

## CONTRIBUCIÓN DEL ADN ANTIGUO A LA INTERPRETACION DE LOS RESTOS HUMANOS DE PROCEDENCIA ARQUEOLÓGICA

### *Ancient DNA contribution to the interpretation of the human remains of archeological origin*

Montserrat Hervella Afonso<sup>1</sup>  
Lara Fontecha Martínez<sup>1</sup>  
Saioa López López<sup>1</sup>  
Santos Alonso Alegre<sup>1</sup>  
Neskuts Izagirre Arribalzaga<sup>1</sup>  
Concepción de la Rúa Vaca<sup>1</sup>

(Recibido: 18-X-2010)  
(Aceptado: 1-XI-2010)

**Palabras Clave:** ADN antiguo. ADN mitocondrial. Muestras antropológica. Región no recombinante del cromosoma Y. Yacimientos prehistóricos vascos.

**Key Words:** Ancient DNA. Genetic markers. Mitochondrial DNA. Non-recombining region of Y chromosome. Prehistoric Basque archaeological sites.

**Gako Hitzak:** Antzinako DNA. DNA mitokondrial. Euskal Herriko historiaurreko aztarnategiak. Markari genetikokoak. Y kromosomaren eskualde ez-errekombinatzailea.

#### RESUMEN

La posibilidad de extraer y analizar ADN a partir de restos esqueléticos, permite analizar directamente la composición genética de las poblaciones del pasado. Los datos de ADN antiguo son normalmente fragmentarios y de muestras poblacionales pequeñas, lo que aconseja gran cautela en su interpretación. Además, deben evitarse interpretaciones simplistas que ignoran las características y limitaciones de los marcadores genéticos utilizados, así como la representatividad de las muestras analizadas. El ADN mitocondrial (ADNmt) es la región del genoma que proporciona mayor eficiencia en los estudios del ADN antiguo, ya que existen numerosas copias del mismo, lo que facilita su recuperación aún en muestras degradadas; además tiene una tasa de mutación elevada (produciéndose cambios en tiempos relativamente pequeños). Sin embargo, el ADNmt es solo una pequeña porción de todo el genoma y únicamente proporciona información genética de los linajes femeninos.

<sup>1</sup> Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Zientzia eta Tecnología Fakultatea., Genetika, Antropologia Fisikoa eta Animalien Fisiologia Saila. Sarriena Auzoa z/g, Leioa 48940. Bizkaia. [montse.hervella@ehu.es](mailto:montse.hervella@ehu.es)

## SUMMARY

The possibility to extract and analyse DNA from skeletal remains allows the direct analysis of the genetic composition of extinct populations. However, the information obtained from ancient DNA comes normally from small population samples and is usually fragmented. Therefore, great levels of caution are required when interpreting the results. Furthermore, simplistic interpretations that ignore the features or limitations of the genetic markers used or of what the samples studied represent, should be avoided. Mitochondrial DNA (mtDNA) is the part of the human genome that provides the highest level of efficiency when studying ancient DNA samples, because its high copy number facilitates its recovery even from degraded samples. It also displays a high mutation rate (changing in relatively short periods of time). However, we must bear in mind that mtDNA is only a small part of the entire human genome, that provides genetic information only from female lineages.

## LABURPENA

Aztarna eskeletikoetatik DNA erauzteko eta aztertzeo posibilitateak, iraganeko populazioen eduki-genetikoa zuzenean aztertzea baimentzen digu. Antzinako DNAaren datuak zatikatuak eta populazio-lagin txikietatik eratorriak dira gehienetan; beraz, beraien interpretazioa kontu handiz egin behar da. Gainera, erabilitako markari genetikoen ezaugarri eta mugak, zein laginen adierazgarritasuna kontutan hartzen ez dituzten interpretazio sinplistikak ekiditen saiatu behar dugu. DNA mitokondrialak (DNAmt) da antzinako DNAren ikerketetan emaitza efizienteenak ematen dizkigun genoma-zatia, zelulako hainbat kopia edukitzeak bere erauzketa errazten bait du lagin hondatueta. Gainera, mutazio-tasa altua du, aldaketak oso denbora-tarte laburrean ematen direlarik. Hala ere, DNAmt-a giza-genomaren zati txiki bat baino ez da, emakumezkoen informazio genetikoa baino ez diguna eskaintzen.

## 1. EL ADN ANTIGUO (ADNa)

Se denomina ADNa, al ADN recuperado a partir de tejidos de organismos ya extintos o poblaciones que vivieron en el pasado. En el caso de restos humanos, el ADN se recupera principalmente de hueso y diente, ya que son los restos mayoritariamente recuperados en contextos arqueológicos. Se seleccionan dientes preferentemente, ya que se hallan mejor conservados y el ADN que contienen se encuentra protegido por el esmalte que rodea al diente, evitando la invasión de bacterias desde el exterior.

En las células vivas de los organismos, el ADN se encuentra continuamente protegido del daño, mediante sistemas de reparación. Sin embargo, cuando el organismo muere, este sistema cesa su funcionamiento, por lo que el ataque físico-químico no encuentra ningún impedimento. El resultado es que el ADN recuperado de tejidos antiguos se encuentra severamente dañado.

Entre las principales características del ADNa, cabe destacar **la recuperación de una menor cantidad de ADN**. En muestras antiguas, el ADN representa únicamente entre el 0,1-1% del ADN que se esperaría encontrar en una muestra moderna (Tuross 1994), de hecho, a veces no se halla ningún rastro de ADN. A causa de ello, en la mayoría de los casos la única parte del genoma que se puede amplificar de forma reproducible es el ADN mitocondrial (ADNmt), ya que presenta entre 1.000-10.000 copias por célula.

Además, el **ADN se degrada** en función del tiempo y de las condiciones ambientales externas (pH del suelo, humedad, temperatura,...) (Lindahl 1993). Como resultado de esta degradación el ADN se encuentra fragmentado y los nucleótidos de la secuencia del ADN modificados. La fragmentación del ADN nos obliga a trabajar con fragmentos inferiores a 100-200 pb de longitud. Debido a la modificación post-mortem de los nucleótidos de la secuencia de ADN, durante la amplificación *in vitro* de la cadena de ADN, se produce la incorporación errónea de nucleótidos e incluso puede llegar a inhibirse la amplificación *in vitro* de la cadena de ADN.

La recuperación de una menor cantidad de moléculas de ADN y la degradación de las mismas, hacen que el riesgo de contaminación del ADNa sea alta. Una fuente de contaminación puede ser el ADN exógeno procedente de otros organismos próximos, ya que durante el tiempo del enterramiento los restos se pueden contaminar con el ADN de microorganismos, hongos y fauna putrefacta. La contaminación con ADN de organismos de una especie diferente a la que se pretende estudiar, no tiene por qué representar ningún problema. Si la región a caracterizar está lo suficientemente diferenciada a nivel de especie, el diseño de cebadores específicos y unas condiciones restricti-

vas de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (*Polymerase Chain Reaction, PCR*), permiten amplificar el ADN endógeno.

En el caso de enterramientos colectivos, los restos pueden contaminarse con el ADN de los organismos enterrados próximos. Sin embargo, dada la baja cantidad de ADN recuperada de los restos antiguos, no parece una fuente de contaminación probable. Además, los restos en una fase previa a la extracción, son sometidos a un proceso abrasivo de limpieza de la superficie externa para eliminar cualquier ADN que se encuentre contaminando la superficie del material.

Sin embargo, la principal fuente de contaminación en los estudios de ADNa es el ADN exógeno procedente de humanos actuales. Este ADN puede contaminar los restos antes, durante y después de su análisis (Bandelt 2005; Gilbert y Willerslev 2006; Malmström *et al.*, 2005; Sampietro *et al.* 2005; Sampietro *et al.* 2006; Willelev *et al.* 2007)

El ADN contaminante de origen humano, puede introducirse directamente en la muestra mientras ésta es manipulada por los arqueólogos, el personal del museo o los propios investigadores; por ejemplo, a través de la descamación de la piel o de los aerosoles producidos durante la respiración. Por este motivo el ADN de todo el personal que ha manipulado los restos debe ser analizado para comprobar la posible contaminación de los restos por parte de estas personas (Bandelt 2005; Gilbert *et al.* 2005).

Asimismo, cuando se trabaja con ADNa humano, es adecuado llevar a cabo el análisis de algún resto faunístico asociado a los restos humanos y amplificarlo con los cebadores específicos de humanos. La falta de amplificación de secuencias humanas en los restos faunísticos, indicaría que el proceso de descontaminación de las muestras ha eliminado el posible ADN humano actual contaminante.

Otro vehículo de contaminación puede ser el material y reactivos empleados durante el análisis genético de los restos. Esta contaminación, se puede detectar fácilmente incluyendo los controles correspondientes, tanto durante la extracción del ADN como durante la amplificación del mismo (Handt *et al.* 1994). Estos controles permitirán que detectemos la posible contaminación que habría podido ocurrir durante estas dos etapas (extracción y amplificación).

Finalmente, la principal fuente de contaminación son los amplicones provenientes de los experimentos previos realizados en el laboratorio. La apertura de los tubos que contienen productos de la PCR, provocan la contaminación del ambiente del laboratorio. Este tipo de contaminación se evita utilizando laboratorios independientes, uno para la extracción y preparación de la PCR de ADNa y otro físicamente aislado del anterior, para analizar los

productos de PCR (Bandelt 2005; Gilbert *et al.* 2005; Hofreiter *et al.* 2001). Además, se debe utilizar material y equipamiento exclusivo para trabajar con ADN<sub>a</sub> y mantener la esterilidad de los mismos así como de las superficies de trabajo, mediante lavado con lejía e irradiación con luz UV.

A la hora de trabajar con ADN<sub>a</sub> nos encontramos, principalmente, con dos limitaciones: la contaminación y la autenticación de los resultados (Pääbo 1989; Pääbo *et al.* 1989; Pääbo *et al.* 2004; Pääbo y Wilson 1991; Pääbo *et al.* 1988). Esto, nos obliga a seguir unos estrictos criterios de autenticación para dar mayor fiabilidad a nuestros resultados (Cooper y Poinar 2000; Cooper 1994; Hofreiter *et al.* 2001; Pääbo *et al.* 2004; Poinar *et al.* 1996). Los criterios de autenticación que seguimos en nuestro grupo de investigación para llevar a cabo los estudios de ADN<sub>a</sub> son entre otros:

**-Cuantificación del número de moléculas de ADN amplificables.** La cuantificación del número de moléculas que contienen el extracto de ADN, nos permite valorar la reproducibilidad de los resultados.

**-Controles de contaminación de la extracción del ADN y de la amplificación mediante PCR.** Se deben llevar a cabo controles que nos permitan distinguir la posible contaminación ocurrida durante la extracción del ADN (muestras que se someten a todo el proceso de la extracción, pero a las que no se añade tejido) y/o durante la amplificación del ADN (muestras que se someten a todo el proceso de amplificación pero sin añadir ADN).

**-Clonación y secuenciación de los productos de PCR.** La clonación nos permite obtener una secuencia consenso, donde se pueden identificar las mutaciones endógenas de la muestra, de aquellos cambios debidos a errores de la *Taq* polimerasa durante la PCR o al daño en la secuencia de ADN<sub>a</sub>, además de detectar posibles contaminaciones.

**-Análisis por duplicado** en nuestro laboratorio y replicación de los resultados en un laboratorio independiente. Todos los resultados obtenidos deben de ser coincidentes.

**-Análisis del ADN de los investigadores y arqueólogos que han manipulado las muestras,** para identificar posibles contaminaciones antes, durante y después de la extracción del material genético (Gilbert *et al.* 2005).

## 2. CARACTERÍSTICAS DE LOS MARCADORES GENÉTICOS

A la hora de interpretar los resultados de ADN<sub>a</sub>, hay que tener en cuenta las características de los mar-

cadores genéticos analizados, siendo los más utilizados el ADN mitocondrial y la región no recombinante del cromosoma Y.

### 2.1. El ADN mitocondrial (ADNmt)

El ADNmt es una molécula circular de aproximadamente 16.500 pb (0,0005% del genoma nuclear humano) que se encuentra en el interior de las mitocondrias, orgánulos localizados en el citoplasma celular. El genoma mitocondrial se divide en dos regiones (Figura 1):

- La región codificante, que contiene la secuencia que codifica 37 genes (dos ARN ribosómicos, 22 ARN de transferencia y 13 proteínas), que forman parte de la maquinaria enzimática de las mitocondrias, necesaria para proporcionar energía a las células.
- La región control, que consiste en una pequeña secuencia de alrededor de 1.100 pb, no-codificante, donde los cambios o las mutaciones se acumulan de un modo mucho más rápido.

El genoma mitocondrial presenta un elevado número de copias por célula eucariota, una mitocondria puede contener entre 2 y 10 moléculas de ADNmt, por lo tanto en una célula eucariota hay entre 1.000-10.000 copias del genoma mitocondrial (Malyarchuk *et al.* 2002), facilitando así, la supervivencia y recuperación, lo cual es una enorme ventaja cuando se trabaja con material genético degradado, como es el caso del ADN<sub>a</sub>.

El ADNmt muestra ciertas características que lo hacen especialmente útil para los estudios de evolución humana. Presenta una elevada tasa de mutación, lo que nos permite la reconstrucción de la historia evolutiva reciente de las poblaciones humanas. Asimismo al no ser recombinante, los cambios de una generación a otra serán debidos a mutaciones, pudiendo interpretar de forma directa la variabilidad que presenta. Se hereda únicamente por vía materna, por lo que únicamente proporciona información sobre la historia evolutiva de las mujeres. Sin embargo, los resultados derivados del estudio del ADN mitocondrial se deben interpretar con cautela, ya que se trata de un único locus que nos informa únicamente de la historia demográfica de las mujeres.

Los polimorfismos del ADNmt están ampliamente estudiados en numerosas poblaciones, por lo que la variabilidad y distribución de los diferentes linajes mitocondriales son ampliamente conocidos (Anderson *et al.* 1981; Andrews 1999). La variabilidad observada en las secuencias mitocondriales se puede clasificar en diferentes conjuntos denominados **haplogrupos**, que se diferencian por presentar una serie de mutaciones

estables, específicas de las distintas variantes geográficas de la especie humana.

Para ilustrar la utilidad del análisis del ADNmt en muestras antiguas, se cita el estudio de la necrópolis tardo-antigua de Aldaieta (Álava), la cual presenta un complejo ritual, con una clara influencia cultural franca. El análisis de la variabilidad del segmento hipervariable I (HVS-I) de la región control del ADNmt, puso de manifiesto la presencia de algunos linajes mitocondriales poco frecuentes en la población actual, en individuos inhumados en el mismo enterramiento colectivo, lo que sugiere la existencia de una relación de parentesco vía materna entre estos individuos. Por otro lado, en Aldaieta se han obtenido linajes mitocondriales que muestran semejanza con poblaciones actuales de la cornisa cantábrica, por lo que no es evidente que la influencia cultural norpirenaica detectada en Aldaieta, viniese acompañada de una influencia biológica, al menos a nivel de los linajes mitocondriales. (Alzualde *et al.* 2005; Alzualde *et al.* 2006; Alzualde *et al.* 2007; Izagirre *et al.* 2005).

## 2.2. Región no recombinante del cromosoma Y

Los estudios genéticos acerca de la historia evolutiva de las poblaciones humanas, también se pueden llevar a cabo mediante el análisis de la variabilidad del cromosoma Y (la porción no-recombinante del cromosoma Y, NRY) (Figura 2), un marcador también de naturaleza no-recombinante y que nos permite analizar la historia evolutiva de las poblaciones por vía paterna. Este marcador no se puede analizar en todos los estudios de ADN debido a que el cromosoma Y presenta una sola copia en el núcleo celular, resultando muy difícil su recuperación en muestras degradadas, como es frecuente en las muestras antiguas.

En la necrópolis de Aldaieta (Álava) (Alzualde *et al.* 2005; Alzualde *et al.* 2006; Alzualde *et al.* 2007; Izagirre *et al.* 2005) se ha podido realizar el análisis de algunas mutaciones del cromosoma Y, lo que nos ha permitido establecer relaciones de parentesco vía paterna entre algunos individuos. Una de éstas, es una posible relación familiar vía paterna entre dos hermanos (presentan el mismo linaje mitocondrial y del cromosoma Y) y otra entre un padre y su hijo (presentan distinto linaje mitocondrial pero el mismo del cromosoma Y) (Alzualde *et al.* 2006).

## 3. REPRESENTATIVIDAD DE LAS MUESTRAS ANTROPOLÓGICAS

Otro aspecto a tener en cuenta a la hora de interpretar los resultados de ADN es la representatividad de las muestras antropológicas analizadas. En muchos casos, el número de muestras susceptibles de ser ana-

lizadas es muy pequeño, bien porque se han recuperado pocos individuos o porque el estado de conservación sea deficitario.

Los resultados obtenidos a partir de un número reducido de muestras, deben interpretarse teniendo en cuenta que la ausencia de algunos linajes de ADN en estas muestras, no se justifica con la inexistencia en la población original, sino que puede ser debida al pequeño tamaño muestral analizado.

Un ejemplo que muestra esta problemática es el yacimiento neolítico de Paternabidea (Ibero, Pamplona), en el cual se han recuperado 11 individuos de los que hemos podido analizar 9 de ellos. El estudio de este yacimiento presenta una gran importancia ya que nos permite contrastar la influencia biológica vs. cultural asociada al Neolítico. Existen varios linajes mitocondriales asociados a la expansión neolítica, uno de ellos es el denominado J. En este yacimiento no se ha identificado ningún individuo perteneciente a este linaje, pero esto no significa que no estuviese presente en la población original, sino que su ausencia seguramente se deba al reducido tamaño muestral recuperado en este yacimiento (Hervella *et al.* 2009).

Otro ejemplo es el yacimiento de Urratxa (Bizkaia) (de la Rúa *et al.* 1997), donde solo fue posible analizar cinco individuos cuyas secuencias mitocondriales resultantes presentan una gran frecuencia en la población europea actual, no siendo posible hacer más precisiones sobre las relaciones evolutivas de este grupo humano. No obstante resulta de gran interés haber encontrado una gran variabilidad de secuencias mitocondriales, lo que indicaría que la muestra de Urratxa no pertenece a una población de tamaño reducido ni aislada.

## 4. PLANIFICACIÓN DEL ESTUDIO DE ADN ANTIGUO

Todos estos ejemplos indican que en cada yacimiento se debe planificar el estudio de ADN en función de varios factores, tales como:

**-La hipótesis de partida y preguntas que se pretenden responder.** La problemática en cada yacimiento es diferente, por ejemplo el planteamiento con que se realizó el estudio de la necrópolis de Aldaieta (Álava) (Alzualde *et al.* 2005; Alzualde *et al.* 2006; Alzualde *et al.* 2007; Izagirre *et al.* 2005), no guarda relación con la problemática que plantea el cementerio "musulmán" de Plaza del Castillo (Pamplona), en el que se valora la presencia de secuencias mitocondriales europeas y del norte de África, que plantearían la existencia de una posible influencia genética musulmana en este yacimiento navarro.

-El estado de preservación de las muestras, ya que este es un factor limitante de los estudios de ADN antiguo. En el caso de la necrópolis de Aldaieta (Alzualde *et al* 2005; Alzualde *et al.* 2006; Alzualde *et al.* 2007; Izagirre *et al.* 2005) se ha podido analizar tanto el ADNmt como el cromosoma Y; además se ha corroborado en algunos casos el sexo mediante técnicas moleculares. Sin embargo en el caso de los yacimientos neolíticos navarros de los Cascajos (Los Arcos) y Paternanbidea (Ibero) (Hervella *et al.* 2009; Hervella *et al.* 2010), solo hemos podido analizar el ADNmt, siendo inviable analizar otro tipo de marcador genético debido al mal estado de preservación del ADN. Sin embargo, en el estudio preliminar de la *maqbara* de Pamplona, se ha detectado la existencia de una elevada cantidad de moléculas de ADNmt, lo que permite suponer que también se conserva ADN nuclear, este hecho permitirá analizar otros marcadores genéticos como los del cromosoma Y.

Gracias a la planificación del estudio del ADN y teniendo en cuenta las limitaciones que supone su estudio y la problemática inherente al mismo, el análisis del ADN, supone una aportación imprescindible en la reconstrucción de la historia biológica de las poblaciones humanas.

## 5. AGRADECIMIENTOS

La investigación propia contenida en este trabajo, ha sido realizada gracias a la financiación del Ministerio de Educación e Innovación mediante los proyectos CGL-2004-03300 y GCL-2007-65515. Además de la subvención a Grupos de Investigación del Sistema Universitario Vasco concedida por el Gobierno Vasco desde el año 2007 (GI07/43-IT453-07) y la renovación hasta el 2015 (IT542-10).

## 6. BIBLIOGRAFIA

- Alzualde, A.; Izagirre, N.; Alonso, S.; Alonso, A.; de la Rúa, C.**  
2005 “Temporal mitochondrial DNA variation in the Basque Country: influence of post-neolithic events”, *Annal of Human Genetics* 69, 665-679
- Alzualde, A.; Izagirre, N.; Alonso, S.; Alonso, A.; Albarran, C.; Azkarate, A.; de la Rúa, C.**  
2006 “Insights into the “isolation” of the Basques: mtDNA lineages from the historical site of Aldaieta (6th-7th centuries AD)”, *American Journal of Physical Anthropology* 130, 394-404
- Alzualde, A.; Izagirre, N.; Alonso, S.; Rivera, N.; Alonso, A.; Azkarat, A.; de la Rúa, C.**  
2007 “Influences of the European Kingdoms of Late Antiquity on the Basque Country: An Ancient DNA Study”, *Current Anthropology* 48, 155-162.
- Anderson, S.; Bankier, A. T.; Barrell, B. G.; de Bruijn, M. H.; Coulson, A. R.; Drouin, J.; Eperon, I. C.; Nierlich, D. P.; Roe, B. A.; Sanger, F.; Schreier, P. H.; Smith, A. J.; Staden, R.; Young, I.G.**  
1981 “Sequence and organization of the human mitochondrial genome”, *Nature* 290, 457-465.
- Andrews, R. M.; Kubacka, I.; Chinnery, P. F.; Lightowlers, R.N.; Turnbull, D. M.; Howell, N.**  
1999 “Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA”, *Nature Genetics*, 23: 147.
- Bandelt, H. J.**  
2005 “Mosaics of ancient mitochondrial DNA: positive indicators of nonauthenticity”. *European Journal of Human Genetics* 13, 1106-1112.
- Cal Teba M. L.**  
2001 *Análisis de Polimorfismos Microsatélite de Cromosoma Y. Estudio de la Población de Galicia y de la Aplicación Forense*. Tesis Doctoral, Universidad de Santiago de Compostela.
- Cooper, A.; Poinar, H. N.**  
2000 “Ancient DNA: do it right or not at all”, *Science* 289, 1139.
- Cooper, A.**  
1994 “Contamination and negative results in ancient DNA studies and amber research”, *Ancient DNA Newsletter* 2, 5-7.
- Gilbert, M. T.; Bandelt, H. J.; Hofreiter, M.; Barnes, I.**  
2005 “Assessing ancient DNA studies”, *Trends Ecology Evolution* 20, 541-544.
- Gilbert, M. T.; Hansen, A. J.; Willerslev, E.; Rudbeck, L.; Barnes, I.; Lynnerup, N.; Cooper, A.**  
2003 “Characterization of genetic miscoding lesions caused by postmortem damage”, *American Journal of Human Geneicst* 72, 48-61
- Gilbert, M. T.; Willerslev, E.**  
2006 “Authenticity in ancient DNA studies DNA studies”, *Medicinal Scol* 18, 701-723.

- Handt, O.; Höss, M.; Krings, M.; Pääbo, S.**  
1994 "Ancient DNA: methodological challenges", *Experientia* 50, 524-529.
- Hervella, M.; Izagirre, N.; Alonso, S.; de la Rúa, C.**  
2009 "Enterramientos en fosa en el Neolítico antiguo en Navarra: evaluación de las evidencias arqueológicas mediante el estudio antropológico y molecular", *Revista Española de Antropología Física* 30, 31-38.
- Hervella, M.; Izagirre, N.; Alonso, S.; de la Rúa, C.**  
2010 "Primeros datos genéticos del Neolítico Antiguo de Navarra", *Munibe, Antropología-Arqueología* 61, 15-23.
- Hofreiter, M.; Jaenicke, V.; Serre, D.; Haeseler Av, A.; Pääbo, S.**  
2001 "DNA sequences from multiple amplifications reveal artefacts induced by cytosine deamination in ancient DNA". *Nucleic Acids Reserchs* 29, 4793-4799.
- Izagirre, N.; Alzualde, A.; Alonso, S.; Paz, L.; Alonso, A.; de la Rúa, C.**  
2005 "Rare haplotypes in mtDNA: applications in the analysis of biosocial aspects of past human populations". *Human Bioogyl* 77, 443-456.
- Lindahl, T.**  
1993 "Instability and decay of the primary structure of DNA", *Nature* 362, 709-715.
- Malmström, H.; Stora, J.; Dalen, L.; Holmlund, G.; Gotherstromm, A.**  
2005 "Extensive human DNA contamination in extract ancients dog bones and teeth", *Molecular Biology Evoution* 22, 2040-2047.
- Malyarchuk BA, Grzybowski T, Derenko MV, Czarny J, Wozniak M, Miscicka-Sliwka D.**  
2002 "Mitochondrial DNA variability in Poles and Russians", *Annals Human Genetics* 66: 261-283.
- Pääbo S.; Gifford J.; Wilson A. C.**  
1988 "Mitochondrial DNA sequences from a 7000-year old brain", *Nucleic Acids Research* 16, 9775-9787.
- Pääbo, S.**  
1989 "Ancient DNA: extraction, characterization molecular, cloning and enzymatic amplification", *Proceeding National Academic Science of U S A.* 86, 1939-1943.
- Pääbo, S.; Higuchi, R. G.; Wilson, A. C.**  
1989 "Ancient DNA and the polymerase chain reaction. The emerging field of molecular archaeology", *Journal of Biology Chemistry* 264, 9709-9712.
- Pääbo, S; Wilson, A. C.**  
1991 "Miocene DNA sequences - a dream come true?", *Current Biology* 1, 45-46.
- Pääbo, S.; Poinar, H.; Serre, D., Jaenicke-Despres, V.; Hebler, J.; Rohland, N.; Kuch, M.; Krause, J.; Vigilant, L.; Hofreiter, M.**  
2004 "Genetic analyses from ancient DNA". *Annals Review Genetic* 38, 645-679.
- Poinar, H. N.; Hoss, M.; Bada, J. L., Pääbo, S.**  
1996 "Amino acid racemization and the preservation of ancient DNA". *Science* 272, 864-866.
- de la Rúa, C.; Cuende, M.; Duran, L. M.; Izagirre, N.**  
1997 "Estudio antropológico de los restos humanos del yacimiento de Urratxa III (Orozko, Bizkaia). En "El Yacimiento de la cueva de Urratxa III (Orozko, Bizkaia)". *Cuadernos de Arqueología. Universidad de Deusto (Bilbao). Cap 9, 207-241.*
- Sampietro, M. L.; Caramelli, D.; Lao, O.; Calafell, F.; Comas, D.; Lari, M.; Agustí, B.; Bertranpetit, J.; Lalueza-Fox, C.**  
2005 "The genetics of the pre-Roman Iberian Peninsula: a mtDNA study of ancient Iberians", *Annals of Human Genetics* 69, 1-14.
- Sampietro, M. L.; Lao, O.; Caramelli, D.; Lari, M., Pou, R.; Marti, M., Bertranpetit, J., Lalueza-Fox, C.**  
2007 "Palaeogenetic evidence supports a dual model of Neolithic spreading into Europe", *Proceeding Biology Science* 274, 161-2167.
- Tuross, N.**  
1994 "The biochemistry of ancient DNA in bone", *Experientia* 50, 530-535.
- Willerslev, E.; Cooper, A.**  
2005 "Ancient DNA", *Proceeding Biology* 272, 3-16.

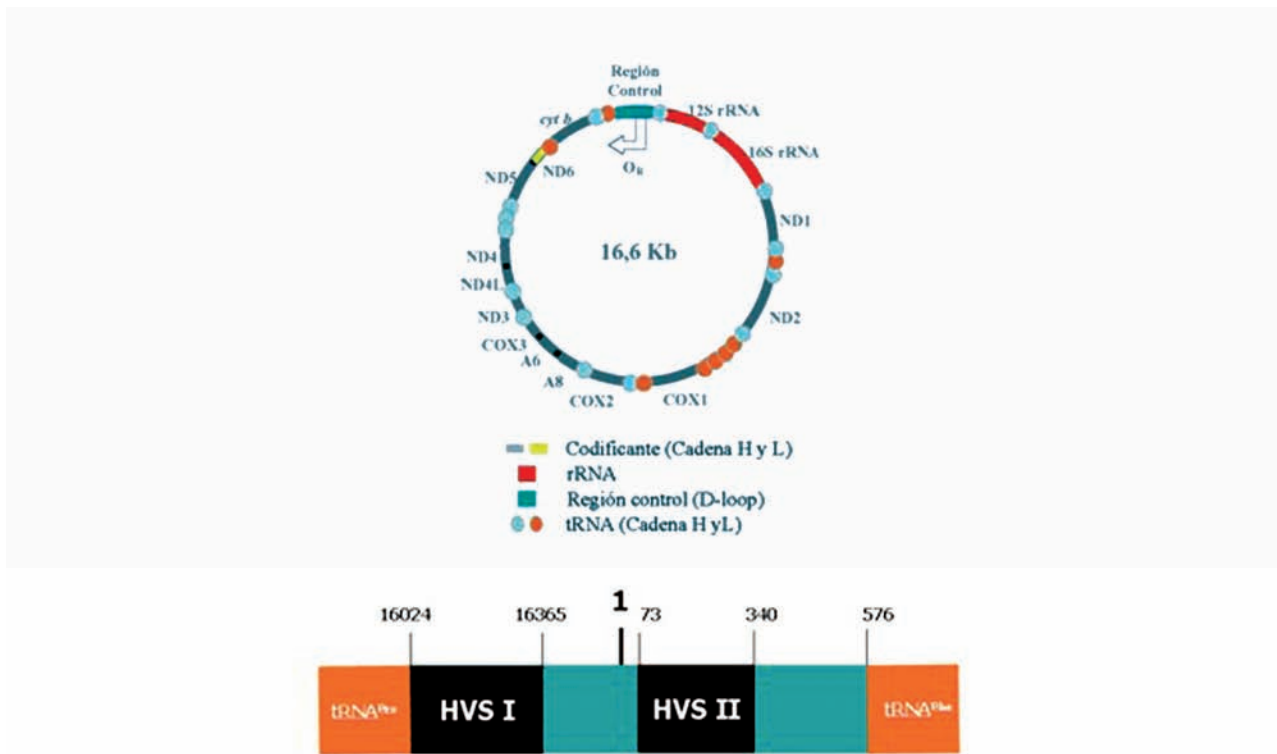


Figura 1. ADN mitocondrial humano. a) Esquema del genoma mitocondrial. b) Región control

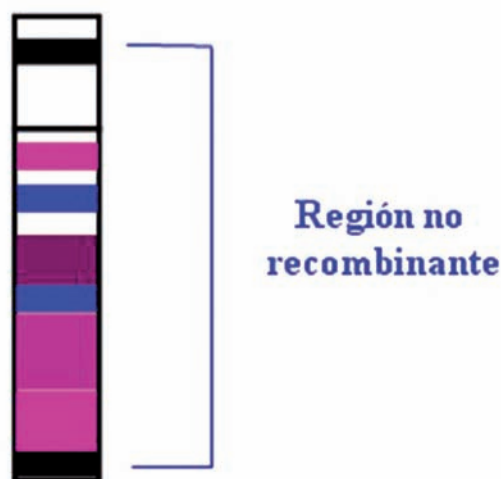


Figura 2. Esquema de la región no recombinante del cromosoma Y humano. Figura modificada de Cal Teba 2001