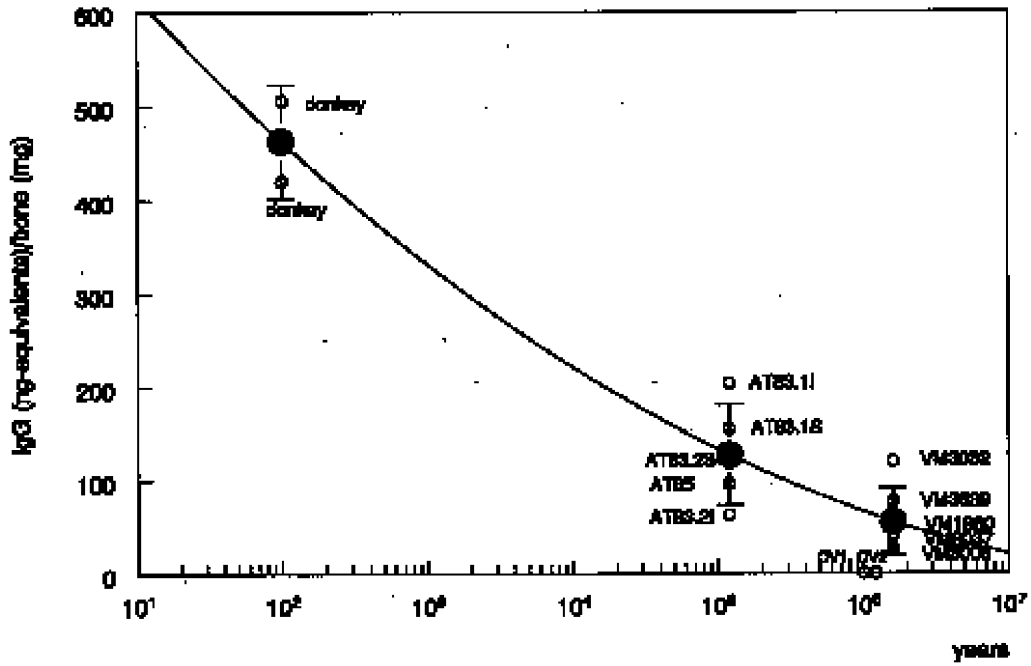


Figura 7



### Ac. Anti-IgG de Caballo

