

## Determinación del origen animal de pergaminos históricos a través de análisis de ADN

Espejo T<sup>1\*</sup>, Alvarez-Cubero MJ<sup>2</sup>, Saiz M<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Gabinete de Conservación de Documento Gráfico, Departamento de Pintura, Facultad de Bellas Artes. Avda. Andalucía s/n, 18014. Universidad de Granada.

<sup>2</sup> Laboratorio de Identificación Genética. Departamento de Medicina Legal y Toxicología. Facultad de Medicina. Universidad de Granada. Avda. Madrid 11, 18071. Granada.

(Autor responsable: [tespejo@ugr.es](mailto:tespejo@ugr.es))

### Introducción

La investigación acerca de los materiales y las técnicas de ejecución empleadas en la manufactura de un documento de archivo resulta imprescindible para su contextualización histórica y cronológica y su ubicación geográfica. Este conocimiento constituye además la base necesaria para el establecimiento de adecuados protocolos de preservación, conservación y restauración.

El estudio del origen animal de pieles y pergaminos mediante análisis de ADN no es un tema nuevo pues ya ha sido experimentado en bienes patrimoniales de carácter histórico [1, 2] y son bien conocidos los trabajos que sobre los Rollos del Mar Muerto hiciera el Prof. Scott R. Woodward en 1995 con el objeto de relacionar entre sí los diferentes fragmentos encontrados [3,4]. Sin embargo, los avances y la aplicación de este método y su inclusión en los protocolos de caracterización del documento gráfico y el material de archivo no están todavía ajustados. La necesidad de una cantidad de muestra excesivamente grande para este tipo de Bien Cultural, así como la alteración de la cadena de ADN procedente del material deteriorado conlleva una problemática que ha condicionado considerablemente los métodos aplicados hasta el momento para la tipificación de la especie animal de procedencia que son identificados, casi exclusivamente, mediante examen visual de los folículos pilosos y su interpretación a partir de la comparación con patrones establecidos [5].



Con motivo de la restauración del Alcorán de Cútar (siglo XIII ca.) (figura 1), conservado en el Archivo Histórico Provincial de Málaga y de los estudios que sobre él se realizaron, se llevó a cabo una completa caracterización tanto del soporte como de las tintas [6].

En el primer caso se procedió siguiendo los métodos tradicionales de observación de los folículos pilosos y, gracias a la colaboración con

el Departamento de Medicina Legal de la Universidad de Granada, se completó también con la caracterización mediante análisis de ADN. Para ello debieron ajustarse tanto los protocolos de extracción de muestra como los de amplificación y secuenciación de la técnica hasta obtener los primeros resultados con éxito que se exponen en este trabajo y que corresponden al análisis de los restos de pelo existentes en el manuscrito como consecuencia de una deficiente depilación durante el proceso de ejecución de este soporte. Actualmente las investigaciones continúan con el desarrollo de una metodología apropiada que nos permita ir reduciendo progresivamente el tamaño de muestra así como la obtención de resultados positivos en muestras degradadas. La validación de este procedimiento se está llevando a cabo sobre otros documentos medievales pertenecientes a diferentes archivos granadinos con el objetivo último de incluir los resultados obtenidos en una base de datos de manuscritos datados que contribuya a ampliar los conocimientos adquiridos sobre los orígenes, manufactura, comercio y distribución del pergamino utilizado como soporte escrito.

## Metodología

El procedimiento para la extracción del ADN depende del tipo de muestra y su calidad [7,8]. En este caso, uno de los principales hándicaps era obtener la máxima cantidad de ADN evitando dañar la muestra. Así, para el estudio del origen animal del pergamino empleado como soporte de escritura en este ejemplar alcoránico, se tomaron muestras tanto de piel como de pelo. Para las muestras de piel se extrajeron pequeños fragmentos de aquellas zonas menos relevantes o más degradadas. El otro tipo de muestra se tomó de partículas microscópicas correspondientes al resto de pelo que había quedado inserto en el folículo piloso tras la depilación de la piel durante la manufactura del pergamino (figura 2); de este modo la acción de toma de muestra

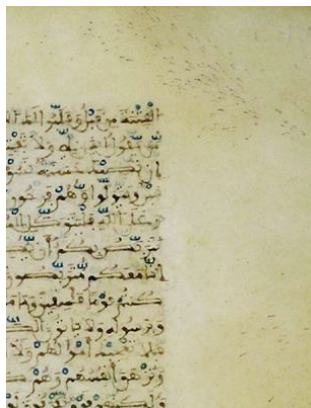


Figura 2. Folio 51v, restos de pelo y su disposición en el folio

no implicó alteración sobre el manuscrito. El estudio se basó en el análisis del ADN mitocondrial, concretamente en el gen del citocromo b (cytb). Se adaptaron los protocolos básicos de extracción orgánica (fenol/cloroformo-alcohol isoamílico) [9] a este tipo de material tan manipulado. Se diseñaron primers escogiendo las principales especies utilizadas tradicionalmente para la elaboración de estos soportes: *Ovis aries*, *Bos taurus*, *Sus scrofa domestica* y *Capra aegagru* [10] ajustándose a su vez a un tamaño de amplicón menos de 200 pares de bases. La secuenciación se llevó a cabo usando ABI PRISM<sup>®</sup> BigDye Terminator v1.1 y se analizó con ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems<sup>®</sup>).

Una vez obtenida la secuencia del material amplificado, se introdujo en BLAST (NCBI), Basic Local Alignment Search Tool [11], una herramienta gratuita online que permite comparar las secuencias problema con una base de datos que contiene todas las especies caracterizadas hasta la fecha.

## Resultados y Discusión

Las limitaciones que conlleva el estudio del patrimonio documental en relación con el tamaño de muestra son conocidas; así mismo las condiciones de degradación en que se encuentra este patrimonio puede conllevar alteraciones en la cadena de ADN que impidan su correcta identificación.

La alteración más común al trabajar con ADN de restos subfósiles y fósiles es la degradación de éste en pequeños fragmentos [12,13]. Para minimizar este problema, se ha de trabajar con ADN mitocondrial ya que los especímenes o muestras de ADN antiguo (fósiles, manuscritos antiguos...) están altamente degradados y no suelen dar buenos resultados al tipar el ADN nuclear. El estudio del ADN mitocondrial se centra en el gen del citocromo b, un pequeño fragmento que es muy útil para la identificación de especies. La secuencia nucleotídica del gen del citocromo b contiene información especie-específica y se emplea tanto en investigaciones filogenéticas como forenses [14].

Posteriormente, se amplifica el ADN mediante la técnica de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para aumentar el número de copias de las regiones de interés. Uno de los grandes problemas al trabajar con ADN antiguo ocurre durante el proceso de amplificación ya que la calidad de ADN no está tan buena como en otro tipo de muestras. Las principales causas de la pérdida de calidad en muestras de ADN antiguo son la fragmentación del ADN y modificación nucleotídica, entre otros [15].

Una vez contrastada con la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI), Las secuencias obtenidas a partir de los pelos del pergamino produjeron una homología del 100% con la especie *Bos taurus* (vaca) (figuras 3 y 4). Estos resultados nos permitieron caracterizar el tejido y determinar la especie con la que se había producido el soporte de esta edición del Corán.

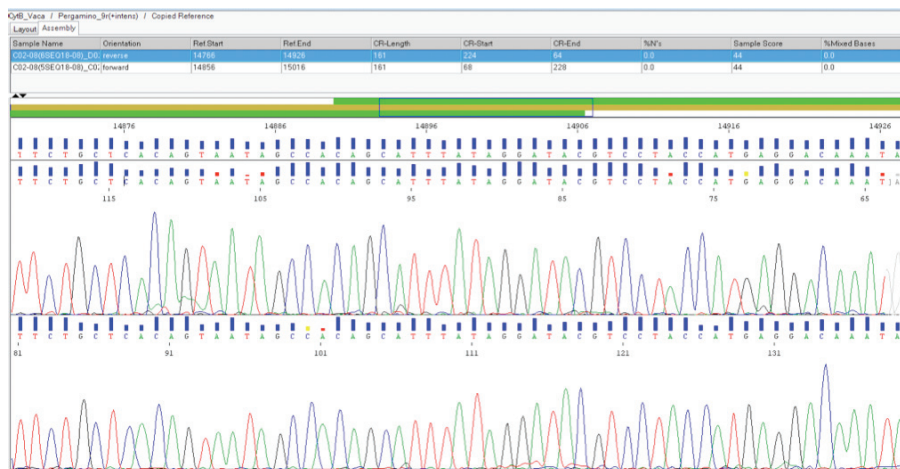


Figura 3. Folio 9r, cromatograma con la secuencia de un fragmento del gen Cyt b en una muestra del pergamino.

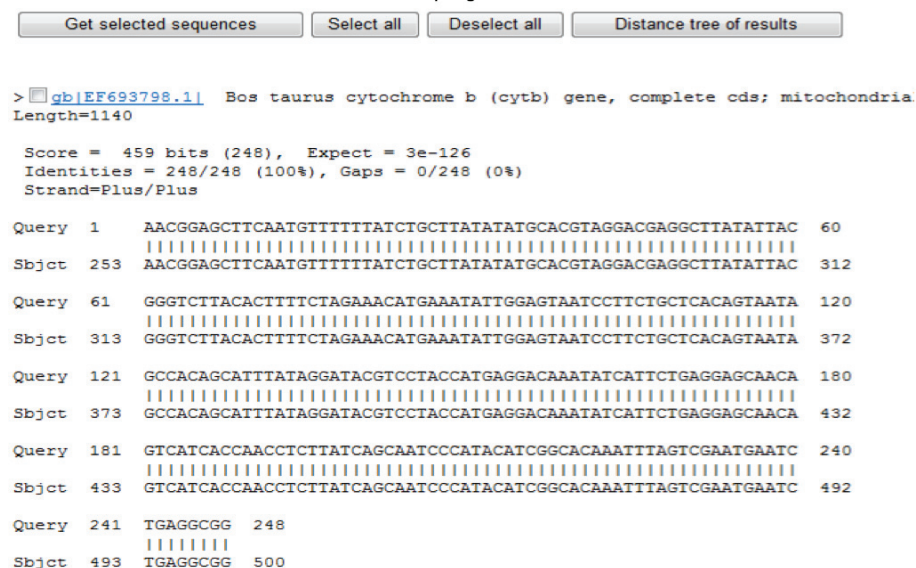


Figura 4. Folio 9r, secuencia contrastada en base de datos BLAST donde se observa la homología del 100% con la especie Bos taurus (vaca).

### Conclusiones

Este trabajo abre un nuevo campo de investigación sobre la aplicación de metodologías de análisis de ADN en materiales históricos y constituye el punto de partida para la puesta a punto de una metodología de análisis específica que permita la determinación de la especie animal de procedencia en pieles y pergaminos empleados en documentos gráficos y de archivo a partir del empleo de micromuestras. Con ello, se abren nuevas posibilidades en la investigación del documento gráfico y bibliográfico al permitir su identificación disminuyendo el grado de biodegradación de la muestra [16].

Con todo, este trabajo supone un avance relevante en el procedimiento de análisis de ADN-mitocondrial en pergaminos medievales utilizados como soporte de escritura pues supone una nueva posibilidad de estudio y una reducción considerable en el tamaño de la muestra sustraída. Este, junto con otros estudios paralelos en ejecución complementarios están siendo determinantes para la comprensión del modo de confeccionar y preparar el pergamino para ser utilizado como soporte de manuscritos árabes de al-Ándalus.

### Referencias

[1] Poulakakis N., Tselikas, A., Bitsakis, I., Mylonas, M., Lymberakis, P. "Ancient DNA and the genetic signature of ancient Greek manuscripts", *Journal of Archaeological Science*. 34 (2007), 675-680.

- [2] Amory, S., Keyser, C., Crubézy, E., Ludes, B., "STR typing of ancient DNA extracted from hair shafts of Siberian mummies", *Forensic Sci.Int.* 166 (2007) 218-229.
- [3] Woodward, S. R., "Putting the pieces together: DNA and the Dead Sea Scrolls", Neal A. Maxcell Institute, Brigham Young University, [En línea], Disponible en: <http://maxwellinstitute.byu.edu/publications/books/?bookid=12&chapid=55> [Consulta 03/08/2011]
- [4] [James C. VanderKam](#), J.C., Flint, P., "Discoveries, dating, archeology, and new methods" en *Meaning of the Dead Sea Scrolls*, T&T Clark International, New York (2005) 55-60
- [5] Larsen R., Latest Assessment methods, European research centre for book and paper conservation restoration, course 16th-20th may 2011, Horn, Austria.
- [6] Espejo T., Arias, J.P., "El Corán de Cútar. Una joya del patrimonio escrito andalusí" en *El Corán de Cútar, Málaga. Estudio introductorio*. Junta de Andalucía: Consejería de Obras Públicas y Transportes, Consejería de Cultura, Fundación tres Culturas del Mediterráneo. Sevilla, (2009). 69-130.
- [7] McNevin D., Wilson-Wilde L., Robertson J., Kyd J., Lennard C. "Short tandem repeat (STR) genotyping of keratinised hair Part 2. An optimised genomic DNA extraction procedure reveals donor dependence of STR profiles", *Forensic Sci.Int.* 153 (2005) 247-259.
- [8] Amory S., Keyser C., Crubézy E., Ludes B. "STR typing of ancient DNA extracted from hair shafts of Siberian mummies", *Forensic Sci.Int.* 166 (2007) 218-229.
- [9] Wilson MR, Polansky D, Butler J, DiZinno JA, Ropogle J, Budowle B. Extraction, PCR amplification, and sequencing of mitochondrial DNA from human hair shafts. *BioTechniques* 1995;14:992-9.
- [10] Ramadan HAI, El-Hefnawi MM. Phylogenetic analysis and comparison between cow and buffalo (including Egyptian buffaloes) mitochondrial displacement-loop regions. *Mitochondrial*
- [11] Zhang Z., Schwartz S., Wagner L., & Miller W. "A greedy algorithm for aligning DNA sequences", *J Comput Biol*, 7(2000) 203-14
- [12] Pääbo S., "Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989, 86,1939 –1943.
- [13] Hofreiter M., Serre D., Poinar H., Kuch M., Pääbo S., "Ancient DNA", *Nat. Rev.Genet.*, 2001, 2, 353 -59.
- [14] Russo C., Takezaki N., Nei M., "Efficiencies of different genes and tree-building methods in recovering a known vertebrate phylogeny", *Mol. Bio.l Evol.*, 1996, 13, 525-536.
- [15] Pääbo S., Poinar H., Serre D., Jaenicke-Després V., Hebler J., Rohland N., Duch M., Krause J., Vigilant L., Hofreiter M., "Genetic analyses from ancient DNA", *Annu. Rev. Genet.* 2004, 38, 645 –79.
- [16] Comey C.T., Koons B.W., Presley K.W., Smerick J.B., Sobieralski C.A., Stanley D.M., et al. "DNA Extraction Strategies for Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis", *JFSCA*. 39 (1994) 1264-1269.

Este trabajo se ha desarrollado dentro del marco de investigación del proyecto *Caracterización de los materiales de manuscritos árabes de la Península Ibérica para la elaboración de un corpus documental* (P08-HUM 04188, Proyectos de Investigación de Excelencia, convocatoria 2008) y de acuerdo con los protocolos de descripción, análisis de materiales y determinación de los procesos de ejecución desarrollados en el proyecto *Aplicación de tecnologías de análisis específicas para el conocimiento de materiales y la mejora de los procesos de conservación de los manuscritos árabes de la Península Ibérica (ss.X-XVII)* (MAT2008-02008MAT, Plan nacional I+D+I 2008-2011).