

| | | | | | |
|----------------------------------|------|------|---------------|------|----------------|
| MUNIBE (Antropología-Arkeología) | nº50 | 3-14 | SAN SEBASTIAN | 1998 | ISSN 1132-2217 |
|----------------------------------|------|------|---------------|------|----------------|

Aceptado: 1997-03-23

Genética y Arqueología: Análisis molecular de ADN procedente de restos esqueléticos

Genetics and archaeology: analysis of DNA from skeletal remains

PALABRAS CLAVE: ADN antiguo, ADN mitocondrial, Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), Metodología, Polimorfismos de Restricción

KEY WORDS: Ancient DNA, Mitochondrial DNA, Polymerase Chain Reaction (PCR), Methodology, Restriction Polymorphisms

N. IZAGIRRE*

L.M. DURAN*

C. DE LA RUA*

RESUMEN

La recuperación de moléculas de ADN mitocondrial (ADNmt) de muestras esqueléticas de diversa antigüedad, permite estudiar la variabilidad genética de los grupos humanos del pasado. El análisis del ADNmt en tejido antiguo presenta una ventaja fundamental frente al nuclear, debido a su alto número de copias por célula.

Los principales problemas metodológicos descritos en este tipo de análisis, han podido resolverse en aquellos casos en que las muestras presentaban buenas condiciones de preservación. Estos han sido fundamentalmente: 1.- inhibición de la amplificación, 2.- autenticación de los resultados y 3.- detección y eliminación de la contaminación.

La variabilidad en el éxito de la amplificación entre individuos de un mismo yacimiento, indica que las condiciones individuales de cada inhumación son más importantes que la antigüedad. Por otro lado, las piezas dentarias han demostrado ser el material más adecuado para el estudio del ADNmt antiguo.

La interpretación de los datos a nivel poblacional sólo es posible en aquellos yacimientos que presentan un amplio número de individuos, dado el relativamente bajo rendimiento de la metodología.

SUMMARY

The recovery of mitochondrial DNA (mtDNA) from ancient skeletal remains allows the study of the genetic variability of extinct human populations. The analysis of mitochondrial DNA molecules in ancient tissues offers a major advantage comparing to the nuclear ones, as there is a high number of copies per cell.

The main methodological problems described in this kind of analysis were solved in those samples that showed good preservation conditions. Those may have been basically: 1.- inhibitor of the amplification, 2.- authenticity of the results and 3.- detection and overcoming of contamination.

The variability in the amplification success among the individuals of the same site, indicates that the individual conditions of each inhumation are more important than the antiquity. On the other hand, teeth have proved to be more suitable for the study of ancient mtDNA.

The interpretation of the data from a populational point of view can only be made in those sites that offer a wide number of specimens, due to the relatively low methodological efficiency.

LABURPENA

Aintzinako eskeletu laginetatik ADN mitokondrialaren (ADNmt) molekulen berreskurapenak, iraganeko giza taldeen aldakortasun genetikoa ikasteko aukera eskeintzen digu. Aintzinako ehunen analisi molekularra burutzeko, ADNmt-ak oinarrizko abantaila azaltzen du ADN nuklearrarekin konparatuz: zelula bakoitzeko oso kopuru altuan agertzen da.

Mota honetako lanetan deskribatutako arazo metodologiko nagusiak, hala nola: 1.- amplifikazioaren inhibizioa, 2.- emaitzen benekotasun-frogak eta 3.- kutsaduraren detekzioa eta ezabatzea, preserbazio baldintza onak adierazten dituzten laginetan konpondu ahal izan dira.

Anplifikazioaren arrakastaren aldakortasunak, aztarnategi bereko gizabanakoen artean ehorte bakoitzaren baldintza indibidualak aintzintasuna baino garrantzitsuagoak direla adierazten du. Bestalde, haginak aintzinako ADNmt-aren analisisirako lagin-mota egokienak bezala azalduzandira.

Emaitza hauen interpretazioa, populazio mailako ikuspuntu batetatik abiatuta, soilik egin daiteke gizabanako oso kopuru handia daukaten aztarnategietan, zentzu honetan metodologiaren atarramendu erlatiboki baxuak kopuru hau gutxituko luke.

*Zientzi Fakultatea. Biologi Animala eta Genetika Saila. U.P.V./E.H.U. Posta Kutxa 644. 48080 Bilbo. E-mail: gppizam@lg.ehu.es
Tel. 94 601 25 44. Fax 94 464 85 00

I. INTRODUCCIÓN

La evolución molecular es un proceso histórico a través del cual los genes acumulan cambios debido tanto a acontecimientos estocásticos (deriva genética, mutación,...) como a procesos selectivos. Hasta ahora, la mayoría de las evidencias disponibles para tratar de reconstruir estos procesos históricos eran indirectas; bien se planteaban exclusivamente a partir del análisis de las características morfológicas del material fósil, bien se basaban en el análisis genético de los polimorfismos en población actual, a partir de los cuales se deducía la historia evolutiva.

La aplicación de la variabilidad genética actual para la comprensión de las relaciones filogenéticas más ancestrales, posee algunas ventajas respecto a los estudios osteométricos. Sin embargo, no siempre se puede correlacionar la información obtenida de los datos genéticos, con cambios culturales y evidencias arqueológicas y antropológicas de índole diversa. La variabilidad detectada se debe extrapolar hacia el pasado para establecer filogenias o inferir patrones de migración, con los errores que esto pueda conllevar y que podrían ser tanto mayores cuanto más atrás en el tiempo se intenta retroceder (CAVALLI-SFORZA & MINCH, 1997).

La posibilidad de recuperar ADN de especies animales extintas (HIGUCHI *et al.*, 1984; PÄÄBO, 1985a), permitió obtener evidencias directas de algunas características genéticas de las poblaciones pasadas. Las dificultades iniciales de las técnicas empleadas con el ADN antiguo (ADNa), se pudieron superar gracias al desarrollo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (SAIKI *et al.*, 1985), técnica que puede ser utilizada con restos biológicos que contienen muy poco ADN o en casos en que esté degradado, como en las muestras de procedencia arqueológica (HAGELBERG *et al.*, 1989; HÄNNI *et al.*, 1990).

El análisis de este tipo de muestras (óseas y dentarias) ofrece la posibilidad de realizar estudios poblacionales, puesto que éstas son mucho más abundantes en el registro arqueológico que el tejido blando (momificado) y, generalmente, están mejor preservadas (STONE & STONEKING, 1993; HAGELBERG & CLEGG, 1993). La mayor parte de la investigación con ADNa se ha centrado en el análisis del ADNmt, ya que éste tiene una serie de características que hacen de él un marcador genético ideal, tales como: pequeño tamaño (16 kilobases (Kb)), rápida tasa de evolución y modo de herencia materna. Además, el genoma mitocondrial humano completo está secuenciado (ANDERSON *et al.*, 1981) y el alto número de mitocondrias por célula en los mamíferos facilita su supervivencia y recuperación.

Los primeros estudios de ADNmt en restos antiguos estaban encaminados a la secuenciación de

fragmentos de aproximadamente 400 pb de longitud del segmento hipervariable de la región control. Ésto supone la amplificación de varios fragmentos solapantes de no más de un centenar de pares de bases (pb) de longitud, hasta completar un segmento de 400 pb. Este enfoque analítico, aunque presenta algunas dificultades, puede llevarse a cabo en muestras individuales, siendo menos factible en el caso de estudios poblacionales, donde el tamaño muestral debe ser suficientemente grande para efectuar un análisis estadístico. Las principales dificultades que se han encontrado en la secuenciación del ADNmt de restos arqueológicos son: a.- degradación del material genético, que impide obtener productos de amplificación del tamaño requerido, b.- encontrar zonas estables en la región hipervariable del ADNmt que permitan la unión de los primers (cebadores) con cierta facilidad y c.- la necesidad de realizar múltiples extracciones independientes, a fin de corroborar la autenticidad de los resultados obtenidos.

Uno de los trabajos más destacables y fiables realizado es la secuenciación de un fragmento de 378 pb de longitud de la región control del genoma mitocondrial de un espécimen neandertal (neandertal tipo hallado en 1.845 en Dusseldorf) (KRINGS *et al.*, 1997). Los resultados obtenidos indican que la secuencia difiere tanto de la del hombre como de la del chimpancé, apoyando de este modo un origen africano reciente (hace 100.000 años) del hombre moderno.

Recientemente se ha descrito una nueva metodología para el estudio del ADNmt, de una mayor sencillez metodológica comparada con la secuenciación, lo que abre nuevas perspectivas en el análisis del ADNa a nivel poblacional (TORRONI *et al.*, 1992, 1993, 1994a, 1996).

Este análisis consiste en la amplificación selectiva de todo el genoma mitocondrial en 9 fragmentos solapantes (1.500-3.000 pb de longitud TORRONI *et al.*, 1992). Cada fragmento se digiere independientemente con 14 enzimas de restricción (AluI, Avall, BamH I, Dde I, Hae II, Hae III, Hha I, Hinc II, Hinf I, Hpa I, Msp I, Mbo I, Rsa I y Taq I), cuyos fragmentos se resuelven mediante electroforesis. De forma que se obtienen mapas de restricción (patrón de ausencia/presencia de cada uno de los enzimas en cada uno de los 9 fragmentos amplificados). Los mapas de restricción de este conjunto de segmentos, representan los haplotipos individuales. Estos haplotipos se pueden agrupar en diferentes clases que comparten las mismas mutaciones puntuales, las cuales son estables y antiguos en la región codificante del ADNmt (TORRONI *et al.*, 1996). Estos agrupamientos se denominan haplogrupos, los cuales resultan específicos de las distintas variantes geográficas de la especie humana (caucasoides, africanos, asiáticos), por

lo que ofrecen una mayor facilidad para inferir relaciones evolutivas entre las poblaciones.

En este sentido, no es necesario estudiar toda la secuencia del ADNmt, sino unas cuantas mutaciones con las que definir correctamente los haplogrupos (TORRONI *et al.*, 1994a, 1996). Mediante la amplificación via PCR y análisis enzimático de 7 de estas mutaciones puntuales (Tabla 1), se pueden definir 9 haplogrupos en los grupos caucasoides actuales, los cuales comprenden el 99% de la variabilidad del genoma mitocondrial (TORRONI *et al.* 1996). Su aplicación al estudio del ADN puede ser una gran ventaja, puesto que el análisis de estas mutaciones en muestras de ADN muy deteriorado se puede realizar amplificando fragmentos de unos 100 pb de longitud.

| <i>Nla III</i> | <i>AluI</i> | <i>Ava II</i> | <i>Hae III</i> | <i>Hae II</i> | <i>Hinf I</i> | <i>BstNI</i> | |
|----------------|-------------|---------------|----------------|---------------|---------------|--------------|--------------|
| 4577 | 7025 | 8249 | 8994 | 9052 | 12308 | 13704 | |
| V(-) | H(-) | I(+) | W(-) | K(-) | U(+) | J(-) | Haplogrupo |
| + | - | - | + | + | - | + | H |
| + | + | + | + | + | - | + | I |
| + | + | - | + | + | - | - | J |
| + | + | - | + | - | + | + | K |
| + | + | - | + | + | - | + | T |
| + | + | - | + | + | + | + | U |
| - | + | - | + | + | - | + | V |
| + | + | + | - | + | - | + | W |
| + | + | - | + | + | - | + | X |
| + | + | - | + | + | - | + | OTROS |

Tabla 1. Lugares polimórficos específicos para cada haplogrupo. Perfil de ausencia (-)/presencia (+) de corte de los diferentes sistemas que definen cada haplogrupo (TORRONI *et al.*, 1996).

Este nuevo planteamiento, de mayor sencillez metodológica y menor tiempo de análisis, evita la necesidad de secuenciación (fase más limitante del estudio del ADN) y facilita la realización de estudios poblacionales (STONE & STONEKING, 1993; LALUEZA, 1996; MERRIWETHER *et al.*, 1994; PARR *et al.*, 1996; O'ROURKE *et al.*, 1996).

Hasta el presente, los escasos datos existentes en la bibliografía de estos polimorfismos en muestras antiguas, corresponden a poblaciones de origen asiático, ya que su variabilidad se restringe a 4 haplogrupos, definidos por 4 mutaciones (STONE & STONEKING, 1993; MERRIWETHER *et al.*, 1994; LALUEZA, 1996; PARR *et al.*, 1996; O'ROURKE *et al.*, 1996). Ello, resulta metodológicamente mucho más sencillo de analizar que en el caso de las poblaciones caucasoides, las cuales vienen definidas por 9 haplogrupos y un número mucho mayor de mutaciones (TORRONI *et al.*, 1994a, 1996). El análisis planteado en este trabajo, es el primero que conocemos, que aborda el estudio de poblaciones caucasoides antiguas mediante enzimas de restricción.

II. METODOLOGÍA: ANÁLISIS MOLECULAR DE ADNmt DE TEJIDO ANTIGUO

Si bien los primeros trabajos realizados con ADN se centraron en la recuperación de ADN de tejido blando (tejido momificado y tejido de especies animales preservados en museos) (HIGUCHI *et al.*, 1984; PÄÄBO, 1985a, b, 1986; HIGUCHI & WILSON, 1984; ROGAN & SALVO, 1990a), pronto se descubrió la potencialidad que ofrecían los restos óseos y dentarios como posibles fuentes de ADN (HAGELBERG *et al.*, 1989; HÄNNI *et al.*, 1990). En este sentido, THUESEN & ENGBERG (1990) observaron que la preservación del ADN podía ser mejor en este último tipo de restos, seguramente debido a la unión que se establece entre las moléculas de ADN y los cristales de hidroxiapatita presentes tanto en el hueso como en el diente. Esta unión, protegería al ADN de los procesos de degradación.

Por otro lado, la valoración que hemos realizado del rendimiento durante la amplificación de ADN, así como los resultados obtenidos por otros autores (ZIERDT *et al.*, 1996; LALUEZA, 1996), indican que los extractos del ADN recuperados de piezas dentarias son más eficientes en cuanto a la cantidad de producto de amplificación obtenido, así como en el número de muestras amplificadas.

Sin embargo, en la práctica nos encontramos con el hecho de que no siempre es posible elegir el material de estudio. Cuando se dispone de material abundante, el ADN se recuperará a partir de las piezas dentarias. No es necesario destruir toda la pieza, ya que el ADN recuperado de la raíz es suficiente para llevar a cabo los análisis moleculares, quedando la corona intacta. En el caso de disponer solamente de restos óseos, se utilizará una pequeña cuña de aproximadamente 1 cm³, quedando el resto del hueso intacto.

Para el presente trabajo hemos utilizado las colecciones esqueléticas de San Juan ante Portam Latinam (SJAPL) (ETXEBERRIA & VEGAS, 1988) y de Longar (ARMENDARIZ & IRIGARAI, 1995), en la que se han podido utilizar diversos huesos del mismo individuo, así como muestras dentarias y óseas en paralelo. También se han analizado restos arqueológicos de época histórica y actual, de diversa procedencia y antigüedad (desde el s. XV al presente).

II.1. Protocolos de biología molecular empleados para el análisis del ADNmt antiguo

Obtención de las muestras: Se selecciona una pieza ósea aparentemente bien conservada, de la cual se desprende un fragmento de unos 2 cm² con ayuda de una sierra de marquetería. Las superficies externas de la pieza ósea se limpian por abrasión de posibles ADN humanos actuales contaminantes me-

dianete una arenadora, que usa un chorro de arena o partículas de metal lanzadas a presión (HAGELBERG, 1992).

La limpieza de las piezas dentarias se realiza mediante ácidos. Los dientes se lavan en primer lugar en una solución de alto poder depurinizante (25%ác. acético-15% ác. clorhídrico), la cual inactiva el ADN superficial, tras lo cual se sumergen en una solución de etanol al 70% y H₂O destilada estéril. Finalmente, los dientes se irradian con luz U.V. de 254 nm de longitud de onda, la cual induce uniones covalentes entre las bases de timina, impidiendo que estas cadenas se puedan amplificar (Fox *et al.*, 1991).

Una vez limpiadas, las muestras se pulverizan mediante un molino de impactación electromagnética (Freezer Mill, Spex Industries Inc., Edison, N.J.), refrigerado con N₂ líquido. La muestra pulverizada se decanta en un tubo estéril de plástico, debidamente etiquetado, donde se almacena a -20°C hasta el momento que se proceda a su extracción.

Extracción del ADN: En la fase de preservación de los tejidos antiguos ocurren procesos bioquímicos y fisicoquímicos individuales, que implican que el estado de preservación de las moléculas orgánicas sea diferente en cada espécimen. Por tanto, los métodos de extracción y purificación de ADN variarán dependiendo de las cualidades específicas de la fuente del material.

Tras probar diversos métodos de extracción, hemos comprobado que la técnica basada en la *extracción con fenol-cloroformo* es la más adecuada.

El hueso pulverizado se lava varias veces con 0,5 M EDTA (pH 8,0-8,5), ya que de este modo las células del hueso quedan accesibles a la solución de lisis y además se va eliminando la coloración marrón que adquiere el sobrenadante, la cual está estrechamente relacionada con el poder de inhibición de los extractos de ADN (HAGELBERG & CLEGG, 1991).

Las muestras lavadas se incuban con agitación toda una noche a 37°C en 10 ml de tampón de lisis (0,5 EDTA pH 8,0-8,5; 0,5% SDS; 0,05 M Tris-HCl pH 8,0 y 0,01 mg/ml Proteinasa K). Después, se recoge el sobrenadante tras centrifugación, y en él se procede a la extracción del ADN con fenol-cloroformo y cloroformo. El extracto de ADN se desaliniza y concentra hasta 300 µl en un Centricón-30 (Amicon).

Las extracciones se comprueban mediante migración electroforética, utilizando un 10% del extracto, en un minigel de agarosa al 1%. El ADN se visualiza por luz U.V. de 320 nm de longitud de onda tras tinción con BrEt (Bromuro de Etidio); el tamaño del ADN extraído se estima por comparación con un marcador de tamaño molecular.

Amplificación: Se han diseñado 11 pares de primers o cebadores que flanquean una región adyacen-

te a las mutaciones puntuales que definen los haplogrupos. Esta región conviene que sea inferior a 140 pb de longitud, a fin de facilitar la amplificación exponencial de estas secuencias mediante la PCR. Los parámetros de amplificación óptimos que hemos establecido para cada sistema analizado, se muestran en la Tabla 2.

Los productos de amplificación se comprueban mediante migración electroforética de geles de poliacrilamida al 12% y tinción con plata. Se debe comprobar no sólo las muestras que han amplificado positivamente, sino que el blanco de la extracción y el control negativo de la PCR no tengan producto de amplificado.

Digestión enzimática: Se han amplificado 11 fragmentos del genoma mitocondrial, en los que se observará la mutación de una base mediante análisis de fragmentos de restricción. La característica de estos sistemas consiste en que las posiciones polimórficas están comprendidas dentro de la secuencia de reconocimiento de una enzima de restricción, de modo que la mutación cambiará el patrón de corte de dicha enzima.

Los productos amplificados se digieren con su correspondiente enzima de restricción. La ausencia/presencia de corte también se comprueba en un minigel vertical de poliacrilamida al 12%, mediante tinción con plata.

II.2. Consideraciones generales sobre la manipulación de restos arqueológicos en biología molecular: criterios de autenticidad

El trabajo diario con ADN de tejido antiguo requiere seguir una estricta disciplina para evitar la contaminación de las muestras con ADN moderno.

Espacio de trabajo: Las reacciones de extracción del ADN de tejido antiguo se deben llevar a cabo en un laboratorio libre de ADN genómico moderno. Asimismo, es conveniente separar físicamente el área de trabajo pre- y post-PCR (HAGELBERG, 1994; YAP *et al.*, 1992), llevando a cabo cada uno de los procesos en habitaciones diferentes; de este modo se corre un menor riesgo de contaminación con los amplificados creados en experimentos previos.

El lugar de trabajo y el aparataje empleado se deben limpiar con lejía y alcohol frecuentemente (PRINCE & ANDRUS, 1992) e irradiar con luz U.V. de corta longitud de onda (Fox *et al.*, 1991), antes de cada extracción, a fin de neutralizar las secuencias de ADN, que se puedan encontrar adheridas en las superficies del laboratorio y aparataje o en forma de aerosoles en el aire. Esta radiación a baja longitud de onda, se consigue con lámparas U.V. antifúngicas comerciales, que se colocarán en el laboratorio para activarlas durante la noche.

i. Componentes de la reacción de amplificación

| CONCENTRACIONES FINALES | | | | | | | | |
|-------------------------|---------------|----------------------------|---------------------|----------------|------------------|------------------|----------------|---------------|
| | Taq 5 U/μL | MgCl ₂ 25 mM | dNTP 2,5 mM c.u. | BSA 1 mg/ml | Primer-1 10μM | Primer-2 10μM | ADN diluido | Buffer 10X |
| 7025 Alu I | 1,15 | 2 | 200 | 20 | 0,4 | 0,4 | 5 | 1X |
| 8249 Ava II | 1,15 | 2 | 200 | 20 | 0,4 | 0,4 | 5 | 1x |
| 13704 BstN I | 1,15 | 2 | 200 | 20 | 0,3 | 0,3 | 5 | 1x |
| 9052 Hae II | 1,15 | 2 | 200 | 20 | 0,4 | 0,4 | 5 | 1x |
| 8994 Hae III | 1,15 | 2 | 200 | 20 | 0,4 | 0,4 | 5 | 1x |
| 12308 Hinf I | 1,15 | 2 | 200 | 20 | 0,3 | 0,3 | 5 | 1x |
| 4577 Nla III | 1,15 | 2 | 200 | 20 | 0,4 | 0,4 | 5 | 1x |

ii. Parámetros de la amplificación: temperaturas, tiempos y ciclos

| | | | | | | | |
|-------------------|----------|---------------------|----------|---------------------|----------|---------------------|----------|
| 7025 Alu I | | 8249 Ava II | | 9052 Hae II | | 12308 Hinf I | |
| 94°C-5m | 94°C-15s | 94°C-5m | 94°C-15s | 94°C-5m | 94°C-15s | 94°C-5m | 94°C-15s |
| | 57°C-5s | | 59°C-5s | | 51°C-5s | | 55°C-5s |
| | 72°C-10s | | 72°C-10s | | 72°C-10s | | 72°C-10s |
| | x20 | | x40 | | x40 | | x40 |
| | 94°C-15s | | 72°C-5m | | 72°C-5m | | 72°C-5m |
| | 58°C-5s | | | | | | |
| | 72°C-10s | | | | | | |
| | x20 | | | | | | |
| | 72°C-5m | | | | | | |
| | | 13704 BstN I | | 8994 Hae III | | 4577 Nla III | |
| | | 94°C-5m | 94°C-15s | 94°C-5m | 94°C-15s | 94°C-5m | 94°C-15s |
| | | | 64°C-5s | | 65°C-5s | | 55°C-5s |
| | | | 72°C-10s | | 72°C-10s | | 72°C-10s |
| | | | x40 | | x40 | | x40 |

Tabla 2. Concentraciones finales de los diferentes componentes de la mezcla de reacción y los parámetros de la amplificación de los sistemas analizados mediante digestión enzimática

Material de laboratorio: Todo el material de laboratorio y equipamiento que se vaya a necesitar, estará exclusivamente dedicado al trabajo con ADN. El material fungible debe ser desechable y ya esterilizado previamente, siempre que sea posible; en caso contrario se autoclavará y posteriormente se irradiará con luz U.V. de 254 nm de longitud de onda en un cross-linker (ULTRALUM) (Fox *et al.*, 1991).

Durante la fase de extracción y preparación de las reacciones de amplificación, resulta aconsejable utilizar puntas de pipeta con membrana (Finntip Filter, Labsystems), para así evitar la contaminación cruzada con ADNs de experimentos previos.

Por otra parte, resulta aconsejable no intercambiar la bata del laboratorio que se utiliza durante la fase de extracción con la que se utiliza cuando se analizan los amplificadores, ya que en ella pueden ir adheridas partículas de ADN de las diferentes fases del proceso. Se deben usar guantes de vinilo o latex durante todo el proceso de análisis de las muestras, sin que se intercambien los guantes empleados en una fase con los de otra. La mascarilla bucal se empleará durante la fase de preparación y pulverización de la muestra y durante la extracción del ADN.

Reactivos de laboratorio: Es conveniente comprar todas las soluciones posibles ya preparadas, so-

bre todo las necesarias para la PCR, ya que de este modo se garantiza la esterilidad de las mismas. Las soluciones que no se puedan comprar, se prepararán con agua destilada estéril, adquiridas en botellas selladas. Las soluciones se prepararán lo más rápido posible, asegurándose de que su exposición al ambiente del laboratorio sea mínima. Una vez hechas las soluciones, se preparan alícuotas en tubos estériles y se guardan debidamente etiquetados en las condiciones apropiadas. De este modo, cuando aparezca una señal de contaminación, sólo se desecharán las alícuotas y no la solución "stock". Además, el uso repetido de la misma alícuota de reactivos aumenta el riesgo de contaminación, por lo que siempre que sea posible, conviene realizar alícuotas de un único uso.

Control de la contaminación en el laboratorio:

Es preciso realizar múltiples controles para comprobar la contaminación en los distintos pasos del proceso. Por ello, se han propuesto una serie de criterios que se deben llevar a cabo para autenticar los resultados obtenidos. Fundamentalmente se llevan a cabo dos tipos de controles:

1.- uno durante la fase de extracción de ADN de los tejidos antiguos. La aparición de un producto de amplificación en el B_E (blanco de la extracción), esta-

ría indicando que las muestras se han contaminado durante la fase de extracción y por tanto todas las muestras extraídas junto con ese B_e se deberán desechar.

2.- durante la fase de amplificación del ADN. Debido al estado fragmentado y presencia de lesiones en el ADN, se deben emplear técnicas moleculares de gran especificidad y sensibilidad para su análisis, como la técnica de la PCR, lo cual lleva implícito un alto riesgo de contaminación. Por ello, se han propuesto una serie de criterios que se deben llevar a cabo para autentificar los resultados obtenidos. La aparición de amplificado en el control negativo de la PCR, indicaría que uno o varios reactivos de la mezcla de reacción estaban contaminados y por tanto todos los resultados de ese experimento se desecharán.

Cuando se trabaja con ADN humano, el único criterio válido de verificación de los resultados, es la reproducción de los resultados en distintas muestras del mismo individuo, o en último caso en dos laboratorios independientes, con todo el coste adicional que conlleva este análisis por duplicado tanto económico como en tiempo.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.1.- Muestras

III.1.1.- Elección del material a estudiar: restos óseos versus piezas dentarias

Con el fin de valorar la eficiencia de los restos óseos y piezas dentarias a la hora de conseguir resultados positivos, se han analizado restos óseos y dentarios pertenecientes al mismo sujeto (en aquellos casos en los que fue posible asignar un conjunto de restos a un mismo individuo).

Al igual que otros autores (ZIERDT *et al.*, 1996; LALUEZA, 1995) hemos observado que los extractos de ADN obtenidos a partir de tejido óseo ofrecen mayor cantidad de ADN, aunque éste es de peso molecular más elevado (Figura 1). La mayor cantidad y peso molecular del ADN procedente del hueso comparado con el del diente puede ser debida, principalmente, a la infiltración al interior del hueso de otras especies (hongos, bacterias...), cuyo ADN se ha extraído junto con el del hueso (BROWN & BROWN, 1992). En este sentido, la capa de esmalte que está protegiendo la dentina, es una barrera contra la infiltración hacia el interior de la cavidad pulpar (donde se encuentra el ADN) de microorganismos, cuyo ADN sería extraído junto con el del diente (THUESEN & ENGBERG, 1990). Este ADN exógeno puede competir con el ADN endógeno de los tejidos antiguos por los primers durante la amplificación (HUMMEL & HERRMANN, 1994a).

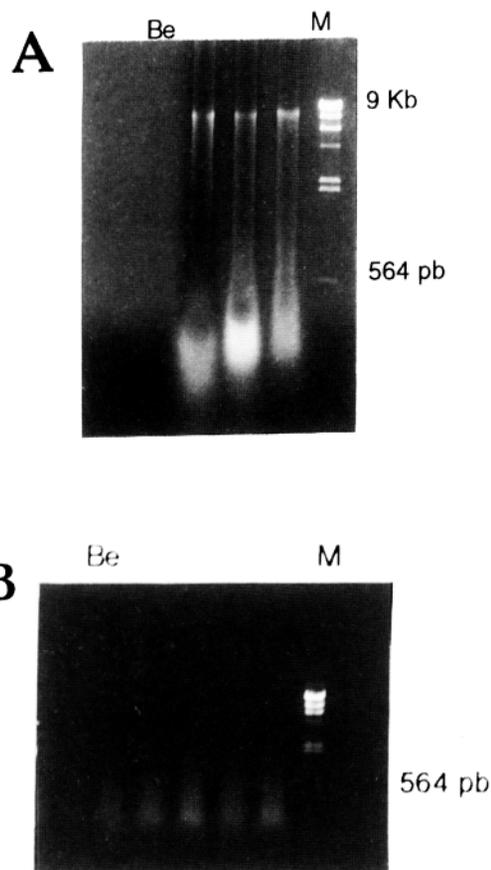


Figura 1.- Análisis electroforético de los extractos de ADN obtenidos a partir de: A.- Tejido óseo y B.- Tejido dentario. M: Marcador de tamaño molecular, λ Hind III (las posiciones vienen indicadas en pb); B_E: Blanco de la extracción. Gel de agarosa al 0,7% y tinción con BrEt.

Aunque, los extractos de ADN de piezas dentales ofrecen una menor cantidad de ADN y de menor peso molecular, sin embargo son más apropiados que el hueso para la fase de amplificación, ya que el ADN obtenido corresponde mayoritariamente al tejido dentario, siendo despreciable el ADN procedente de otras especies. El rendimiento de la amplificación ha sido más alto en el caso del ADN procedente de los dientes. Mientras que en las muestras analizadas de SJAPL, el 85% de los extractos de ADN obtenidos a partir de diente ofrecían resultados positivos, solamente en el 55% de las muestras de hueso se pudo determinar el haplogrupo. Sin embargo, en las muestras actuales y algunas históricas, el 100% de las muestras, tanto en dientes como en hueso se han podido determinarse, si bien en el caso de los extractos de las piezas dentarias resultó más fácil.

III.1.2.- Influencia del grado de preservación de las muestras en el éxito del análisis

Degradación del ADN: Los resultados obtenidos en los extractos de ADN, indican que el ADN obtenido corresponde, principalmente, al rango de 4.000-125 pb (pares de bases), estando la mayor proporción en el rango de 500-125 pb (Figura 1). El ADN está reducido a un tamaño <500 pb, en parte como consecuencia de la acción de las nucleasas, que tras la muerte del organismo aumentan su actividad (PÄÄBO, 1985b; DORAN *et al.*, 1986) y también por las reacciones de oxidación que crean lugares apurínicos o apirimidínicos, por donde se rompen posteriormente las cadenas de ADN (PÄÄBO, 1989; ROGAN & SALVO, 1990).

Al igual que otros autores (ZIERDT *et al.*, 1996; LALUEZA, 1995) también hemos observado ADN de alto peso molecular (8-20 Kb) en los extractos de ADN obtenidos de material óseo, que correspondería al ADN de otras especies (hongos, bacterias, ...) (BROWN & BROWN, 1992) o incluso podría tratarse de fragmentos de ADN que se han unido entre sí (PÄÄBO, 1989; ROGAN & SALVO, 1990) (Figura 1).

Valoración del grado de preservación de los restos esqueléticos: El éxito de la amplificación depende directamente del estado de conservación del material de partida. Éste puede valorarse a través de los siguientes parámetros:

a.- En el hueso, las piezas macroscópicamente mejor preservadas son las más adecuadas para el muestreo, ya que la degradación autolítica y post-mortem que afectan a la estructura macroscópica también afectan al ADN (HAGELBERG *et al.*, 1991). Las áreas óptimas son generalmente las extremidades del espécimen, ya que están fuera de la acción de los microbios entéricos que surgen una vez muerto el organismo, de modo que se limita el tiempo de degradación (PÄÄBO, 1985b; COOPER, 1994). Por ello, de entre todo el material óseo de estudio, hemos seleccionado aquellos fémures que ofrecían una superficie externa lisa, brillante y bien conservada.

b.- En relación a las piezas dentarias disponibles, se han desechado aquellas que no presentaban la corona o la raíz completamente formadas (correspondientes a individuos infantiles y juveniles) y/o algún tipo de caries. Tampoco se han considerado los dientes con fracturas o fisuras, ya que pueden ser una vía de entrada de ADNs exógenos al interior de la cavidad pulpar, donde se encuentra el ADN del individuo.

Antigüedad y factores ambientales: Hemos observado, al igual que otros autores, que la obtención de resultados positivos depende menos de la antigüedad de los restos, que del estado de preser-

vación individual de cada muestra, siendo las condiciones del enterramiento las que influyen en mayor medida en el estado de preservación del ADN (HAGELBERG & CLEGG, 1991; HAGELBERG *et al.*, 1991).

Los procesos hidrolíticos y oxidativos, que ocurren una vez muerto el organismo, provocan la rotura de las cadenas de ADN (DORAN *et al.*, 1986; PÄÄBO, 1985a). Estos procesos dependen directamente de las condiciones ambientales:

a.- Los ambientes húmedos favorecen la depurificación del ADN, lugares por los que luego se rompe la cadena de ADN (LINDAHL, 1993).

b.- Temperaturas entre 34-40°C favorecen la degradación microbiana y la autólisis enzimática (NIELSEN & THUESEN, 1994).

c.- Los valores de pH cercanos a la neutralidad favorecen la preservación del ADN (PÄÄBO & WILSON, 1991).

Por tanto los restos inhumados en un ambiente húmedo, con una temperatura en torno a los 37°C y en medios ácidos, se degradarían más rápidamente que los restos de ambientes áridos o árticos.

Hemos observado diferencias entre los distintos individuos del mismo yacimiento en cuanto al grado de conservación del ADN. Estas diferencias pueden deberse a una deshidratación diferencial (HAGELBERG & CLEGG, 1991). Cuando inmediatamente tras la muerte se produce una deshidratación de los tejidos, quedan inhibidos gran parte de los procesos autolíticos y de degradación que se producen tras la muerte del organismo, ya que éstos requieren la presencia de H₂O para ser efectivos. De este modo, la época del año en la que los individuos fueran enterrados, influiría directamente en este proceso.

III.2. Discusión sobre la puesta a punto de la técnicas de análisis

III.2.1. Contaminación

La mayor limitación con la que se encuentra esta línea de investigación es la contaminación de la muestra con pequeñas cantidades de ADN exógeno. La baja cantidad y escasa calidad (presencia de nucleótidos modificados en su secuencia) del ADNmt recuperado de tejidos antiguos, dificultan su eficiente amplificación. Por ello, la amplificación vía PCR de pequeñas cantidades de ADN exógeno se ve favorecida frente al ADN endógeno de la muestra.

Contaminación durante la fase de análisis en el laboratorio: Durante las fases iniciales de este proyecto, la contaminación fue el problema técnico más grave que hubo que superar, ya que mientras no se eliminara ésta, no había modo de comprobar la autenticidad de los resultados. Para ello, se realiza-

ron una serie de muestras control, que permitieran detectar la contaminación.

Durante la fase de extracción y purificación hemos llevado a cabo, en paralelo, un blanco de la extracción (B_e), así llamada a una muestra que se somete a todo el proceso de la extracción, pero en la cual no se añade tejido (HAGELBERG *et al.*, 1989; PÄÄBO *et al.*, 1989). De este modo, un B_e contaminado nos estaría indicando que los reactivos empleados para la extracción de las muestras estaban contaminados o que algún paso de la extracción tiene un alto riesgo de contaminación. Como resultado, se descartarían de futuros análisis las muestras asociadas a ese B_e contaminado.

Las posibles contaminaciones ocurridas durante la reacción de amplificación se pueden detectar mediante un control negativo de PCR, en el que se han añadido todos los reactivos necesarios para la amplificación, excepto el ADN molde (HUMMEL & HERRMANN, 1994; FRANCALACCI, 1995) y como resultado debe carecer de producto de amplificado específico.

A partir del momento en que se llevó a cabo la separación física de los espacios de trabajo de extracción y del trabajo pre- y post-PCR, se obtuvieron B_e y controles negativos de la amplificación limpios (sin producto específico de amplificado), requisito indispensable para que las muestras fueran consideradas para el tipaje.

Aunque la realización de estos controles de contaminación durante la fase de extracción y amplificación supone, en principio, un mayor volumen de trabajo y mayor coste económico, a la larga resulta muy ventajoso, ya que nos está indicando posibles fuentes de contaminación durante la manipulación de las muestras en el laboratorio y nos evita el análisis innecesario de muestras contaminadas.

Contaminación durante la excavación de los restos: En esta fase, los restos se pueden contaminar con ADN humano desprendido de las células muertas de la piel de las personas que realizan la excavación. Esta contaminación es evitable en gran medida, siempre y cuando se mantengan unas razonables condiciones de "esterilidad", tales como llevar guantes y preferiblemente mascarilla durante la excavación (BROWN & BROWN, 1992).

El problema de la contaminación antes y durante la excavación, reside principalmente en la dificultad de su detección. La única forma de asegurarse de que los resultados obtenidos corresponden al ADN endógeno de la muestra, es realizar múltiples extracciones de diferentes piezas óseas del mismo individuo y comprobar que en todas ellas se obtiene el mismo resultado (PÄÄBO, 1989; PÄÄBO *et al.*, 1989; RICHARDS *et al.*, 1993, 1995; FRANCALACCI, 1995).

La contaminación durante la fase de excavación se ha podido eliminar desechando la superficie externa de las muestras óseas y sometiendo las piezas dentales a un tratamiento de limpieza basado en ácidos (GINTHER *et al.*, 1992), sin correr el riesgo de que el ácido penetre en el interior de la muestra y destruya el ADN endógeno, ya que éste se encuentra protegido dentro de la cavidad pulpar.

La obtención del mismo resultado a partir de tejido óseo y dentario de un mismo individuo, indica que la limpieza de las superficies externas mediante abrasión (de los tejidos óseos) y ácidos (de las piezas dentarias) ha sido capaz de eliminar posibles contaminantes adheridos a la superficie de los tejidos.

Contaminación con ADN de otras especies: El ADN de otros organismos (bacterias, hongos, insectos, ...) co-extraído junto con el del espécimen, no constituye un grave problema cuando se utilizan primers específicos humanos (HUMMEL & HERRMANN, 1991), aunque puede causar reacciones competitivas con los primers durante la amplificación, favoreciendo la aparición de productos inespecíficos (HUMMEL & HERRMANN, 1994).

Los extractos de ADN de piezas dentarias no mostraban, en general la presencia de ADN de alto peso molecular (procedente de hongos, bacterias, insectos, etc,...), obteniéndose además una mayor reproducibilidad de los resultados en comparación con el ADN procedente de los restos óseos.

III.2.2. Inhibición

Otro de los problemas importantes cuando se trabaja con ADN extraído de tejidos arqueológicos es la aparición de factores inhibitorios que impiden la amplificación (PÄÄBO *et al.*, 1990; RICHARDS *et al.*, 1993). Existen varias hipótesis sobre la naturaleza química y etiológica de estos agentes inhibitorios:

Según PÄÄBO (1989), dichos compuestos estarían relacionados con los productos de Maillard derivados de la reducción de los azúcares que componen el ADN. Alternativamente, HAGELBERG & CLEGG (1991), COOPER (1994), RICHARDS *et al.* (1993) y TUROSS (1994) consideran que estas sustancias son porfirinas, abundantes en la materia orgánica y compuestos del suelo (hierro, taninos, ácidos húmicos, ácidos fúlvicos). Estos factores inhibitorios se identifican por una fluorescencia azulada que se localiza a la altura de los fragmentos de 1.000 pb, cuando se visualizan los extractos con luz U.V. tras tinción con BrEt de los geles de comprobación. Hemos comprobado al igual que otros autores (RICHARDS *et al.*, 1993; TUROSS, 1994), que si a un extracto de ADN actual añadimos pequeñas cantidades de los extractos de ADN, su amplificación puede llegar en algunos casos a inhibirse completamente. Sin embargo, ROGAN & SALVO (1990)

tras conseguir amplificar mezclas que contemplan ADN antiguo y moderno, argumentan que es el daño existente en los ácidos nucleicos lo que inhibe la amplificación.

Hemos logrado superar la inhibición, añadiendo al tampón de amplificación 40 µg/ml de BSA (Albúmina Sérica Bovina) y tomando 5-10 µl (dependiendo de la muestra) de una dilución 1:15 del extracto de ADN.

Al diluir las muestras se reduce la cantidad de los factores inhibitorios hasta un nivel no inhibitorio de la *Taq* polimerasa, sin embargo también se reduce la cantidad de ADN. Por lo tanto, hay que buscar la dilución adecuada de los extractos, de modo que los agentes inhibitorios presentes en el mismo no impidan la amplificación y al mismo tiempo, permanezcan suficientes copias de ADN molde para su amplificación. Adicionalmente, HAGELBERG *et al.* (1989) han observado que la inhibición de la *Taq* polimerasa se puede superar añadiendo BSA a los extractos, sustancia que se une a gran cantidad de compuestos (grupos hemo, ácidos grasos) que son inhibidores potenciales de la *Taq* polimerasa (SENSABAUGH, 1994).

III.2.3. Amplificación del ADN: protocolo y eficiencia

Tras haber superado los problemas causados por la inhibición de la *Taq* polimerasa, mediante la adición de BSA y dilución de las muestras, hemos procedido a ajustar los parámetros de amplificación de tal manera que se obtenga el máximo rendimiento durante la reacción de amplificación (Tabla 2).

Como se puede observar en la Tabla 3, existe bastante variabilidad en relación al rendimiento de la amplificación. Mientras que algunos sistemas presentan un porcentaje elevado de muestras amplificadas con éxito (7025 Alu I [89%]; 13704 BstN I [73%]; 9052 Hae II [60%]; 13208 Hinf I [58,2%]), en otros sistemas este porcentaje se reduce casi a la mitad (8994 Hae III [37%]; 8249 Ava II [34,5%]).

| | N | %RA |
|---------------------|----|------|
| 7025 Alu I | 55 | 89 |
| 4577 Nla II | 55 | 53 |
| 8249 Ava II | 55 | 34,5 |
| 8994 Hae II | 55 | 60 |
| 9052 Hae III | 55 | 37 |
| 12308 Hinf I | 55 | 58,2 |
| 13704 BstN I | 55 | 72,7 |

Tabla 3. Rendimiento de la amplificación con los sistemas empleados. (N: tamaño de la muestra; %RA: rendimiento de la amplificación;)

Las razones de esta variabilidad en el rendimiento de la amplificación pueden ser: a.- la secuencia del fragmento a amplificar (no la de los cebadores) posea homología que provocan la formación de estructuras secundarias, que dificultan la desnaturalización completa del ADN molde y b.- deficiente anillamiento de los cebadores al ADN molde, debido a un menor contenido en pirimidinas en su secuencia (O'ROURKE *et al.*, 1996). Si no existiera la limitación en el tamaño del fragmento a amplificar, este hecho podría evitarse amplificando un fragmento mayor, de modo que la composición de bases fuera más regular, y no hubiera problemas para su amplificación.

Por otro lado, hemos comprobado que la reproducibilidad de los resultados no es del 100%, es decir, no siempre se obtienen amplificadores positivos cuando se analizan diferentes alícuotas de la misma muestra. Esta observación puede explicarse asumiendo que cada alícuota de ADN diluida contiene muy pocas moléculas de ADN molde, por azar alguna de las alícuotas realizadas puede carecer de molde. Por ello, cuando se trata de llevar a cabo la reproducción de los resultados, en algunas muestras no se confirman los resultados positivos obtenidos previamente con otras alícuotas de la misma muestra, lo que hace necesario un mayor número de experimentos. Por tanto, cuando se obtiene un resultado negativo es conveniente repetir la prueba varias veces, ya que la causa de ese resultado podría ser la ausencia de moléculas de ADN molde amplificables en la alícuota empleada, por efecto de la dilución.

III.3. Análisis enzimático del ADN mitocondrial

Los productos de amplificación que reúnen las condiciones idóneas para su tipaje, como son: suficiente cantidad de producto amplificado para su detección mediante tinción con plata, y blancos de extracción y controles negativos de la amplificación correctos, se digieren con el enzima de restricción correspondiente. Sin embargo, se ha podido comprobar que a pesar de su correcta amplificación, algunas muestras daban un tipaje ambiguo tras la digestión. Esta ambigüedad consistía en la presencia simultánea tanto de las bandas correspondientes al producto amplificado, como de los fragmentos digeridos. Estos resultados ambiguos pueden atribuirse a diversos factores, tales como: digestión deficiente, contaminación con secuencias de ADN actuales, errores durante la PCR, amplificación inadvertida de inserciones nucleares del ADNmt y heteroplasmia del ADNmt (IZAGIRRE *et al.*, 1997).

La explicación más plausible de los resultados ambiguos en las digestiones del producto amplificado de ADNmt antiguo es el estatus químico alterado del propio ADN, lo cual le confiere resistencia a la

actuación de los enzimas de restricción. Se ha estimado que aproximadamente una base de cada 20, se encuentra modificada (PÄÄBO, 1989), de tal manera que en esas posiciones el ADN ha perdido los lugares de corte de los enzimas de restricción. Si la amplificación comienza a partir de un número bajo de moléculas molde, las cuales además están modificadas, el resultado final será un producto amplificado heterogéneo, que dará lugar a tipajes ambiguos.

Por tanto, aunque la contaminación con fragmentos de ADN actuales de algunas muestras, no se puede descartar a pesar de que los controles de la contaminación hayan sido correctos, se puede indicar que las digestiones parciales son debidas, principalmente, a la incorporación aleatoria de nucleótidos durante la PCR, en los lugares modificados de la secuencia del ADN molde.

Después de analizar los resultados obtenidos, hemos podido comprobar que es muy importante el estado de conservación del espécimen para obtener ADN amplificable. Para una buena preservación del ADN de los individuos de un yacimiento son muy importantes las condiciones ambientales en el que ha sido enterrado, como la temperatura, pH y humedad, incluso más que la antigüedad del yacimiento (HAGELBERG *et al.*, 1991; PÄÄBO, 1989).

De todos los materiales analizados, los restos históricos han mostrado una mayor eficiencia tanto durante la amplificación como en el tipaje de las digestiones, lo cual se podría relacionar con el hecho de que éstos se hubieran conservado cubiertos con una capa de cal, que pudiera favorecer una mayor preservación del ADN. Por otro lado, las muestras de ADN extraídas de los restos de una colección ósea reciente (contrariamente a lo esperado) han presentado numerosos problemas, que hemos relacionado con el hecho de estar enterrados directamente en el suelo o en nichos en la pared, sin ningún tipo de protección frente a los factores que afectan a la supervivencia del ADN (pH, temperatura y humedad).

Por otro lado, hemos encontrado grandes diferencias en el rendimiento de la amplificación del ADN en restos del mismo yacimiento. Mientras que algunas muestras se pueden tipar correctamente sin mayores dificultades, otras, ofrecen numerosos problemas tanto en la eficiencia de la amplificación como en el tipaje de la digestión. A pesar de su aparentemente correcta amplificación, ofrecen tipajes ambiguos tras la digestión enzimática, lo cual puede relacionarse con un bajo número de moléculas molde, algunas de cuyas bases probablemente están degradadas por efecto de la autólisis y oxidación post-mortem; por tanto, en el producto final podemos hallar tanto las moléculas intactas como las generadas a partir de los moldes dañados. PÄÄBO (1989) ha observado que es muy importante la rapidez con la cual se

desechan los tejidos tras la muerte del organismo, ya que cuanto menor sea el tiempo de acción de las enzimas autolíticas, mejor será el grado de preservación de las moléculas de ADN.

Debido al grado de deterioro del ADN (tanto en cuanto al tamaño como a la secuencia) junto con el alto riesgo de contaminación con ADN contemporáneo, es necesario llevar a cabo exhaustivos controles de contaminación a lo largo de todos los pasos del análisis así como realizar múltiples comprobaciones del mismo resultado, tanto en diferentes extractos del mismo individuo como en diferentes alícuotas del mismo extracto. Y en todas ellas, el resultado obtenido debe coincidir. Todas estas medidas implican que los estudios moleculares con extractos de ADN recuperados de restos antiguos, se prolongan en el tiempo mucho más que los análisis llevados a cabo en muestras actuales.

Por otro lado, la baja eficiencia obtenida durante la amplificación y el pobre rendimiento obtenido en los tipajes correctos, implican la reducción del tamaño muestral de partida. A pesar de todo ello, es posible obtener resultados, los cuales se pueden comparar con los datos obtenidos en la población actual y tratar de elaborar hipótesis evolutivas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha realizado en el contexto del proyecto de investigación: "Aportación de la biología molecular al estudio de la evolución biológica de la población del País Vasco", subvencionado por la Diputación Foral de Bizkaia, Diputación Foral de Araba, Bilbao Bizkaia Kutxa y Fundación Caja Vital, y del proyecto GN 154.310-0001-94 (Gobierno de Navarra y UPV/EHU).

BIBLIOGRAFIA

- ANDERSON, S.; BANKIER, A.T.; BARRELL, B.G.; BRUIJN, M.H.L.DE; COULSON, A.R.; DROUIN, J.; EPERON, I.C.; NIERLICH, D.P.; ROE, B.A.; SANGER, F.; SCHREIER, P.H.; SMITH, A.J.H.; STADEN, R. & YOUNG, I.G.
1981 Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290 (9): 457-465
- ARMENDARIZ, J. & IRIGARAI, S.
1995 *La arquitectura de la muerte. El hipogeo de Longar (Viana, Navarra). Un sepulcro colectivo de 2.500 A.C.*, Centro de Estudios Tierra Estella. Lizarraldeko Ikastetxea.
- BROWN, T.A. & BROWN, K.A.
1992 Ancient DNA and the archaeologist. *Antiquity* 66: 1-23
- CAVALLI-SFORZA, L.L. & MINCH, E.
1997 Paleolithic and neolithic lineages in the European mitochondrial gene pool. *American Journal of Human Genetics* 61: 247-251

- COOPER, A.
1994 DNA from museum specimens. In *Ancient DNA. Recovery and Analysis of Genetic Material from Paleontological, Archaeological, Museum, Medical, and Forensic Specimens*. Herrmann B., Hummel S. (eds) New York: Springer-Verlag, pp. 149-165
- DORAN, G.H.; DICKEL, D.N.; BALLINGER, W.E.JR.; AGEE, O.F.; LAIPIS, P.J. & HAUSWIRTH, W.W.
1986 Anatomical, cellular and molecular analysis of 8,000-year old human brain tissue from the Windover archaeological site. *Nature* 323: 803-806
- ETXEBERRIA, F. & VEGAS, J.I.
1988 ¿Agresividad social o guerra? durante el Neo-eneolítico en la cuenca media del Valle del Ebro, a propósito de San Juan Ante Portam Latinam (Rioja alavesa). *Munibe (Antropología-Arqueología) supl. 6*, pp. 105-112. San Sebastian
- FOX, J.C.; AIT-KHALED; M., WEBSTER, A. & EMERY, V.C.
1991 Eliminating PCR contamination: is UV irradiation the answer? *J. Virol. Methods*. 33: 375-382
- FRANCALACCI, P.
1995 DNA recovery from ancient tissues: problems and perspectives. *Hum.Evol.* 10(1):81-91
- GINTHER, C.; ISSEL-TARVER, L. & KING, M.C.
1992 Identifying individuals by sequencing mitochondrial DNA from teeth. *Nature Genetics* 2 (2): 135-138
- HAGELBERG, E.
1994 Mitochondrial DNA from ancient bones. In *Ancient DNA. Recovery and Analysis of Genetic Material from Paleontological, Archaeological, Museum, Medical, and Forensic Specimens*. HERRMANN B., HUMMEL S. (eds) New York: Springer-Verlag, pp. 195-204
- HAGELBERG, E.; BELL, L.; ALLEN, T.; BOYDE, A.; JONES, S.J. & CLEGG, J.B.
1991 Analysis of ancient bone DNA: techniques and applications. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. Seris B*, 333: 399-407
- HAGELBERG, E. & CLEGG, J.B.
1991 Isolation and characterization of DNA from archaeological bone. *Proc. R. Soc. London B*, 244: 45-50
1993 Genetic polymorphism in prehistoric Pacific islanders determined by analysis of ancient bone DNA. *Proc. R. Soc. London B*, 252: 163-170
- HAGELBERG, E.; SYKES, B. & HEDGES, R.
1989 Ancient bone DNA amplified. *Nature* 342: 485
- HÄNNI, C.; LAUDET, V.; SAKKA, M.; BÈGUE, A. & STÉHELIN, D.
1990 Amplification de fragment d'ADN mitochondrial à partir de dents et d'os humains anciens. *C.R. Acad. Sci. Paris* 310: 365-370
- HIGUCHI, R.G.; BOWMAN, B.; FREIBERGER, M.; RYDER, O.A. & WILSON, A.C.
1984 DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature* 312: 282-284
- HUMMEL, S. & HERRMANN, B.
1991 Y-chromosome-specific DNA amplified in ancient human bone. *Naturwissenschaften* 78: 266-267
1994 General aspects of sample preparation. In *Ancient DNA. Recovery and Analysis of Genetic Material from Paleontological, Archaeological, Museum, Medical, and Forensic Specimens*. HERRMANN B., HUMMEL S. (eds) New York: Springer-Verlag, pp. 59-68
- IZAGIRRE, N.; DURÁN, L.M.; BARBERO, M.C. & DE LA RÚA, C.
1997 Análisis molecular del ADN mitocondrial en una población prehistórica del País Vasco: metodología y problemática. *Actas de X Congreso de la Sociedad de Antropología Biológica, León (6-11 Julio 1997)*. (en prensa)
- KRINGS, M.; STONE, A.; SCHMITZ, R.W.; KRAINITZ, H.; STONE-KING, M. & PÄÄBO, S.
1997 Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell* 90: 19-30
- LALUEZA FOX, C.
1996 Analysis of ancient mitochondrial DNA from extinct aborigenes from Tierra del Fuego- Patagonia. *Ancient Biomolecules* 1(1):43-54
- LINDAHL, T.
1993 Recovery of antedelluvian DNA. *Nature* 365:700
- MERIWETHER, D.A.; ROTHHAMMER, F. & FERRELL, R.E.
1994 Genetic variation in the New World: ancient teeth, bone, and tissue as sources of DNA. *Experientia* 50: 592-601
- O'ROURKE, D.H.; CARLYLE, S.W. & PARR, R.L.
1996 Ancient DNA: methods, progress, and perspectives. *Am. J. Hum. Biol.* 8: 557-571
- OU, C.Y.; MOORE, J.L. & SCHOCHETMAN, G.
1991 Use of UV irradiation to reduce false positivity in polymerase chain reaction. *Biotechniques* 10: 442, 444, 446
- PÄÄBO, S.
1985a Preservation of DNA in ancient Egyptian mummies. *Journal of Archaeological Science* 12:411-417
1985b Molecular cloning of ancient Egyptian mummy DNA. *Nature* 374: 644-645
1989 Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning and enzymatic amplification. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* 86: 1939-1943
- PÄÄBO, S.; GIFFORD, J. & WILSON, A.C.
1988 Mitochondrial DNA sequences from a 7000-year old brain. *Nucl. Acids Res.* 16(20): 9775-9787
- PÄÄBO, S.; HIGUCHI, R.G. & WILSON, A.C.
1989 Ancient DNA and the polymerase chain reaction. The emerging field of molecular archaeology. *The Journal of Biological Chemistry* 264 (17): 9709-9712

- PÄÄBO, S.; IRWIN, D.M. & WILSON, A.C.
1990 DNA damage promotes jumping between templates during enzymatic amplification. *The Journal of Biological Chemistry* 15(8): 4718-4721
- PARR, R.L.; CARLYLE, S.W. & O'ROURKE, D.H.
1996 Ancient DNA analysis of Fremont Amerindians of the Great Salt Lake Wetlands. *Am. J. Phys.Anthro.* 99: 507-518
- RICHARD, M.; SMALEEY, K.; SYKES, B. & HEDGES, R.
1993 Archaeology and genetics: analysing DNA from skeletal remains. *World Archaeology* 25: 18-28
- RICHARDS, M.B.; SYKES, B.C. & HEDGES, R.E.M.
1995 Authenticating DNA extracted from ancient skeletal remains. *Journal of Archaeological Science* 22: 291-299
- ROGAN, P.K. & SALVO, J.J.
1990 Molecular genetics of pre-columbian south american mummies. *Molecular Evolution*, 223-234
- SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A. & ARNHEIM, N.
1985 Enzymatic amplification of b-globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1850-1854
- STONE, A. & STONEKING, M.
1993 Ancient DNA from Pre-Columbian amerindian population. *Am.J. Phys.Anthro.* 92: 463-471
- THUESEN, I. & ENGBERG, J.
1990 Recovery and analysis of human genetic material from mummified tissue and bone. *Journal of Archaeological Science* 17: 679-689
- TORRONI, A.; HUOPONEN, K.; FRANCALACCI, P.; PETROZZI, M.; MORELLI, L.; SCOZZARI, R.; OBINU, D.; SAVONTAUS, M-L. & WALLACE, D.C.
1996 Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations. *Genetics* 144: 1835-1850
- TORRONI, A.; LOTT, M.T.; CABELL, M.F.; CHEN, Y.-S.; LAVERGNE, L. & WALLACE, D.C.
1994a mtDNA and the origin of Caucasians: identification of ancient Caucasian-specific haplogroups, one of which is prone to recurrent somatic duplication in the D-loop region. *Am.J. Hum.Genet.* 55: 760-776
- TORRONI, A.; MILLER, J.A.; MOORE, L.G.; ZAMUDIO, S.; ZHUANG, J.; DROMA, T. & WALLACE, D.C.
1994b Mitochondrial DNA analysis in Tibet: implications for the origin of the Tibetan population and its adaptation to high altitude. *Am. J. Phys. Anthropol.* 93: 189-199
- TORRONI, A.; SCHURR, T.G.; YANG, C.-C.; SZATHMARY, E.J.E.; WILLIAMS, R.C.; SCHANFIELD, M.S.; TROUP, G.A.; KNOWLER, W.; LAWRENCE, D.N.; WEISS, K.M. & WALLACE, D.C.
1992 Native American mitochondrial DNA analysis indicates that Amerind and the NaDene populations were founded by two independent migrations. *Genetics* 130: 153-162
- TORRONI, A.; SUKERNIK, R.I.; SCHURR, T.G.; STARIKOVSKAYA, Y.; CABELL, M.F.; CRAWFORD, M.H.; COMUZZIE, A.G. & WALLACE, D.C.
1993b Mitochondrial DNA variation of aboriginal Siberians reveals distinct affinities with Native Americans. *American Journal of Human Genetics* 53: 591-608
- TORRONI, A. & WALLACE, D.C.
1995 mtDNA Haplogroups in Native Americans. *American Journal of Human Genetics* 56(5): 1234-1235
- TUROSS, N.
1994 The biochemistry of ancient DNA in bone. *Experientia* 50: 530-535
- ZIERDT, H.; HUMMEL, S. & HERRMANN B.
1996 Amplification of human short tandem repeats from medieval teeth and bone samples. *Human Biology* 68 (2): 185-199