

EL ADN ANTIGUO UNA HERRAMIENTA PARA DESCIFRAR LA HISTORIA

Ancient DNA as a Tool to Decipher the History

MARÍA SAIZ *, MARÍA JESÚS ÁLVAREZ-CUBERO *, LUIS JAVIER MARTÍNEZ-GONZÁLEZ **, JUAN CARLOS ÁLVAREZ * y JOSÉ ANTONIO LORENTE ***

RESUMEN Gracias a la evolución de las técnicas biomoleculares como la PCR, campos como la medicina forense y la biomedicina han mejorado la calidad de los análisis genéticos. Actualmente, incluso es posible obtener ADN de especies ya extinguidas; este tipo de ADN se llama ADN antiguo (aDNA). El análisis del aDNA ha sido de gran ayuda en la antropología y la ciencia forense. Importantes casos históricos han sido resueltos gracias a este tipo de técnicas como la identificación de los restos óseos de Cristóbal Colón y la dinastía Romanov entre otros. El principal objetivo de este artículo es hacer una introducción detallada del aDNA, sus aplicaciones y las principales ventajas e inconvenientes que se encuentran al trabajar con este tipo de ADN.

Palabras clave: ADN antiguo (aDNA), Estrategias forenses, Extracción de ADN, Contaminación, Inhibición.

ABSTRACT The evolution of biomolecular techniques, as the PCR; has improved the quality of genetic analysis in fields like forensic science and biomedicine. To these days, it is possible to obtain DNA from extinguished species; called ancient DNA (aDNA). The analysis of aDNA has been really helpful in anthropology and forensic sciences. Some important historical cases have been elucidated through these techniques as the identification of remains of Christopher Columbus and the Romanov dynasty. The main aim of this paper is to introduce in detail ancient DNA, its applications and the main advantages and disadvantages of working with this type of DNA.

Key words: Ancient DNA (aDNA), Forensic Strategies, DNA Extraction, Pollution, Inhibition.

* Laboratorio de Identificación Genética. Departamento de Medicina Legal, Toxicología y Antropología Física. Facultad de Medicina. Universidad de Granada. 18071 Granada. España. msaiz@ugr.es, mjesusac@ugr.es, juanca@ugr.es, jlorente@ugr.es

** Centro Pfizer. Universidad de Granada. Junta de Andalucía de Genómica e Investigación Oncológica, GENYO. Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud. Avenida de la Ilustración 114, 18007 Granada. España. luisjavier.martinez@genyo.es

Fecha de Recepción: 27-09-2012. Fecha de aceptación: 28-06-2013.

INTRODUCCIÓN

Nuestro conocimiento de la vida pasada se basa principalmente en los fósiles, el único testigo de especies extinguidas, cuyo análisis filogenético ha sido facilitado tras el descubrimiento de que el ADN se encuentra preservado en muchas ocasiones. De hecho, se ha encontrado ADN en restos fósiles óseos de 130.000 años en regiones templadas. La posibilidad de recuperar información genética a partir de restos óseos y piezas dentales ha abierto nuevas perspectivas dentro del campo de la arqueología, paleontología y antropología dando respuestas a preguntas cuando el enfoque clásico de estas disciplinas no puede (Pruvost *et al.*, 2007:739) así como en determinados ámbitos de la medicina forense (García, 2010:1).

Con la llegada de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) hace más de 20 años, se han realizado grandes avances en las técnicas de biología molecular en el estudio del ADN antiguo y forense. La comunidad genética forense y del ADN antiguo comparten metodología y aproximaciones científicas (Jobling *et al.*, 2003). Con el aumento de la sensibilidad en técnicas de biología molecular, se puede determinar el perfil genético de muestras con un bajo número de copias de ADN (Van Oorschot *et al.*, 2010:1-17). Tanto en los análisis forenses como en análisis de ADN antiguo, encontraremos muy poca cantidad de muestra, estará degradada o alterada químicamente. Por ello, el problema de la contaminación se evalúa de forma continua mediante el uso de controles al trabajar con muestras con bajo número de copias o con degradación de ADN.

ADN NUCLEAR PARA EL ESTUDIO DE MUESTRAS ANTIGUAS

En 1953, Watson y Crick describieron por primera vez la estructura del ADN (Watson y Crick., 1953:737-738). El ADN nuclear está formado por una hélice de doble cadena, donde éstas permanecen unidas mediante un proceso de hibridación. Estas dos hebras son antiparalelas y complementarias, por lo que conociendo la secuencia de una hebra podemos determinar la secuencia de la otra hebra. El ADN nuclear de cada célula mide aproximadamente dos metros de longitud (Alberts *et al.*, 2007:1300) pero se encuentra dividido y muy compactado en los cromosomas, que son unas estructuras muy densas formadas por ADN y proteínas. Se conoce que un 25% del genoma nuclear está formado por genes y secuencias codificantes que tienen la propiedad de producir las proteínas que actuarán en los distintos niveles del organismo. Este tipo de ADN se llama ADN codificante o expresivo.

Pero no todo el ADN que conforma el genoma es codificante; un 75% de todo el material genético de un individuo corresponde a ADN que no tiene expresión génica. Se ha comprobado que este ADN no codificante tiene gran importancia a nivel promotor, regulador y estructural. De este 75%, un 60% corresponde a secuencias de copia única y hasta un 40% a secuencias repetitivas de ADN.

A comienzos de los 80, R. Higuchi publicó, en la revista *Nature*, la secuencia de un fragmento de 229 pb de ADN mitocondrial (ADNmt) a partir de piel momificada de un *Equus quagga*; un animal extinguido relacionado con las cebras, de aproximadamente 140 años de antigüedad (Higuchi *et al.*, 1984:282-284). Desde este momento

las investigaciones con ADN recuperado de restos antiguos comenzaron a hacerse cada vez más numerosas.

A finales de los 80, Hagelberg y posteriormente Hänni describieron la extracción de ADN humano y su posterior caracterización, el primero en tejido óseo y el segundo en dientes, de ADN procedente de muestras con diferentes datas, desde 150 a 5500 años de antigüedad. Estos trabajos demostraban que el ADN podía ser recuperado utilizando procedimientos de biología molecular en muestras de distinta índole y con distintas datas (Hänni *et al.*, 1990:365; Hagelberg y Clegg., 1991:45-50).

De forma simultánea a los estudios de Hagelberg y Hänni; S. Pääbo presentó sus resultados al obtener secuencias de ADN a partir de restos humanos antiguos mediante la clonación de secuencias repetitivas Alu (ADN nuclear), a partir de piel de momias egipcias de 2500 años de antigüedad (Pääbo, 1985:411-417 y 644-645).

Los avances en la recuperación de ADN a partir de restos arqueológicos suscitaron grandes expectativas en la comunidad científica, pero rápidamente fueron disuadidas debido a las dificultades en su reproducibilidad. Posteriormente y gracias a la aparición de una nueva técnica molecular basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se proporcionaron nuevas perspectivas en este campo.

A lo largo de estas últimas tres décadas se han desarrollado numerosas investigaciones en el área del aDNA; obtener secuencias aminoacídicas de animales, plantas y bacterias antiguas ha aportado datos importantes para discernir las relaciones filogenéticas de animales actuales y extinguidos (Hagelberg *et al.*, 1994:25-26; Krajewski *et al.*, 1997:911-917).

El estudio del ADN de restos humanos ha sido también en estos últimos años un gran campo de estudio, lo que ha proporcionado pruebas para apoyar teorías en el origen de nuestra especie como la discontinuidad genética existente entre el hombre de Cromañón y el Hombre de Neanderthal (Schmitz *et al.*, 2002:13342-13347; Caramelli *et al.*, 2003:6593-6597) o descifrar la secuencia del Hombre de Neandertal. También estos estudios en aDNA han apoyado la reconstrucción de las relaciones filogenéticas entre poblaciones humanas, estableciendo flujos genéticos desde África hasta la colonización del nuevo mundo (Stone y Stoneking., 1993:463-471; Izagirre y De La Rúa., 1999:199-207).

Además de las aplicaciones en Antropología, el aDNA ha supuesto un gran avance en el ámbito forense. Las nuevas técnicas en el campo del aDNA han contribuido al esclarecimiento de importantes casos donde se han identificado cadáveres antiguos utilizando el análisis de STRs autosómicos (Hagelberg y Clegg., 1991:45-50).

El análisis genético a partir de restos antiguos, también ha permitido elucidar casos de personajes históricos como la identificación de los restos de la familia Romanov (Gill *et al.*, 1994:130-135).

Desafortunadamente, el estudio del aDNA presenta cuatro grandes dificultades; la escasez, la fragmentación de las cadenas, las modificaciones moleculares y la presencia de inhibidores de la PCR en los extractos. Además de éstos, la contaminación del material genético antiguo con ADN exógeno, han puesto en duda la autenticidad de muchas investigaciones (Pääbo *et al.*, 1989:9709-9712; Gilbert *et al.*, 2003:32-47 y 48-61; Pääbo *et al.*, 2004:645-679).

ADN repetido para el estudio de muestras antiguas

Un 10% de las secuencias repetitivas son repeticiones en tándem, entre los que encontramos los microsatélites. Son secuencias altamente polimórficas y denominadas STR (Short Tandem Repeat). El alto grado de polimorfismo de los loci STRs se debe a la variación en el número de unidades de repetición (Litt y Luty, 1989:397-401; Weber y May, 1989:338-396). Además las secuencias STRs varían también en la longitud de la unidad de repetición y el rigor con el que se conforma el modelo de repetición. Las unidades “simples” contienen repeticiones de idéntica longitud y secuencia; las “complejas” contienen varios bloques de repetición de unidades de longitud variable, junto con mayor o menor variación de las secuencias.

Los STRs son fragmentos de ADN de diferente longitud en los que la unidad de repetición contiene de 2 a 5 nucleótidos y constituyen elementos extraordinariamente útiles en el mapeo genético y la identificación humana. Cada uno de estos fragmentos, localizado en un cromosoma concreto, se denomina marcador genético y las formas o variantes que puede adoptar dicho marcador se denominan alelo. Si una persona presenta el mismo número de copias en los dos alelos se denomina homocigoto. Si presenta diferente número de copias en cada alelo, se conoce como heterocigoto. El genotipo obtenido para un conjunto de loci implicados en el análisis forense se llama perfil genético. Las repeticiones de trinucleótidos o tetranucleótidos son comparativamente raras pero poseen un alto grado de polimorfismo. Por ello, sobre estos se actúa en la actualidad en genética forense para diferenciar individuos entre sí. Entre los STRs podemos diferenciar STRs autosómicos y STRs de cromosoma Y.

STRs autosómicos

Los STRs autosómicos son numerosos por todo el genoma y han sido descritos en regiones génicas y extragénicas. Los situados en regiones génicas están presentes tanto en intrones y secuencias flanqueantes como en regiones codificantes. El alto grado de polimorfismo de los loci STRs se debe a la variación en el número de unidades de repetición (Litt y Luty, 1989:397-401; Weber y May, 1989:338-396; Economou *et al.*, 1990:2951-2954). Además las secuencias STRs varían también en la longitud de la unidad de repetición y el rigor con el que se conforma el modelo de repetición. Los STRs autosómicos son los marcadores de elección en estudios de criminalística, investigación de la paternidad e identificación genética. Además, el estudio de estos marcadores en prácticamente todas las poblaciones mundiales ha permitido establecer una distribución geográfica de determinados alelos. (Brinkmann, 1996:175-182); (Czarny *et al.*, 2005:97-100).

STRs de cromosoma Y

Los STRs de cromosoma Y son los marcadores más informativos para la identificación individual. El cromosoma Y sigue una herencia en bloque exclusivamente

paterna por lo que el estudio de este tipo de marcadores genéticos nos permite establecer el linaje paterno de las muestras. Al ser haploide, no tiene homólogo, con lo cual su recombinación está en su mayoría impedida (en un 90%). Los STRs de cromosoma Y, además de en casos de criminalística e investigación de la paternidad, son ampliamente empleados en estudios de evolución ya que los grupos de ligamiento ancestrales que reflejan el origen del cromosoma Y se encuentran conservados a lo largo de la evolución. Este cromosoma ha adquirido numerosas secuencias procedentes de diversos orígenes, por tanto, es un cromosoma moderno que ha alcanzado su conformación actual durante la evolución desde los grandes monos hasta el hombre. Es probable que los estudios del cromosoma Y contribuyan a una mayor comprensión de los orígenes de los humanos modernos (Jobling y Tyler-Smith, 1995:799-803). Otra aplicación importante de los STRs de cromosoma Y es en genética de poblaciones ya que dependiendo de la población, las frecuencias de los Y-STRs poseen una distribución variable (Jobling y Tyler-Smith, 2003:598-612). Desde el descubrimiento de los Y-STR, se han estudiado numerosos grupos poblacionales para validar muchos de los marcadores en el campo forense (Richards y Sutherland, 1992:7-9; Roewer y Carracedo, 2001:105; Roewer *et al.*, 2001:106-113; Kayser *et al.*, 2002:513-519; Lessig *et al.*, 2003:S160-S163). Estas variaciones también se han aplicado en genética de poblaciones y antropología molecular (Ciminelli *et al.*, 1995:966-973; Pérez-Lezaun *et al.*, 1997:265-270). La alta tasa de mutación de éstos nos proporciona una información muy adecuada para diferenciar poblaciones cercanas desde el punto de vista filogenético. Además, debido a la concordancia entre la herencia del apellido y la de las regiones no recombinantes del cromosoma Y hace de éstas una herramienta idónea para realizar estudios de genealogía (Jobling, 2001:353-357; King y Jobling, 2009:351-360). Por último, se está generalizando el uso de estos marcadores por su asociación con numerosas enfermedades. El uso de Y-STRs, X-STRs y ADNmt puede ayudar a asociar las enfermedades con haplogrupos o incluso con haplotipos particulares, para así poder realizar un perfecto diagnóstico de los pacientes a la hora de realizar un panel de marcadores genéticos (Rebeck *et al.*, 2004:681-687; Kim *et al.*, 2007:172; Romero *et al.*, 2008:37-43). También se están descubriendo como una herramienta para poder asociar enfermedades hereditarias (Shrestha *et al.*, 2005:29-38), sobre todo en aquellas con mayor incidencia en varones como puede ser el cáncer de próstata (Krausz *et al.*, 2004:573-583; Lindström *et al.*, 2008:6712-6716).

ADN mitocondrial para el estudio de muestras antiguas

El ADN mitocondrial (ADNmt) es el genoma eucariótico mejor estudiado, se conoce su estructura y secuencia completa en casi todos los organismos. En el caso de la especie humana es doble, circular cerrado y con una longitud de 16.569 pares de bases (pb). Sus dos cadenas son complementarias y antiparalelas, asemejándose más a un ADN bacteriano que al ADN nuclear que está estrechamente asociado con proteínas y repartido en cromosomas.

Según la hipótesis endosimbionte, las mitocondrias provienen de una bacteria “independiente”. Ésta sería la explicación de que posean su propio material genético,

el ADNmt y su maquinaria para expresarlo. La región codificante contiene 37 genes, de los cuales 22 son para ARN de transferencia, 2 para ARN ribosómicos y 13 para proteínas implicadas en la fosforilación oxidativa y en la producción de ATP (Anderson *et al.*, 1981:457-465).

La regulación de la molécula de ADNmt se sitúa en la región control con aproximadamente 1122 pares de bases de longitud y contiene los promotores de transcripción de ambas cadenas y el origen de replicación de la cadena pesada. Se encuentra entre la posición 16024 y la 16569 continuando desde la posición 1 hasta la 576.

La región control tiene una alta variabilidad entre individuos por lo que se ha convertido en objeto de análisis en estudios antropológicos e investigación en genética forense. Se divide en otras regiones en función de su grado de variabilidad. Las más estudiadas y conocidas por su alto grado de variabilidad son la región hipervariable 1, HV1 (16024-16365), la región hipervariable 2, HV2, (73 a la 340), y una tercera región hipervariable, menos utilizada, HV3, (440-560) (Lutz *et al.*, 2000:155-161). Existe una mayor variabilidad en la HV1 que en la HV2, por lo tanto ha sido el más usado en estudios de poblaciones humanas y del que se tiene una mayor información (Handt *et al.*, 1998:126-129).

Características del ADN mitocondrial

Este tipo de ADN presenta ciertas características que lo hacen especialmente útil para estudios de identificación y evolución molecular:

- Alto número de copias en cada individuo: Hay entre 10 y 100 mitocondrias por célula y dentro de cada mitocondria entre 10 y 100 copias de ADNmt (Shuster *et al.*, 1988:1360-1365; Clayton, 1992:439-447). El resultado de este alto número de copias es que al intentar obtener ADNmt de una muestra siempre es mucho más sencillo que obtener ADN nuclear, lo que le confiere una gran utilidad en muestras de restos mínimos y/o antiguos.
- Transmisión exclusiva por vía materna: el ADNmt de hermanos, de hijos y madre y en general de aquellos individuos relacionados por vía materna es idéntico siempre y cuando no se den mutaciones (Wallace y Torroni, 1992:403-416; Wallace, 1992:628-632; Parsons *et al.*, 1997:362-367).
- Caracterización completa de su genoma en 1980 por el grupo de Frederick Sanger en Cambridge (Anderson *et al.*, 1981:457-465).
- Presencia de numerosos polimorfismos.
- Rápida tasa de evolución: ADNmt tiene una alta tasa de mutación, de 5-10 veces mayor que el ADN nuclear. Esta característica hace del ADNmt una herramienta muy útil para el análisis con fines de identificación y también para el estudio del proceso evolutivo (Brown *et al.*, 1979:1967-1971). La fácil aparición de mutaciones y la fijación de éstas produce una alta hipervariabilidad entre la población humana.

Polimorfismos de ADN mitocondrial

Las sustituciones puntuales son la mayor parte de los polimorfismos del ADNmt, aunque también existen deleciones e inserciones de una o varias pares de bases (Cann y Wilson, 1983:699-711; Howell y Smejkal, 2000:1589-1598).

Para el estudio de la variabilidad mitocondrial humana, la secuenciación de ciertas regiones del ADNmt (HVS I y/o HVS II) es la forma más habitual de detectar sustituciones puntuales. Con la secuenciación de la totalidad o de las regiones con más variabilidad del genoma mitocondrial se encuentran cambios nucleotídicos o mutaciones en la secuencia de bases lo que define los haplotipos mitocondriales.

Wesley Brown y Douglas Wallace, a finales de los años 70, aplican por primera vez el ADNmt como marcador molecular para la reconstrucción del pasado de las poblaciones humanas (Brown *et al.*, 1979:1967-1971; Giles *et al.*, 1980:9611-9615).

Las principales aplicaciones de los polimorfismos de ADN mitocondrial son:

- Investigación de la hermandad y maternidad: El estudio del ADNmt complementa al análisis de polimorfismos del ADN nuclear. Es de gran importancia en el estudio de parentesco entre familiares relacionados por vía materna, cuando no se cuenta con familiares de primer grado y se ha de recurrir al estudio de familiares lejanos (Paabo, 1989:1939-1943 y 9709-9712; Paabo *et al.*, 1990:4718-4721) o bien cuando se ha de realizar identificación de restos óseos contando con parientes maternos, donde habitualmente la cantidad de ADN nuclear esperada es baja o muy baja (Gill *et al.*, 2004:51-53).
- Criminalística: En ocasiones es la única información que se puede conseguir, bien sea por la escasa cantidad de la muestra (ejem: pelos sin bulbo) o por su altísima degradación. De este modo, cuando un sospechoso posee un haplotipo de ADNmt diferente al de un indicio biológico, hay una buena razón para su exclusión, al igual que ocurre con otros sistemas basados en el tipado de ADN.
- Evolución y genética de poblaciones: La caracterización del ADNmt en poblaciones humanas, tanto actuales como antiguas, en otros primates, y en fósiles del género *Homo*, ha contribuido, en las últimas décadas, a aclarar cuestiones centrales de la evolución humana (Cavalli-Sforza y Feldman, 2003:267). Asimismo, el ADNmt destaca como uno de los sistemas más utilizados en la caracterización genética de las poblaciones humanas, habiendo sido aplicado como herramienta filogenética (Richards *et al.*, 1998:251-254; Richards *et al.*, 2000:241-260; Finnilä *et al.*, 2001:31-39; Herrnstadt *et al.*, 2002:1152-1171; Kong *et al.*, 2003:671-676). La variación en el ADNmt puede ser usada para construir árboles filogenéticos, o varios árboles alternativos dispuestos en una red (Bandelt *et al.*, 1995:37-60; Bandelt *et al.*, 1995:743-753; Bandelt y Chepoi, 2000:701-714; Bandelt *et al.*, 2000:8-28), que describen la relación entre secuencias individuales. También es una herramienta muy utilizada en la caracterización genética e inferencia del origen e historia demográfica de numerosas poblaciones antiguas y modernas de los diferentes continentes.
- Estudios de asociación a enfermedades: Como se cita en las aplicaciones de los STRs en cromosomas sexuales, la asociación de genes a enfermedades está

muy ligada al estudio de las poblaciones. Por eso el ADNmt es una herramienta muy importante al igual que los STRs en cromosomas sexuales, debido a sus similitudes.

Haplogrupos

Mediante dos diferentes métodos moleculares se consiguió caracterizar la variabilidad genética del ADNmt humano. En primer lugar, se realizaron análisis de los polimorfismos con enzimas de restricción, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) (Cann y Wilson, 1983:699-711; Scozzari *et al.*, 1988:534-544; Torroni *et al.*, 1992:153-162) y posteriormente se llevo a cabo la secuenciación directa de las regiones HVI y HV2 (Vigilant *et al.*, 1991:1503-1507) y del genoma completo (Kivisild *et al.*, 2006:149-179) (tabla 1).

Estos estudios han determinado una misma unidad monofilética, llamada haplogrupo, que resultan ser específicos de variantes geográficas diferentes de la especie humana (fig.1). En la actualidad los estudios se realizan mediante análisis completos del ADN mitocondrial, secuenciando todo su genoma, gracias al abaratamiento de las técnicas así como a la aparición de las técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS) (Li *et al.*, 2010:237-249).



Fig. 1.—Mapa de la evolución y migración de los principales haplogrupos mitocondriales.

TABLA 1
PRINCIPALES HAPLOGRUPOS MITOCONDRIALES Y SU LOCALIZACIÓN

<i>Haplogrupo</i>	<i>Localización</i>
A	Asia Oriental y nativos americanos de América del Norte.
B	Eurasia Oriental, América, Oceanía y Madagascar.
C	Amerindios y Eurasia Oriental, predomina en Siberia y está en menor frecuencia en Asia Oriental y Asia Central.
CZ	Predomina en Siberia y está en menor frecuencia en Asia Oriental, Sudeste de Asia y Asia Central.
D	Extremo Oriente y pueblos indígenas americanos.
E	Archipiélago malayo.
F	Asia Oriental y Sudeste de Asia, Sur de Siberia y Este de la India.
G	Asia.
H	Europa, sobretodo Europa Occidental.
HV	Europa, Medio Oriente, Norte África y Asia Central.
I	Europa.
J	Medio Oriente y Arabia Saudita.
JT	Medio Oriente; siendo también importante en Europa, Siberia Occidental, Asia Central y África del Norte.
K	Europa.
L	África Subsahariana.
M	Eurasia Oriental.
N	Presente en todos los continentes.
P	Aborígenes australianos y melanesios.
Q	Oceanía.
R	Europa.
R0	Europa, Medio Oriente, Norte de África y Asia Central.
S	Nativos australianos.
T	Eurasia Occidental.
U	Eurasia Occidental.
W	Europa.
X	Eurasia Occidental y de poblaciones nativas de América del Norte.
Y	Extremo Oriente.
Z	Siberia, Asia Oriental y Sudeste de Asia, llegando por el Oeste hasta Escandinavia.

Desde que se comenzaron a estudiar las variaciones en la secuencia del ADNmt, se observó que existe una correlación entre los polimorfismos de las regiones variables y la distribución geográfica de las mismas, pudiéndose observar un patrón de cambio según la aparición de nuevos grupos poblacionales. Estas variaciones son un registro en la actualidad de eventos que ocurrieron en el pasado (Torroni *et al.*, 1996:1835-1850). Algunas sustituciones ayudan a definir subgrupos dentro de los haplogrupos, lo que también explica cómo han evolucionado estos grupos poblacionales.

En la bibliografía es frecuente relacionar la edad de los haplogrupos mitocondriales con la edad de una determinada población y que la expansión de cada haplogrupo refleje una migración diferente. Cuando ocurre una migración en una determinada población, ésta tiene lugar con todos sus haplogrupos y no con uno sólo, por tanto, la edad de los linajes matrilineales viene determinada desde el momento en que tienen lugar los sucesos mutacionales y no cuando tiene lugar la migración (Pakendorf y Stoneking, 2005:165-183). Los procesos de diferenciación molecular ocurren, principalmente, durante y después de las colonizaciones y distribución de los grupos humanos entre y dentro de los continentes, razón por la cual los haplogrupos y subhaplogrupos son restringidos a distintas áreas geográficas (Achilli *et al.*, 2005:883-886).

El ADNmt sólo preserva una parte de la historia de una población, por lo que, el estudio de la variabilidad de los linajes maternos se ha complementado con datos provenientes del análisis de la región no-recombinante del cromosoma Y. El estudio de ambos sistemas genéticos permite determinar las genealogías maternas y paternas de forma separada y sin los problemas inherentes a la recombinación, siendo además, complementado con el aporte de la información de los STRs de cromosomas autosómicos. Obviamente, está claro que en aDNA esto no es especialmente fácil y en algunos casos resulta prácticamente imposible.

USO DE MARCADORES GENÉTICOS EN ESTUDIOS EN LA PENÍNSULA IBÉRICA

Las poblaciones actuales muestran “marcas genéticas” del pasado que se deben a eventos genéticos importantes ocurridos en el pasado. Entre ellas se encuentran aquellas establecidas por antiguas migraciones importantes y las diferencias locales en las poblaciones debidas a las barreras geográficas que aislarán produciendo distancias entre los grupos poblacionales.

En la actualidad, se pueden detectar patrones genéticos en las poblaciones de la Península Ibérica que muestran un mapa que resume el paso del tiempo y de las poblaciones que han habitado o transitado por nuestra región. Son muchos los estudios que resumen el pasado de nuestra Península, pero muy pocos los realizados con muestras antiguas. El problema de no analizar muestras antiguas es que podemos detectar los eventos genéticos de cierta magnitud desde un punto de vista demográfico y poblacional (muchos individuos, mucho tiempo), o con poblaciones que tienen diferencias genéticas muy definidas. Además de estas premisas de partida, las consecuencias genéticas de estos eventos no deben ser enmascaradas por el intercambio genético posterior con poblaciones vecinas (Bertranpetit y Cavalli-Sforza, 1991:51-67). A pesar del escaso

número de estudios sobre la Península Ibérica realizados en este contexto, se ha podido dar mucha información sobre los eventos ocurridos en ella.

Los primeros estudios en la Península Ibérica incluyeron análisis de frecuencias de marcadores autosómicos Alu, polimorfismos de inserción, y polimorfismos en el ADN mitocondrial (mtDNA) y cromosoma Y (Reyment, 1983:505-521; Côrte-Real *et al.*, 1996:331-350; Fernández-Santander *et al.*, 1999:745-752; Rickards *et al.*, 2000:175-183; Semino *et al.*, 2000:1155-1159; Bosch *et al.*, 2001:1019-1029; Brion *et al.*, 2003:147-161; Cavalli-Sforza *et al.*, 2007). Estos estudios revelan que la Península Ibérica se considera como la región con menor impacto Neolítico, aunque la mayoría de los estudios complementan la genética con evidencias arqueológicas. Múltiples estudios muestran como la población del País Vasco diverge de otras poblaciones europeas ya que tiene una gran proporción de alelos ancestrales procedentes del Paleolítico y una baja diversidad genética (Iriondo *et al.*, 2003:73-84; Rodríguez-Ezpeleta *et al.*, 2010:113-117). Sin embargo, la presencia en la alta frecuencia de un número de haplotipos raros, tanto en mtDNA y análisis de cromosoma Y, sugiere que la deriva genética puede haber acentuado su carácter distintivo. Debido a su variación genética característica, los vascos a menudo han recibido una considerable atención en los estudios genéticos de Europa Occidental, en detrimento de la caracterización genética del resto de poblaciones ibéricas (Côrte-Real *et al.*, 1996:331-350; Cavalli-Sforza *et al.*, 1997:247-254; Lucotte y Loirat, 1999:431-437; Rickards *et al.*, 2000:175-183; Larruga *et al.*, 2001:708-716).

Fuera de un contexto europeo, algunos estudios han investigado el grado de flujo de genes africanos en la Península Ibérica. Muchos estudios han buscado rastros de mezcla, con las poblaciones del norte de África, e incluso han podido establecer un límite genético coincidiendo con el estrecho de Gibraltar (Bosch *et al.*, 2001:1019-1029; Pereira *et al.*, 2005:213-229). Aunque estos estudios indican la presencia de algunos linajes del norte de África en la Península Ibérica, se ha comprobado que la influencia es mucho más limitada de lo que se pensaba o esperaba.

Enfoques más actuales han permitido establecer la posible contribución de poblaciones más actuales en el tiempo, e intentar discernir la compleja historia reciente. En la Península han residido durante un largo periodo de tiempo varias poblaciones muy desiguales con orígenes geográficos, culturales y religiosos distintos, características del norte de África, musulmanes y los judíos sefarditas (Adams *et al.*, 2008:725-736). En este trabajo se analizaron los haplotipos del cromosoma Y, donde sus proporciones en las frecuencias y en los haplotipos encontrados revelaron un alto nivel de conversión religiosa, impulsada por episodios históricos en el caso de los judíos. El análisis de la distribución de haplotipos y la diversidad dentro de los haplogrupos específicos sugiere que el componente judío sefardí es el más antiguo de los encontrados en la Península. Por otro lado, la distribución geográfica de los componentes genéticos africanos en la Península no refleja la colonización inicial y la posterior retirada de estos pueblos y las proporciones observadas de estos componentes en las poblaciones actuales son producto de la deriva genética en cada zona geográfica no coinciden con la entrada y salida de los musulmanes de la Península.

METODOLOGÍA

El éxito en la obtención de información genética a partir de material antiguo está condicionado por factores como el tipo de material de estudio, las condiciones del enterramiento y las condiciones de la manipulación arqueológica.

La toma de la muestra cuando se trata de muestras antiguas es muy importante. A continuación se detallan unos pasos a seguir cuando se manipulan este tipo de muestras. Sin embargo, las técnicas se mejoran constantemente por lo se recomienda consultar a un paleogenetista para especificar todos los detalles de la toma de muestras y posterior tratamiento de las mismas. Incluso, cuando no se prevén análisis de ADN es importante tratar las muestras para posibles futuros análisis (Bollongino *et al.*, 2008:91-98).

Elección de las muestras

A menudo, un laboratorio de genética forense ha de trabajar con muestras de ADN que no se encuentran en condiciones óptimas. La muestra puede tener una cantidad limitada, estar degradada y/o puede haber estado expuesta a agentes ambientales. Por ese motivo, las técnicas empleadas en el laboratorio son críticas para la máxima obtención de ADN en muestras degradadas y limitadas. Debido a ello, es de vital importancia el tipo de muestra disponible para los análisis de ADN.

Los tejidos de elección para la determinación de aDNA son huesos y dientes. Ambos tejidos protegen el ADN de la degradación y de ataques biológicos debido a su robustez física y química; en la mayoría de los casos éstos son los únicos tejidos que pueden ser analizados. Sin embargo, los mecanismos por los que el ADN es preservado en el hueso no están bien caracterizados (Collins *et al.*, 2002:383-394; Pruvost *et al.*, 2007:739).

Los dientes son el tejido más duro del cuerpo humano debido al esmalte dental y son una buena elección ya que el material genético está protegido por tejidos calcificados (Girish *et al.*, 2010:63). El diente está formado por dentina, un tejido conectivo que forma gran parte del eje estructural del diente. La dentina de la corona del diente está cubierta por el esmalte, tejido de origen ectodérmico y extremadamente mineralizado, acelular y avascular. La dentina que se encuentra en la raíz del diente está cubierta por el cemento, otro tipo de tejido conectivo calcificado. El tejido blando encontrado en la pulpa se compone de odontoblastos, fibroblastos, células endoteliales, nervios periféricos, células mesenquimales indiferenciadas y otros componentes nucleados de la sangre ricos en ADN (Muruganandhan y Sivakumar, 2011:38). La pulpa es el tejido más empleado para la obtención de ADN ya que es abundante y tiene una baja probabilidad de contaminación con ADN no humano (Girish *et al.*, 2010:63).

El tejido óseo se compone principalmente de proteínas y minerales. Las dos proteínas más abundantes en este tejido son el colágeno y la osteocalcina. Aproximadamente el 70% de la parte mineral del hueso se compone de hidroxapatita, que incluye fosfato cálcico, carbonato cálcico, fluoruro cálcico, hidróxido cálcico y citrato. La organización estructural del hueso es tal que la parte mineral proporciona soporte a la parte proteica y así excluye físicamente agentes o enzimas extracelulares que son

potencialmente dañinos para la parte proteica (Collins *et al.*, 2002:383-394). El ADN tiene una gran afinidad por la hidroxiapatita y la degradación del ADN está ligada a la pérdida de cristalinidad de la hidroxiapatita, aunque también se ha relacionado con la pérdida de colágeno. Las características óseas están directamente relacionadas con la supervivencia del mismo así como con la protección del ADN a la degradación. La densidad ósea es uno de los factores intrínsecos más importantes en la supervivencia del hueso, con diferencias significativas entre hombres y mujeres. Además, existen diferencias de densidad ósea en diferentes partes del esqueleto, teniendo la región media de los huesos niveles más altos (fig. 2).

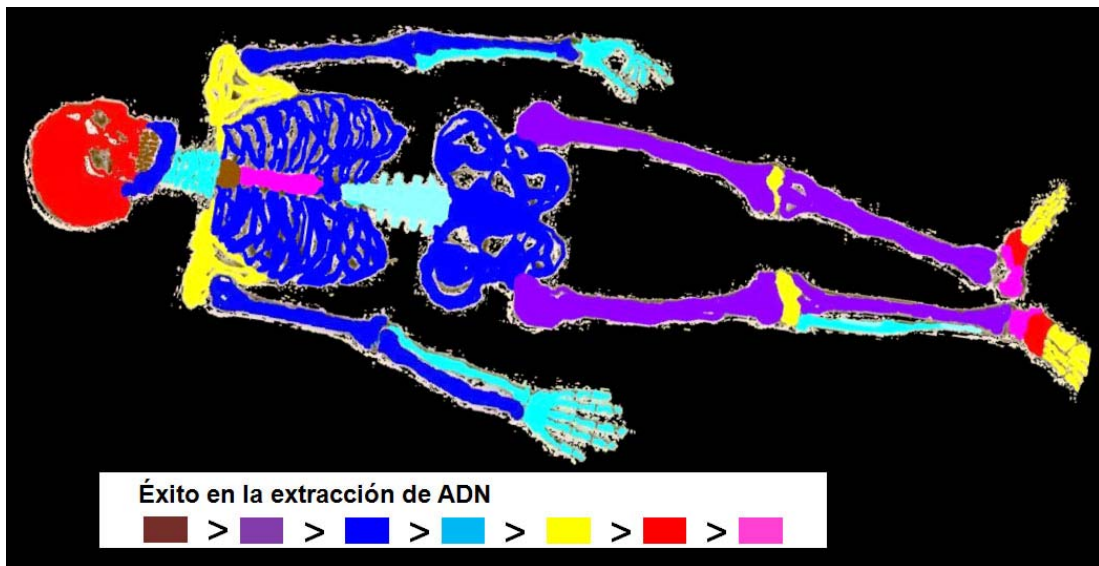


Fig. 2.—Porcentaje de éxito, dependiendo del hueso de partida. Esquematiza la información de los distintos estudios realizados sobre extracción de ADN en huesos. Imagen tomada de Martínez-González *et al.* 2010.

Es muy complicado estimar el estado de conservación del ADN a través de una simple inspección macroscópica. Sin embargo, hay varios rasgos característicos de una buena muestra. Los huesos han de ser duros, pesados y con una estructura compacta. Los huesos largos son preferibles a los huesos porosos como pelvis, escápula y partes del cráneo. Los huesos no han de tener fisuras o ataques microbianos. Especialmente para identificación humana, los dientes con una raíz bien preservada son de gran utilidad. Material quemado o bajo el efecto del calor no es apropiado. Cuando se trabaja con un gran número de individuos se recomienda tomar el mismo elemento anatómico para evitar el doble tipado de los individuos.

Excavación de las muestras

Se ha demostrado que las muestras extraídas en zonas cálidas están peor preservadas y son más vulnerables al estrés termal y a la contaminación durante la excavación. Por ello, las muestras se han de mantener de forma constante a temperaturas relativamente bajas. Se han de excavar rápidamente, puestas directamente en bolsas estériles y almacenadas en cajas frías o un sitio sombrío. Si no se disponen de sitios fríos, se recomienda poner las muestras en bolsas y enterrarlas lo suficientemente hondas como para que el calor no las alcance. Los restos humanos se contaminan fácilmente por lo que se recomienda reducir el riesgo de contaminación al máximo llevando al menos guantes, bata y mascarilla. Las herramientas se han de limpiar con lejía y los guantes se han de cambiar tras la manipulación de cada muestra para evitar contaminación entre ellas. Se han realizado estudios donde relacionan el tipo de muestra tomada con el riesgo de contaminación de la misma, así como con el procesado de la muestra por parte de los investigadores en el momento de la toma (Pilli *et al.*, 2013). Para análisis genéticos, cada muestra se ha de extraer por duplicado para su autenticación.

Tratamiento y almacenamiento de las muestras

Siempre que sea posible se han de usar guantes para la manipulación de la muestra. Cada espécimen se ha de depositar en una bolsa independiente para evitar contaminaciones entre muestras. En caso de que las muestras se encuentren húmedas y no se puedan transportar refrigeradas, se han de preservar en bolsas de papel, para evitar el deterioro de las mismas. Se recomienda no lavar las muestras, ya que es una fuente de contaminación.

Para minimizar el riesgo de contaminación post-excavación, las muestras se han de almacenar en un ambiente frío, seco y oscuro.

Muestras control

En ocasiones, las muestras pueden contaminarse por la tierra que las rodea. Es de gran ayuda monitorizar esta contaminación tomando muestras control del suelo de diferentes partes de la excavación y éstas han de ser tratadas como muestras independientes. Además, en caso de tratar con restos humanos, se han de tomar muestras de todos los individuos que manipulen las muestras para asegurar que la contaminación por los arqueólogos sea evitada y controlada. Los resultados de aDNA han de ser replicados en al menos, un segundo laboratorio por lo que se han de guardar submuestras en áreas donde no se trabaje con ADN (Bollongino *et al.*, 2008:91-98).

Tratamiento de las muestras en el laboratorio

Una vez recibidas las muestras en el laboratorio, se han de identificar y anonimizar. Se recomienda sacar fotografías de todos los restos recibidos, ya que en muchas

ocasiones se ha de destruir por completo la muestra para poder realizar los análisis de ADN.

Para poder extraer ADN de restos óseos o dientes, primero se ha de limpiar y pulverizar la muestra.

Los dientes se han de limpiar con agua ultra pura (milliQ) y un cepillo. Cuando los dientes se encuentran en buen estado y no presentan caries o fisuras, se han de dejar de 5 a 10 minutos en una solución de lejía al 10% y expuestos a luz ultravioleta durante 5 minutos por cada cara para minimizar las posibles fuentes de contaminación. A continuación, se ha de eliminar la mayor cantidad de dentina posible mediante el limado de diente. Esto se realiza dentro de una urna, que ha sido previamente limpiada con lejía y DNAsas y expuesta a luz ultravioleta; y con una fresa montada en un minitaladro.

Los huesos se cortan en fragmentos de unos 2 x 1cm con un disco de corte y se limpia la superficie externa e interna con una fresa montada en un minitaladro, en las mismas condiciones de trabajo que con los dientes (lám. I).

A continuación, se colocan los fragmentos de hueso o dientes en un vial para Freezer/Mill® y se pulveriza la muestra sumergida en nitrógeno líquido.

Se toman 0.5 gr del polvo resultante del que se realizará la extracción del ADN.

Para la extracción de este tipo de muestras, se pueden emplear métodos clásicos de extracción con disolventes orgánicos o kits comerciales que ya proveen todos los reactivos y materiales necesarios para la obtención de ADN. Todos los métodos se basan en la incubación de las muestras durante aproximadamente 24 horas con *buffers* y enzimas que digieren las proteínas a las que se encuentra ligado el ADN para la liberación de éste al medio. Posteriormente, se aísla el ADN del medio y se lava en repetidas ocasiones para eliminar todos los posibles inhibidores de la PCR.

Tanto en los análisis forenses como en análisis de aDNA, encontraremos muy poca cantidad de muestra, estará degradada o alterada químicamente. Por ello, el problema de la contaminación se evalúa de forma continua mediante el uso de controles al trabajar con muestras con bajo número de copias o degradadas. Existen bases de datos de ADN del personal de laboratorio, se realizan controles de los reactivos, controles positivos y negativos e incluso en ocasiones, controles de los viales empleados para la pulverización del hueso. Además, se toman medidas adicionales contra la contaminación que incluyen el diseño del laboratorio y la preparación de los reactivos. Los laboratorios se estructuran en dos habitaciones separadas, una empleada para la extracción del ADN y la otra para la amplificación y posterior procesamiento. Algunos laboratorios, incluyen un flujo de aire con presión negativa y positiva, así como vestíbulos (lám. II).

Criterios de autenticidad al trabajar con aDNA

Para que los datos obtenidos en el análisis de aDNA sean fiables y respetables, se han de tener en cuenta los siguientes criterios:

1. Toma de las muestras: Como ya se ha explicado anteriormente, los paleontólogos han de tener mucho cuidado en la toma de muestras e intentar evitar todo tipo

- de contaminaciones. Una vez en el laboratorio, las muestras se han de dividir y realizar réplicas del análisis en laboratorios independientes.
2. **Preservación bioquímica:** El principal componente molecular del diente y el hueso es colágeno. Las proteínas y el ADN sufren procesos similares de oxidación e hidrólisis. Por ello, el análisis de las alteraciones en las proteínas del hueso o diente permitirá a los investigadores escoger aquellas muestras que presentan características favorables a la preservación del ADN.
 3. **Controles de extracción y amplificación:** El análisis del aDNA se ha de llevar a cabo en laboratorios empleados exclusivamente para la extracción de muestras con bajo número de copias de ADN. Se han de realizar extracciones en blanco y controles de PCR exhaustivos para monitorizar los niveles de contaminación.
 4. **Comportamiento molecular:** El ADN de restos fósiles está degradado en pequeños fragmentos (150 pares de bases). Una manera de comprobar la autenticidad del extracto de aDNA es observar la presencia de fragmentos mayores de 300 pares de bases.
 5. **Cuantificación:** Conocer la cantidad de ADN presente en el extracto ofrece gran información sobre el estado de preservación de la muestra.
 6. **Amplificación:** Se han de amplificar fragmentos solapantes pequeños (<150 pares de bases). De esta manera se asegura una mayor amplificación del ADN degradado frente a moléculas de ADN contaminantes de mayor tamaño. Las amplificaciones se han de realizar por duplicado y cada amplificación se ha de secuenciar en varias ocasiones.
 7. **Reproducibilidad:** Se han de reproducir los resultados de la misma muestra en el laboratorio y de otras submuestras en otros laboratorios.
 8. **Análisis de fauna:** En caso de restos de homínidos, donde puede ser complicado determinar la secuencia endógena, es conveniente tener muestras de la fauna del mismo sitio que puedan dar información indirecta sobre la preservación del ADN.
 9. **Confirmación filogenética:** Se han de analizar las secuencias de ADN filogenéticamente. La presencia de nuevas secuencias que no se encuentran en la base de datos, sobretodo de ADN mitocondrial, no aseguran su autenticidad (Jobling *et al.*, 2003).

INCONVENIENTES DE LOS ESTUDIOS CON aDNA

El aDNA presenta un conjunto de características físico químicas que lo diferencian del organismo vivo: escasez, fragmentación de las cadenas, modificaciones moleculares y presencia de inhibidores de la PCR. La suma de estas características impone ciertas limitaciones técnicas a la hora de recuperar ADN de restos antiguos.

Degradación del ADN

El grado de degradación de la muestra varía en función de la exposición a la luz, humedad y temperatura. La contaminación bacteriana y fúngica y la rápida coloniza-

ción de los mismos, derivarán en la degradación física, química y bioquímica del ADN genómico del espécimen de interés (Bender *et al.*, 2004:135-140).

En las células vivas, la integridad del ADN se mantiene mediante procesos de reparación enzimáticos. Tras la muerte de un organismo, los compartimentos celulares que contienen enzimas catalíticas se rompen. Como consecuencia, el ADN se degrada rápidamente por estas enzimas. Además, el ADN se ve sometido a procesos de degradación causados por bacterias, hongos e insectos.

La exposición al agua es probablemente la mayor fuerza destructiva que actúa sobre el ADN. Se ha demostrado que el agua inicia la rotura de la cadena del ADN mediante la unión a los enlaces glucosídicos. Por ello, un paso crítico en la preservación del ADN es la rápida deshidratación de los tejidos.

El pH del ambiente también juega un papel crucial en la preservación a largo plazo del ADN. Ambientes ácidos incrementan el ratio de degradación del ADN.

La exposición a luz ultravioleta causa un gran daño y degradación del ADN. Limitar la exposición de la muestra a la luz ultravioleta, como un rápido enterramiento, es importante para minimizar las consecuencias del daño UV.

Contaminación del ADN

La contaminación con ADN de otros especímenes que no son el estudiado (ADN exógeno) es un problema complejo que aparecerá en cualquier estudio con aDNA, debido a la limitada cantidad de ADN que encontraremos en la muestra. Las fuentes de contaminación varían considerablemente dependiendo del tipo de material arqueológico y de la investigación a realizar y es probable que ambos (ADN endógeno y ADN contaminante) puedan ser coextraídos, por tanto, también es probable que ambos puedan ser coamplificados o en el peor de los casos amplificado, preferentemente, el ADN contaminante.

La alta sensibilidad de la PCR y su habilidad para amplificar bajas cantidades de ADN puede generar problemas si no se toman medidas extraordinarias cuando se trabaja con muestras comprometidas. Se han de seguir protocolos validados en el laboratorio para evitar contaminación de muestras con mayor cantidad de ADN.

La contaminación implica la transferencia accidental del ADN. Hay tres fuentes potenciales de contaminación; contaminación de la muestra con ADN que se encuentra en el ambiente, contaminación debida a la transferencia de ADN entre muestras mediante la preparación de la muestra y la causada por productos del ADN amplificado.

La primera depende principalmente de la recogida de la muestra y del cuidado que haya tenido el equipo que la ha tomado. La contaminación debida a la transferencia de ADN entre muestras mediante la preparación de la muestra y la causada por productos del ADN amplificado pueden ser fácilmente controladas mediante procedimientos de laboratorios apropiados y la separación de áreas de trabajo. Además es muy importante intentar minimizar la contaminación de la muestra en el momento de su toma por parte del personal arqueológico.

La separación del espacio de trabajo en laboratorios de pre-PCR y post-PCR es esencial. Los productos del PCR pueden ser fácilmente transportados en la ropa de los

investigadores y detectados en los reactivos y equipos. Por ello es importante la separación física de los espacios de pre y post-PCR, así como de las muestras con baja y alta cantidad de ADN. Además, se han de emplear batas de laboratorio, material desechable, como guantes, gorros y patucos; así como puntas de pipetas con filtro resistentes a aerosoles. Las áreas de trabajo se han de limpiar meticulosamente antes y después de cada uso, y siempre que sea posible se ha de trabajar en campanas de flujo laminar. Todo el material que vaya a ser empleado se ha de exponer a luz ultravioleta para minimizar la contaminación.

Además, la posible contaminación ha de ser monitorizada mediante controles negativos (muestras que contienen todos los reactivos excepto ADN) durante la extracción y la amplificación que se procesan del mismo modo que los indicios de ADN.

Inhibición de la PCR

La presencia de inhibidores de la reacción de PCR es otro reto que se ha de afrontar en el trabajo con muestras antiguas. Los inhibidores pueden proceder de múltiples focos como la melanina, el suelo y proteínas. Los inhibidores interfieren en la lisis celular necesaria para la extracción del ADN. Además, disminuyen la actividad de la polimerasa y con ello dar lugar a resultados falsos-negativos. Este tipo de muestras producen a menudo perfiles parciales que son similares a muestras con ADN degradado. Los inhibidores de la PCR pueden ser eliminados mediante la dilución del extracto o con un paso previo a la amplificación que separe el ADN extraído del compuesto inhibitorio.

APLICACIONES

Cuando se tiene la capacidad de hacer análisis de aDNA, se abre un nuevo campo de acción. Al igual que en el campo de la criminalística, el estudio del ADN en casos antiguos puede hacer cambiar una decisión judicial. El estudio de éste en nuevos proyectos con tejidos biológicos antiguos puede cambiar la historia de un personaje, de una especie... La historia es una ciencia que ha sabido aprovechar las nuevas tecnologías para aumentar el número de elementos que apoyen una teoría. El ADN no es la primera, se ha utilizado el carbono 14 desde hace años para datar piezas y así recomponer hipótesis en investigaciones de sucesos históricos. Dentro de las metodologías de la historia, el ADN no es una herramienta para reinterpretarla, sino un instrumento más para ayudar al resto de las fuentes de trabajo clásicas (textos, grabados, materiales,...) (Álvarez-Cubero *et al.*, 2010:5-18). El estudio del aDNA tiene el potencial de contribuir de forma única y significativa a la ecología y la evolución. Las técnicas de aDNA han permitido el análisis de especies y poblaciones (Rizzi *et al.*, 2012:21). Los avances en las técnicas de secuenciación del DNA, secuenciación de nueva generación, han hecho posible la determinación de especies y cepas de *Mycobacterium* en restos óseos arqueológicos de toda Europa para identificar la relación entre la cepa y la patología patente en los restos (Bouwman y Rühli, 2013:751-752; Economou *et al.*, 2013:465-470).

Estudio de especies extintas

Gracias al estudio del aDNA se han podido reconstruir las relaciones filogenéticas entre especies extinguidas y existentes como los lobos marsupiales australianos (Krajewski *et al.*, 1997:911-917), los perezosos terrestres americanos (Greenwood *et al.*, 2001:94-103; Hagey *et al.*, 2010:133), la oca endémica hawaiana (Paxinos *et al.*, 2002:1399-1404), los osos de las cavernas (Knapp *et al.*, 2009:1225-1238), las cabras de las cavernas de las Islas Baleares (Ramírez *et al.*, 2009:5670), los lémures gigantes (Orlando *et al.*, 2008:121) y los tigres del Caspio (Driscoll *et al.*, 2009:4125); entre otros. Diversos estudios han conseguido secuenciar el ADN mitocondrial de mamut a partir de restos óseos, determinando que los mamuts estaban genéticamente más relacionado con los elefantes asiáticos que con los africanos (Krause *et al.*, 2005:724-727).

La preservación de varios individuos, todos originarios de una misma localidad, ofrece la posibilidad de seguir los cambios de una población a lo largo del tiempo. Uno de los primeros casos fue el estudio de tres poblaciones de ratas canguro en California que habían sido recogidas por zoólogos en la primera mitad del siglo pasado. La comparación de las poblaciones modernas del mismo área mostraron que las líneas de ADN mitocondrial se habían mantenido estables, situación típica de hábitats que no han sufrido perturbaciones (Thomas *et al.*, 1990:101-112). Un estudio similar se ha llevado a cabo en el laboratorio de Identificación Genética de la Universidad de Granada en colaboración con el Departamento de Genética de la misma universidad para determinar qué especies de esturión (Familia *Acipenseridae*) existían en la Península Ibérica, más concretamente en el río Guadalquivir, y así poder biorrecuperar esta especie. Los esturiones (Familia *Acipenseridae*) se distribuyen exclusivamente en el hemisferio Norte. Están considerados fósiles vivientes, existiendo actualmente una disminución continua de estos peces en las poblaciones, hasta el punto de ser consideradas especies en peligro de extinción. Se analizaron tres especies capturadas en el río Guadalquivir de mediados de los 70 y principios de los 80, conservadas en la Estación Biológica de Doñana, una del río Ebro, del Instituto Botánico de Barcelona y uno más del Departamento de Zoología de la Universidad de Granada (lám. III). Se identificaron dos de ellos como especie *A. naccarii*, otros dos *A. sturio* y el quinto un híbrido de ambos. Gracias a estos resultados se ha comenzado con la recuperación de especie *A. naccarii*. Posteriormente, se ha comenzado una nueva línea de investigación a partir de restos fósiles de esturiones encontrados en yacimientos arqueológicos para intentar resolver la disyuntiva de cuál de las especies actuales era la autóctona de la península Ibérica (Carmona *et al.*, 2009; Robles *et al.*, 2010:171-179; Álvarez-Cubero *et al.*, 2010:5-18).

Antropología Molecular

La antropología molecular se generó como una rama de la antropología que analiza la variación biológica de manera intra e interespecífica a nivel molecular. El término “antropología molecular” fue introducido por primera vez por Emile Zuckerkandl en 1962 que afirmó que las moléculas pueden ofrecer igual o más información sobre la

filogenia que muchos de los parámetros estudiados hasta el momento (Goodman *et al.*, 1976:491-494; Dietrich, 1998:85-111). Aunque ésta sería la primera vez donde se mencionó su uso, existen estudios previos con estos datos. En 1902, Landsteiner descubrió las diferencias en los grupos sanguíneos de las poblaciones humanas. Los estudios sobre las reacciones inmunológicas, debido a la interacción entre los diferentes tipos de sangre, fueron los primeros en poner de manifiesto la existencia de una variación molecular entre los individuos, a raíz de una forma de herencia mendeliana. Década a década tras el descubrimiento de los grupos ABO, en 1919, aparecieron otros marcadores como los MNS y Rh. Mediante estos primeros marcadores se vió la necesidad de caracterizar las frecuencias alélicas, y comenzó la descripción de las poblaciones en función de estas variables. En 1954 se publicó el primer libro sobre las frecuencias de alelos en las poblaciones humanas (Mourant *et al.*, 1976).

En la década de los 60 hubo un desarrollo dentro del campo de la biología evolutiva, apareció el concepto: “distancia genética”. Cavalli-Sforza y Edwards comenzaron a cuantificar las diferencias entre las poblaciones partiendo de diferencias entre sus frecuencias alélicas.

Previamente, de forma simultánea Zuckerkandl y Pauling, y Margoliash, describieron el concepto de “reloj molecular”. Esta teoría afirma que el tiempo es la variable principal que determina el número de sustituciones acumuladas en el ADN, por lo que permite calcular una aproximación de la fecha en la que divergieron dos linajes, que dieron lugar a dos especies diferentes (Dietrich, 1998:85-111).

Estudio de poblaciones humanas

Los estudios de aDNA también se han empleado para investigar la historia demográfica de poblaciones humanas aunque este tipo de estudios pueden sufrir contaminaciones. Una de las primeras publicaciones en este campo fue el estudio genético de la población Etrusca, población prehistórica italiana. Se determinó el ADN mitocondrial de muestras óseas de 80 etruscos que vivieron entre los siglos VII y III A.C. Los resultados mostraron que sólo unas pocas de las secuencias obtenidas se encontraban exactamente en las bases de datos modernas, pero todas ellas pertenecían a linajes todavía presentes en Europa (Vernesi *et al.*, 2004:694-704).

Otros estudios han examinado el origen de los habitantes de las Islas Andaman (Thangaraj *et al.*, 2005:996), las variaciones genéticas en íberos y sardos en la prehistoria (Sampietro *et al.*, 2005:535-548; Caramelli *et al.*, 2007:327-336) y las discontinuidades genealógicas entre etruscos, medievales y toscanos contemporáneos (Guimaraes *et al.*, 2009:2157-2166).

Además, el análisis del aDNA nos permite la reconstrucción de la evolución de los humanos modernos. Las técnicas de secuenciación de nueva generación han revolucionado la investigación en el campo del estudio de las poblaciones humanas a través de aDNA y ha permitido el análisis de un total de 25 genomas mitocondriales completos de homínidos. Entre ellos se encuentra el genoma mitocondrial del homínido de Denisova que representa la especie humana antigua más inusual. El análisis de su genoma mitocondrial sugiere que el homínido de Denisova representa un grupo hermano al

hombre de Neandertal y a los humanos modernos (Krause *et al.*, 2010:894-897; Reich *et al.*, 2010:1053-1060).

Se han secuenciado 6 genomas mitocondriales del hombre de Neandertal que han permitido sugerir que no ha habido contribución Neandertal en la diversidad genética mitocondrial de los humanos modernos (Green *et al.*, 2008:416-426; Briggs *et al.*, 2009:318-321). Sin embargo, el estudio del genoma nuclear indica que sí podría haber habido intercambio genético entre ambas especies (Green *et al.*, 2010:710-722). Esto enfatiza la importancia del análisis conjunto del ADN nuclear y mitocondrial para obtener una visión completa de la historia de la evolución de las especies (Green *et al.*, 2010:710-722).

Aunque el estudio de aDNA de humanos anatómicamente modernos es complicado debido posibles contaminaciones, un gran número de genomas mitocondriales se han analizado. El genoma mitocondrial humano más antiguo analizado hasta la fecha se trata de un fósil del Pleistoceno de Kostenki (Rusia), de data estimada de entre 33 000 y 30 000 años de antigüedad. Los datos derivados sugieren una continuidad en la población Europea durante los últimos 30 000 años (Krause *et al.*, 2010:894-897). También se han realizado estudios de ADN mitocondrial en un hombre del Neolítico encontrado en los Alpes (conocido como Ötzi) (Ermini *et al.*, 2008:1687-1693) y de un paleo-esquimal encontrado en Groenlandia (Gilbert *et al.*, 2008:1787-1789). Aunque estos tres genomas mitocondriales son los únicos analizados de humanos modernos prehistóricos, se han determinado 15 genomas de especímenes históricos: 10 hombres medievales, 4 miembros de la familia Romanov y un aborígen australiano.

Reconstrucción de la historia

Salida del hombre de África (Out of Africa)

Con la publicación del artículo titulado “*Mitochondrial DNA and human evolution*” de Cann *et al.* (1987), la genética ha tomado un rol importante en la comprensión de la evolución humana en los últimos dos millones de años. En este artículo, se presenta un estudio basado en RFLP en 147 muestras de ADNmt humano de cinco regiones geográficas en todo el mundo (Cann *et al.*, 1987:31-36). Se generó un árbol filogenético resultante de 133 haplotipos mitocondriales, aunque era incorrecto. Posteriores análisis han mostrado, que a pesar de los errores, se habían planteado dos hipótesis correctas: el árbol mitocondrial estaba enraizado en África y las ramas eran relativamente cortas implicando a un antecesor común reciente (Eva mitocondrial) (Templeton, 2007:1507-1519). De estas observaciones concluyeron que sus datos apoyaban un modelo de evolución humana en la que los humanos anatómicamente modernos se desarrollaron en África hace unos 150.000 años y se expandieron fuera de África hace 100.000 años reemplazando totalmente a las otras poblaciones humanas de forma que todas las poblaciones actuales son descendientes de esta población Africana. Esta hipótesis ha sido debatida, generando una segunda hipótesis multiregional donde las poblaciones de África y Eurasia contribuyeron a la evolución de los humanos anatómicamente modernos (Wolpoff *et al.*, 1988:772-773). Esta última ha sido rebatida en varias ocasiones,

alegando que las diferencias genéticas entre las principales poblaciones de la humanidad son tan pequeñas y no muestran evidencias de sublíneas antiguas altamente divergentes.

Aunque el debate sobre el origen de los humanos modernos continúa, existen puntos de acuerdo y está claro que los datos genéticos, tanto de poblaciones actuales como de aDNA, han jugado un papel importante. Tanto genetistas como paleoantropólogos han aceptado el origen africano de los humanos modernos. Actualmente, los restos fósiles arrojan evidencias de una aparición más temprana de modernidad en África que en otros lugares y los análisis genéticos apoyan un origen inicial africano. Sin embargo, hay una creciente visión de que mientras África ha sido la principal fuente de ascendencia, ésta no ha sido la única (Templeton, 2007:1507-1519). Estudios recientes se han centrado en la cuantificación de la ascendencia no africana existente en las poblaciones. Recientes análisis del registro fósil y de las evidencias genéticas hacen hincapié en la asimilación de genes arcaicos no africanos en el pool genético humano. Aunque el análisis del ADNmt sugiere que hubo un pequeño aporte genético en Europa (Neandertales), es posible que algunos genes reflejen mayor ascendencia arcaica a causa de una mayor introgresión. Estas poblaciones se extinguieron pero se ha mantenido una pequeña parte de su legado genético (Relethford, 2008:555-563).

Población de Eurasia

El sur de Asia ha sido el mayor corredor para la dispersión de los humanos modernos que empezó en África hace unos 100 000 años pero la fecha de entrada de los humanos modernos en esta región es incierta. Sin embargo, se han encontrado restos de humanos modernos datados de finales del Pleistoceno (55000-25000 años) y hacia la mitad del periodo Paleolítico (50000-20000 años), los hombres modernos ya se habían extendido a partes de la India.

Cuando se estudia la distribución de los haplogrupos de ADNmt se observa que todos los haplogrupos fuera de África pertenecen a los grupos M y N, derivados del L3 (haplogrupo predominante en África Sub-sahariana). Estos dos haplogrupos fundadores dan lugar a un gran número de haplogrupos dispersos por toda Eurasia. De estos haplogrupos, los más antiguos se encuentran casi exclusivamente en el sur de Asia, indicando que esta región ha jugado un papel muy importante en la salida del hombre de África y la dispersión de los humanos modernos (Maca-Meyer *et al.*, 2001:13; Majumder, 2008:280-284).

El estudio de las pautas de uso de herramientas encontradas en Eurasia ha derivado en la propuesta de dos corrientes de dispersión humana desde el noreste de África. Una corriente del norte a través del valle del Nilo y de la península del Sinaí hacia el suroeste de Asia y Europa; y una segunda corriente desde el sur, el cuerno de África y el mar Rojo, hacia el sudeste de Asia y Australia. Genetistas moleculares y arqueólogos defienden una única corriente del sur. La principal evidencia genética es el análisis del ADNmt ya que los principales haplogrupos derivados del haplogrupo L3 (exclusivo de África) son el M y el N. El haplogrupo M se encuentra en Etiopía, pero en mayor medida en el sur y este de Asia. Sin embargo, este haplogrupo no se

encuentra en la ruta norte. Los estudios de haplogrupos de cromosoma Y sustentan esta misma hipótesis.

Por otro lado, hay evidencias de ADNmt que apoyan la teoría de una segunda corriente hacia el norte hace entre 43 000 y 53 000 años, que llegó al centro de Asia y allí radió hacia el norte y este de Asia. Posteriormente esta población se expandiría hacia India y Europa. Así, las evidencias genéticas apuntan hacia una corriente más antigua del sur más importante en la dispersión de las poblaciones humanas que la corriente del norte más tardía (Majumder, 2008:280-284; Xing *et al.*, 2010:R113).

Población de América

La población de América ha sido objeto de estudio a nivel genético, arqueológico y lingüístico. Una de las grandes preguntas es si la población de este continente se produjo en una única migración o en múltiples flujos migratorios desde Siberia. Recientes estudios genéticos en grupos nativos americanos y siberianos muestran que la población nativa americana descende de tres corrientes genéticas asiáticas, como mínimo. La gran mayoría de las tribus americanas proceden de una única población ancestral llamada “Primer americano”. Sin embargo, las tribus que hablan las lenguas Esquimo-Aleut del Ártico heredaron prácticamente la mitad de su legado genético de una segunda corriente asiática. Por último, los Chipewyan de Canadá heredaron un 10% de su legado genético de una tercera corriente. Se ha mostrado que la primera población fue seguida por una expansión hacia el sur facilitado por la costa, con posteriores separaciones de población y muy poco flujo genético tras la divergencia, especialmente en Sudamérica. La mayor excepción son los Chibchan parlantes a ambos lados del istmo de Panamá que presentan influencias genéticas ancestrales tanto del norte como del sur de América (Reich *et al.*, 2012:370-374).

Caracterización de personajes históricos

Uno de los primeros casos históricos donde la identificación genética se ha convertido en una herramienta decisiva ha sido en el caso del Zar Nicolás II de Rusia. El ADN mitocondrial y el cromosoma Y permitieron la identificación del Zar Nicolás II Rusia y de sus familiares, siendo este el fin de su dinastía (Gill *et al.*, 1994:130-135; Ivanov *et al.*, 1996:417-420; Ivanov, 1996:310-316). A partir de este primer caso, serían muchos los casos donde se usaría el ADN para descifrar enigmas de la historia, como pueden ser el caso de María Antonieta de Austria, para buscar la filiación con su hijo Luis XVII (Jehaes *et al.*, 1998:383-395). En la actualidad, en la Universidad de Leicester se está intentando certificar la aparición de un esqueleto, con grandes evidencias de ser el del Rey Ricardo III en Londres.

Pocos años después de la identificación del Zar Nicolás II comenzó, en la Universidad de Granada, el proyecto de identificación de algunos de los personajes más importantes de la historia de nuestro país, Blanca de Navarra y el Príncipe de Viana.

El estudio puso de manifiesto que ninguno de los restos encontrados en la momia que se asumía como el cuerpo del Príncipe de Viana coincidía con los de Blanca de Navarra, madre del príncipe.

Todas las secuencias de ADN mitocondrial editadas pertenecían a individuos distintos. Se encontraron hasta tres huesos con distinta procedencia en la momia del Príncipe de Viana. Estos resultados se pueden explicar debido a que en el sepulcro de Poblet existía un caos de huesos, fruto de los distintos saqueos que había sufrido. Estudios realizados en el año 2008 por otros grupos corroboran los datos que se obtuvieron en nuestro laboratorio a finales de la década de los 90 confirmando la existencia de más de un individuo en la momia del Príncipe.

Uno de los proyectos más eminentes y de mayor repercusión fue la identificación genética de Cristóbal Colón y sus familiares, un proyecto internacional y multidisciplinar con el objetivo de descifrar algunos de los enigmas del famoso Almirante. El objetivo principal de este proyecto fue determinar el lugar donde se encontraban sus restos, República Dominicana y/o Sevilla. En este proyecto, además de la Universidad de Granada participaron los laboratorios de la Universidad de Barcelona, Santiago de Compostela en España; y los laboratorios de la Universidad “Tor Vergata” (Italia), así como el Instituto Max Planck (Alemania) y el Laboratorio Orchid Cellmark de Dallas (EEUU).

El estado de los huesos, de Cristóbal Colón y de su hermano Diego, era mucho peor del esperado por el tiempo transcurrido, los distintos viajes del féretro de Colón y la poca cantidad de material encontrado en la tumba de la Catedral de Sevilla. Igualmente los restos de Diego, debido a las filtraciones de agua, se encontraban en un estado muy deteriorado. De todos los laboratorios participantes en el proyecto, solo en algunos se obtuvieron resultados. Se encontraron coincidencia en los resultados, pero los fragmentos de ADN mitocondrial obtenidos fueron muy pequeños, con lo que fue difícil afirmar una inclusión. La suma de los datos obtenidos por todos los participantes antropólogos, historiadores,... fueron los que nos permitieron afirmar que los restos encontrados en la catedral de Sevilla, pertenecían al almirante.

De todas formas este proyecto no se finalizará hasta que las autoridades de la República Dominicana no permitan contrastar estos datos con los restos del mausoleo levantado en Santo Domingo. La cantidad de huesos encontrados en la catedral de Sevilla no descarta que ambas tumbas compartieran la posesión de los restos de Colón, algo que sucedía frecuentemente en los traslados de cadáveres de personajes famosos y reliquias (lám.IV).

Caracterización de elementos históricos

La determinación de la especie de origen de objetos históricos es una de las funciones más comunes del aDNA. El ADN recuperado de restos arqueológicos y paleontológicos permite volver atrás en el tiempo y revelar la identidad genética de diversas herramientas y objetos empleados por los humanos. Existen estudios que han comparado la secuencia de ADN de animales actuales de diversas regiones del Mediterráneo para identificar el origen del material biológico empleado para la fabricación

de manuscritos griegos (Poulakakis *et al.*, 2007:675-680). Recientemente, se ha realizado un estudio entre el Departamento de Pintura y el Laboratorio de Identificación Genética de la Universidad de Granada, donde se ha determinado el origen biológico de dos ejemplares del Corán más antiguos que se conservan en España. Se caracterizó el pergamino en el que estaba editado este ejemplar y determinó el origen de la piel con el que se había realizado la edición del Corán (Álvarez-Cubero *et al.*, 2010:5-18). Actualmente, se trabaja en la caracterización de otros documentos, tanto jurídicos como divulgativos de entre los siglos XIV y XVI (lám. V).

Como se ha comprobado, el ADN de los animales cuyas pieles fueron empleadas para realizar las páginas usadas en libros antiguos y medievales sobrevive en el pergamino, permitiendo no solamente la determinación de la especie del animal cuya piel fue tomada, sino también puede ser posible la reconstrucción de la historia de las manadas de los que pertenecían dichos animales.

Caracterización de restos arqueológicos

El análisis de aDNA de restos biológicos tomados de yacimientos arqueológicos puede arrojar mucha información sobre la estructura social de sociedades prehistóricas.

La identificación sexual de los individuos es fundamental para determinar la estratificación social, laboral y religiosa en las sociedades humanas prehistóricas. Los métodos morfológicos proporcionan buenos resultados en la identificación sexual de individuos adultos pero carecen de poder de identificación en individuos juveniles y en restos fragmentados. Se han realizado estudios donde se determina el sexo de los individuos mediante secuenciación dirigida y estimación del ratio de secuencias alineadas a los cromosomas sexuales (Skoglund *et al.*, 2013:4477-4482).

Por otro lado, el análisis del aDNA de restos arqueológicos ayuda a la reconstrucción de las relaciones familiares de los ocupantes de una necrópolis así como información sobre la comunidad estudiada. Estudios de ADN mitocondrial en tres sarcófagos de una necrópolis Merovingia en *Jau-Dignac et Loira* (Francia) permitieron establecer relaciones materno filiales entre individuos depositados dentro del mismo sepulcro (Deguilloux *et al.*, 2014:399-405). Estudios realizados a ocho individuos de enterramientos colectivos de finales del Neolítico en cuatro yacimientos de Alemania identificaron cuatro haplotipos mitocondriales. Se observaron haplotipos compartidos entre dos de los cuatro yacimientos reflejando la interacción entre las comunidades residentes en estas regiones a finales del Neolítico (Lee *et al.*, 2012:1-7).

Pero el estudio del aDNA no solamente queda relegado a las poblaciones humanas. La caracterización genética de los animales encontrados en yacimientos arqueológicos ha ayudado al conocimiento de los modelos de vida de los individuos que convivían con dichos animales. Estudios de aDNA revelan la presencia de perros domesticados, en vez de cánidos salvajes; en yacimientos arqueológicos prehistóricos del oeste Norte Americano dando información sobre la relación entre los humanos y los cánidos así como ayudando a entender las complejas prácticas cazadoras-recolectoras (Byrd *et al.*, 2013:2176-2189). La caracterización genética de diferentes restos de salmón en un asentamiento en Columbia Británica ha permitido hipotetizar una ocupación estacional de la región así como la forma de preservación del mismo (Grier *et al.*, 2013:544-555).

Además, el estudio del aDNA en arqueobotánica muestra los patrones de consumo y cultivo de vegetales así como la procedencia de las especies de consumo moderno. A través del análisis de aDNA obtenido a partir de semillas de trigo se ha podido determinar la agricultura practicada por las poblaciones que habitaban las Islas Canarias pre-Hispánicas (Oliveira *et al.*, 2012:828-835). El estudio del ADN de los cloroplastos de semillas de quinoa moderna y arqueológica de norte América ha demostrado una domesticación local de estas semillas frente a la posible introducción por Mesoamérica postulada a través de las similitudes morfológicas con las semillas modernas mexicanas (Kistler y Shapiro, 2011:3549-3554).

CONCLUSIONES

Gracias a los restos arqueológicos distribuidos en el espacio y contenidos en el tiempo (fósiles, restos de animales y plantas, herramientas...), se ha podido discernir la historia antigua de nuestro planeta. Este tipo de restos son los únicos testigos que nos permiten clasificar las especies encuadrándolas en el espacio y el tiempo. Mediante el ADN, se ha permitido el análisis filogenético de éstas.

El aDNA es una herramienta muy importante que podremos encontrar en muchas de estas muestras, siempre que haya estado preservado en un ambiente que no haya alterado a su composición molecular. De hecho, se ha encontrado ADN en restos fósiles óseos de 130000 años en regiones templadas. El éxito de este tipo de análisis va a depender de la preservación de estas muestras; la degradación de las moléculas de ADN va a ser proporcional a la exposición de éste, a factores ambientales como pueden ser las radiaciones solares, la humedad, la temperatura,... Y al mismo tiempo de otros factores como pueden ser la exposición a otros ADN exógenos que enmascaren el ADN original o iones que puedan inhibir el estudio del mismo. Por lo tanto, el éxito de los resultados obtenidos se deberá siempre al estado de preservación de la muestra, pero solamente podremos demostrarlo mediante un trabajo exhaustivo en el laboratorio. Para aportar un resultado positivo en un estudio de esta clase, las muestras deben de ser estudiadas en distintos laboratorios, obteniendo en ellos idénticos resultados. Estos laboratorios deben cuidar al máximo las medidas de precaución para evitar falsos positivos que enmascaren los resultados reales, medidas que se han detallado en el desarrollo de este trabajo.

Con la llegada de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se han realizado grandes avances en las técnicas de biología molecular para el estudio del aDNA en antropología y en la ciencia forense. Con el aumento de la sensibilidad en técnicas de biología molecular, se puede determinar el perfil genético de muestras con un bajo número de copias de ADN siendo siempre conscientes de la dificultad que esto conlleva y de las precauciones que hay que tener en los laboratorios que se realizan los análisis antes de confirmar el resultado positivo en un estudio de ADN de gran antigüedad (Van Oorschot *et al.*, 2010:1-17).

Conocemos la herencia del ADN, gracias a la información proporcionada de su análisis podremos recuperar y reordenar muchos datos del pasado reciente, y si estudiamos muestras antiguas, aún podremos ahondar más y tener mayor número de datos

del pasado que nos harán llegar más allá. Conocer las diferentes herencias y las tasas de mutación que encierran las distintas regiones del ADN, permite calcular parámetros con una probabilidad conocida y encuadrar en el espacio-tiempo distintos eventos genéticos. Pero también conocer la herencia nos informa de sus limitaciones, ya que muchos de los datos se diluirán con el tiempo, mientras que otros por efectos de deriva genética podrán manifestarse en mayor medida. Así será difícil obtener todos los datos derivados de la microevolución de las especies, pero sí muchos de ellos, estableciendo y ayudando a recuperar nuestra historia.

Teniendo en cuenta todos estos enunciados anteriores, se ha de seguir caminando hacia la mejora en las técnicas de extracción y amplificación del aDNA. Esto nos ayudará a tener una mayor información de la historia del hombre y en general de todos los seres vivos que comparten esta molécula como conservadora de la información genética. El ADN es un reloj molecular que nos dará mucha información sobre la historia de las especies, por lo que su estudio nos ofrece miles de aplicaciones que nos permitirán interpretar muchas incógnitas de nuestro pasado. Los datos que nos ofrece el ADN unidos a los obtenidos por otras técnicas que se usan en antropología y arqueología nos permitirán reconstruir con éxito eventos del pasado, reordenar y reclasificar hipótesis previamente establecidas.

BIBLIOGRAFÍA

- ACHILLI, A., RENGO, C., BATTAGLIA, V., PALA, M., OLIVIERI, A., FORNARINO, S., MAGRI, C., SCOZZARI, R., BABUDRI, N., SANTACHIARA-BENERECETTI, A., BANDELT, H. J., SEMINO, O. y TORRONI, A. (2005): "Saami and Berbers - an unexpected mitochondrial DNA link", *Am. J. Hum. Genet.* 76, pp. 883-886.
- ADAMS, S. M., BOSCH, E., BALARESQUE, P. L., BALLEREAU, S. J., LEE, A. C., ARROYO, E., LÓPEZ-PARRA, A. M., ALER, M., GISBERT-GRIFO, M. S., BRION, M., CARRACEDO, A., LAVINHA, J., MARTÍNEZ-JARRETA, B., QUINTANA-MURCI, L., PICORNELL, A., RAMON, M., SKORECKI, K., BEHAR, D. M., CALAFELL, F. y JOBLING, M. A. (2008): "The Genetic Legacy of Religious Diversity and Intolerance: Paternal Lineages of Christians, Jews, and Muslims in the Iberian Peninsula", *Hum. Biol.* 83, pp. 725-736.
- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. y WATSON, J. D. (2007): *Molecular Biology of the Cell*, OMEGA, Barcelona.
- ÁLVAREZ-CUBERO, M. J., MTNEZ.-GONZALEZ, L. J., SAIZ, M., ÁLVAREZ, J. C. y LORENTE, J. A. (2010): "New applications in genetic identification", *Cuadernos de Medicina Forense* 16, pp. 5-18.
- ANDERSON, S., BANKIER, A. T. y BARRELL, B. G. (1981): "Sequence and organization of the human mitochondrial genome", *Nature* 290, pp. 457-465.
- BANDELT, H. y CHEPOI, V. (2000): "Decomposition and 11-Embedding of Weakly Median Graphs", *European Journal of Combinatorics* 21, pp. 701-714.
- BANDELT, H., FORSTER, P., SYKES, B. C. y RICHARDS, M. B. (1995): "Mitochondrial portraits of human populations using median networks", *Genetics* 141, pp. 743-753.
- BANDELT, H., HENKMANN, A. y NICOLAI, F. (1995): "Powers of distance-hereditary graphs", *Discrete Mathematics* 145, pp. 37-60.
- BANDELT, H., MACAULAY, V. y RICHARDS, M. (2000): "Median networks: Speedy construction and greedy reduction, one simulation, and two case studies from human mtDNA", *Mol. Phylogenet. Evol.* 16, pp. 8-28.
- BENDER, K., FARFAN, M. J. y SCHNEIDER, P. M. (2004): "Preparation of degraded human DNA under controlled conditions", *Forensic Sci. Int.* 139, pp. 135-140.
- BERTRANPETIT, J. y CAVALLI-SFORZA, L.L. (1991): "A genetic reconstruction of the history of the

- population of the Iberian Peninsula”, *Ann. Hum. Genet.* 55, pp. 51-67.
- BOLLONGINO, R., TRESSET, A. y VIGNE, J. D. (2008): “Environment and excavation: Pre-lab impacts on ancient DNA analyses”, *Comptes Rendus Palevol* 7, pp. 91-98.
- BOSCH, E., CALAFELL, F., COMAS, D., OEFNER, P. J., UNDERHILL, P. A. y BERTRANPETIT, J. (2001): “High-resolution analysis of human Y-chromosome variation shows a sharp discontinuity and limited gene flow between northwestern Africa and the Iberian Peninsula”, *Am. J. Hum. Genet.* 68, pp. 1019-1029.
- BOUWMAN, A. y RÜHLI, F. (2013): “Advances in ancient DNA research can help radiological interpretations of archaeological diseases”, *Skeletal Radiol.* 42, pp. 751-752.
- BRIGGS, A. W., GOOD, J. M., GREEN, R.E., KRAUSE, J., MARICIC, T., STENZEL, U., LALUEZA-FOX, C., RUDAN, P., BRAJKOVIĆ, D. y KUĆAN, Ž. (2009): “Targeted retrieval and analysis of five Neanderthal mtDNA genomes”, *Science* 325, pp. 318-321.
- BRINKMANN, B. (1996): “Population genetic comparisons among eight populations using allele frequency and sequence data from three microsatellite loci”, *European Journal of Human Genetics* 4, pp. 175-182.
- BRION, M., SALAS, A., GONZÁLEZ-NEIRA, A., LAREU, M. V. y CARRACEDO, A. (2003): “Insights into Iberian population origins through the construction of highly informative Y-chromosome haplotypes using biallelic markers, STRs, and the MSY1 minisatellite”, *Am. J. Phys. Anthropol.* 122, pp. 147-161.
- BROWN, W. M., GEORGE JR., M. y WILSON, A. C. (1979): “Rapid evolution of animal mitochondrial DNA”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, pp. 1967-1971.
- BYRD, B. F., CORNELLAS, A., EERKENS, J. W., ROSENTHAL, J. S., CARPENTER, T. R., LEVENTHAL, A. y LEONARD, J. A. (2013): “The role of canids in ritual and domestic contexts: new ancient DNA insights from complex hunter-gatherer sites in prehistoric Central California”, *J. Archaeol. Sci.* 40, pp. 2176-2189.
- CANN, R. L., STONEKING, M. y WILSON, A. C. (1987): “Mitochondrial DNA and human evolution”, *Nature* 325, pp. 31-36.
- CANN, R. L. y WILSON, A. C. (1983): “Length mutations in human mitochondrial DNA”, *Genetics* 104, pp. 699-711.
- CARAMELLI, D., LALUEZA-FOX, C., VERNESI, C., LARI, M., CASOLI, A., MALLEGGNI, F., CHIARELLI, B., DUPANLOUP, I., BERTRANPETIT, J., BARBUJANI, G. y BERTORELLE, G. (2003): “Evidence for a genetic discontinuity between neandertals and 24,000-year-old anatomically modern europeans”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, pp. 6593-6597.
- CARAMELLI, D., VERNESI, C., SANNA, S., SAMPIETRO, L., LARI, M., CASTRÌ, L., VONA, G., FLORIS, R., FRANCALACCI, P., TYKOT, R., CASOLI, A., BERTRANPETIT, J., LALUEZA-FOX, C., BERTORELLE, G. y BARBUJANI, G. (2007): “Genetic variation in prehistoric Sardinia”, *Hum. Genet.* 122, pp. 327-336.
- CARMONA, C. M., DOMEZAIN, A. y GARCÍA-GALLEGO, M. (2009): *Biology, conservation and sustainable development of sturgeons*, Springer-Verlag GmbH, Spain.
- CAVALLI-SFORZA, L. L. y FELDMAN, M. W. (2003): “The application of molecular genetic approaches to the study of human diversity”, *Nat. Genet.* 33, pp. 267.
- CAVALLI-SFORZA, L. L., MENOZZI, P. y PIAZZA, A. (2007): *The History and Geography of Human Genes*, Princeton, NJ.
- CAVALLI-SFORZA, L. L., MINCH, E., RICHARDS, M., MACAULAY, V., SYKES, B., PETTITT, P., HEDGES, R., FORSTER, P. y BANDELT, H. J. (1997): “Paleolithic and neolithic lineages in the European mitochondrial gene pool [8] (multiple letters)”, *Am. J. Hum. Genet.* 61, pp. 247-254.
- CIMINELLI, B. M., POMPEI, F., MALASPINA, P., HAMMER, M., PERSICHETTI, F., PIGNATTI, P. F., PALENA, A., ANAGNOU, N., GUANTI, G., JODICE, C., TERRENATO, L. y NOVELLETTO, A. (1995): “Recurrent simple tandem repeat mutations during human Y-chromosome radiation in Caucasian subpopulations”, *J. Mol. Evol.* 41, pp. 966-973.
- CLAYTON, D. A. (1992): “Structure and function of the mitochondrial genome”, *J. Inherit. Metab. Dis.* 15, pp. 439-447.
- COLLINS, M., NIELSEN-MARSH, C., HILLER, J., SMITH, C., ROBERTS, J., PRIGODICH, R., WESS, T., CSAPO, J., MILLARD, A. y TURNER-WALKER, G. (2002): “The survival of organic matter in bone: a review”, *Archaeometry* 44, pp. 383-394.
- CÔRTE-REAL, H. B. S. M., MACAULAY, V. A., RICHARDS, M. B., HARITI, G., ISSAD, M.

- S., CAMBON-THOMSEN, A., PAPIHA, S., BERTRANPETIT, J. y SYKES, B. C. (1996): "Genetic diversity in the Iberian Peninsula determined from mitochondrial sequence analysis", *Ann. Hum. Genet.* 60, pp. 331-350.
- CZARNY, J., GRZYBOWSKI, T., DERENKO, M. V., MALYARCHUK, B.A. y ŚLIWKA, D. M. (2005): "Genetic variation of 15 STR loci (D3S1358, vWA, FGA, TH01, TPOX, CSF1PO, D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, D2S1338, D8S1179, D21S11, D18S51, and D19S433) in populations of north and central Poland", *Forensic Sci.Int.* 147, pp. 97-100.
- DEGUILLOUX, M. F., PEMONGE, M. H., MENDISCO, F., THIBON, D., CARTRON, I. y CASTEX, D. (2014): "Ancient DNA and kinship analysis of human remains deposited in Merovingian necropolis sarcophagi (Jau Dignac et Loirac, France, 7th–8th century AD)", *Journal of Archaeological Science* 41, pp. 399-405.
- DIETRICH, M. R. (1998): "Paradox and persuasion: negotiating the place of molecular evolution within evolutionary biology", *Journal of the History of Biology* 31, pp. 85-111.
- DRISCOLL, C. A., YAMAGUCHI, N., BAR-GAL, G. K., ROCA, A. L., LUO, S., MACDONALD, D. W. y O'BRIEN, S. J. (2009): "Mitochondrial phylogeography illuminates the origin of the extinct caspian tiger and its relationship to the amur tiger", *Plos One* 4, pp. e4125.
- ECONOMOU, C., KJELLSTRÖM, A., LIDÉN, K. y PANAGOPOULOS, I. (2013): "Ancient-DNA reveals an Asian type of *Mycobacterium leprae* in medieval Scandinavia", *Journal of Archaeological Science* 40, pp. 465-470.
- ECONOMOU, E. P., BERGEN, A. W., WARREN, A. C. y ANTONARAKIS, S. E. (1990): "The polydeoxyadenylate tract of Alu repetitive elements is polymorphic in the human genome", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, pp. 2951-2954.
- ERMINI, L., OLIVIERI, C., RIZZI, E., CORTI, G., BONNAL, R., SOARES, P., LUCIANI, S., MARROTA, I., DE BELLIS, G. y RICHARDS, M. B. (2008): "Complete mitochondrial genome sequence of the Tyrolean Iceman", *Current Biology* 18, pp. 1687-1693.
- FERNÁNDEZ-SANTANDER, A., KANDIL, M., LUNA, F., ESTEBAN, E., GIMENEZ, F., ZAOUI, D. y MORAL, P. (1999): "Genetic relationships between southeastern Spain and Morocco: New data on ABO, RH, MNSs, and DUFFY polymorphisms", *Am. J. Hum. Biol.* 11, pp. 745-752.
- FINNILÄ, S., HASSINEN, I. E. y MAJAMAA, K. (2001): "Phylogenetic analysis of mitochondrial DNA in patients with an occipital stroke: Evaluation of mutations by using sequence data on the entire coding region", *Mutation Research - Mutation Research Genomics* 458, pp. 31-39.
- GARCÍA, J. (2010): *Evolución molecular de humanas antiguas de América y de la Península Ibérica*, Tesis Doctoral, Barcelona.
- GILBERT, M. T. P., KIVISILD, T., GRØNNOW, B., ANDERSEN, P. K., METSPALU, E., REIDL, M., TAMM, E., AXELSSON, E., GÖTHERSTRÖM, A. y CAMPOS, P. F. (2008): "Paleo-Eskimo mtDNA genome reveals matrilineal discontinuity in Greenland", *Science* 320, pp. 1787-1789.
- GILBERT, M. T. P., HANSEN, A. J., WILLERSLEV, E., RUDBECK, L., BARNES, I., LYNNERUP, N. y COOPER, A. (2003): "Characterization of genetic miscoding lesions caused by postmortem damage", *Am. J. Hum. Genet.* 72, pp. 48-61.
- GILBERT, M. T. P., WILLERSLEV, E., HANSEN, A. J., BARNES, I., RUDBECK, L., LYNNERUP, N. y COOPER, A. (2003): "Distribution patterns of postmortem damage in human mitochondrial DNA", *Am. J. Hum. Genet.* 72, pp. 32-47.
- GILES, R. E., BLANC, H., CANN, R. M. y WALLACE, D. C. (1980): "Maternal inheritance of human mitochondrial DNA", *Natl. Acad. Sci. USA* 83, pp. 9611-9615.
- GILL, P., IVANOV, P. L., KIMPTON, C., PIERCY, R., BENSON, N., TULLY, G., EVETT, I., HAGELBERG, E. y SULLIVAN, K. (1994): "Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis", *Nat. Genet.* 6, pp. 130-135.
- GILL, P., WERRETT, D. J., BUDOWLE, B. y GUERRIERI, R. (2004): "An assessment of whether SNPs will replace STRs in national DNA databases - Joint considerations of the DNA working group of the European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI) and the Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDM)", *Science and Justice - Journal of the Forensic Science Society* 44, pp. 51-53.
- GIRISH, K., RAHMAN, F. S. y TIPPU, S. R. (2010): "Dental DNA fingerprinting in identification of human remains", *Journal of forensic dental sciences* 2, p. 63.
- GOODMAN, M., TASHIAN, R.E. y TASHIAN, J. H. (1976): "Progress in Molecular Anthropology", *Curr. Anthropol.* 17, pp. 491-494.

- GREEN, R. E., KRAUSE, J., BRIGGS, A. W., MARICIC, T., STENZEL, U., KIRCHER, M., PATTERSON, N., LI, H., ZHAI, W. y FRITZ, M. H. Y. (2010): "A draft sequence of the Neandertal genome", *Science* 328, pp. 710-722.
- GREEN, R. E., MALASPINAS, A. S., KRAUSE, J., BRIGGS, A. W., JOHNSON, P.L.F., UHLER, C., MEYER, M., GOOD, J. M., MARICIC, T. y STENZEL, U. (2008): "A complete Neandertal mitochondrial genome sequence determined by high-throughput sequencing", *Cell* 134, pp. 416-426.
- GREENWOOD, A. D., CASTRESANA, J., FELDMAIER-FUCHS, G. y PÄÄBO, S. (2001): "A molecular phylogeny of two extinct sloths", *Mol. Phylogenet. Evol.* 18, pp. 94-103.
- GRIER, C., FLANIGAN, K., WINTERS, M., JORDAN, L. G., LUKOWSKI, S. y KEMP, B. M. (2013): "Using ancient DNA identification and osteometric measures of archaeological Pacific salmon vertebrae for reconstructing salmon fisheries and site seasonality at Dionisio Point, British Columbia", *Journal of Archaeological Science* 40, pp. 544-555.
- GUIMARAES, S., GHIROTTI, S., BENAZZO, A., MILANI, L., LARI, M., PILLI, E., PECCHIOLI, E., MALLEGGNI, F., LIPPI, B., BERTOLDI, F., GELICHI, S., CASOLI, A., BELLE, E. M. S., CARAMELLI, D. y BARBUJANI, G. (2009): "Genealogical discontinuities among Etruscan, medieval, and contemporary Tuscans", *Mol. Biol. Evol.* 26, pp. 2157-2166.
- HAGELBERG, E. y CLEGG, J. B. (1991): "Isolation and characterization of DNA from archaeological bone", *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 244(1309), pp. 45-50.
- HAGELBERG, E., QUEVEDO, S., TURBON, D. y CLEGG, J. B. (1994): "DNA from ancient Easter Islanders [5]", *Nature* 369, pp. 25-26.
- HAGEY, L. R., VIDAL, N., HOFMANN, A. F. y KRASOWSKI, M. D. (2010): "Evolutionary diversity of bile salts in reptiles and mammals, including analysis of ancient human and extinct giant ground sloth coprolites", *BMC Evol. Biol.* 10, pp. 133.
- HANDT, O., MEYER, S. y VON HAESELER, A. (1998): "Compilation of human mtDNA control region sequences", *Nucleic Acids Res.* 26, pp. 126-129.
- HÄNNI, C., LAUDET, V., SAKKA, M., BEGUE, A. y STEHELIN, D. (1990): "[Amplification of mitochondrial DNA fragments from ancient human teeth and bones]", *Comptes rendus de l'Academie des sciences.Serie III, Sciences de la vie* 310, pp. 365.
- HERRNSTADT, C., ELSON, J. L., FAHY, E., PRESTON, G., TURNBULL, D. M., ANDERSON, C., GHOSH, S. S., OLEFSKY, J. M., BEAL, M. F., DAVIS, R. E. y HOWELL, N. (2002): "Reduced-median-network analysis of complete mitochondrial DNA coding-region sequences for the major African, Asian, and European haplogroups", *Am. J. Hum. Genet.* 70, pp. 1152-1171.
- HIGUCHI, R., BOWMAN, B. y FREIBERGER, M. (1984): "DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family", *Nature* 312, pp. 282-284.
- HOWELL, N. y SMEJKAL, C. B. (2000): "Persistent heteroplasmy of a mutation in the human mtDNA control region: Hypermutation as an apparent consequence of simple-repeat expansion/contraction", *Am. J. Hum. Genet.* 66, pp. 1589-1598.
- IRIONDO, M., BARBERO, M. C. y MANZANO, C. (2003): "DNA polymorphisms detect ancient barriers to gene flow in basques", *Am. J. Phys. Anthropol.* 122, pp. 73-84.
- IVANOV, P. L. (1996): "Identification of the remains of the romanov family: contribution of molecular genetics", *Vestnik Rossijskoj Akademii Nauk* 66, pp. 310-316.
- IVANOV, P. L., WADHAMS, M. J., ROBY, R. K., HOLLAND, M. M., WEEDN, V. W. y PARSONS, T. J. (1996): "Mitochondrial DNA sequence heteroplasmy in the Grand Duke of Russia Georgij Romanov establishes the authenticity of the remains of Tsar Nicholas II", *Nat. Genet.* 12, pp. 417-420.
- IZAGIRRE, N. y DE LA RÚA, C. (1999): "An mtDNA analysis in ancient basque populations implications for haplogrop V as a marker for a major paleolithic expansion from southwestern Europe", *Am. J. Hum. Genet.* 65, pp. 199-207.
- JEHAES, E., DECORTE, R., PENEAU, A., PETRIE, J. H., BOIRY, P. A., GILISSEN, A., MOISAN, J. P., VAN DEN BERGHE, H., PASCAL, O. y CASSIMAN, J. J. (1998): "Mitochondrial DNA analysis on remains of a putative son of Louis XVI, King of France and Marie-Antoinette", *European Journal of Human Genetics* 6, pp. 383-395.
- JOBLING, M., HURLES, M. y TYLER-SMITH, C. (2003): *Human Evolutionary Genetics: Origins, People and Disease*, Garland Science/Taylor & Francis Group, New York.

- JOBLING, M. A. (2001): "In the name of the father: Surnames and genetics", *Trends in Genetics* 17, pp. 353-357.
- JOBLING, M. A. y TYLER-SMITH, C. (2003): "The human Y chromosome: An evolutionary marker comes of age", *Nature Reviews Genetics* 4, pp. 598-612.
- JOBLING, M. A. y TYLER-SMITH, C. (1995): "Fathers and sons: The Y chromosome and human evolution", *Trends in Genetics* 6, pp. 799-803.
- KAYSER, M., BRAUER, S., WILLUWEIT, S., SCHÄDLICH, H., BATZER, M. A., ZAWACKI, J., PRINZ, M., ROEWER, L. y STONEKING, M. (2002): "Online Y-chromosomal short tandem repeat haplotype reference database (YHRD) for U.S. populations", *J. Forensic Sci.* 47, pp. 513-519.
- KIM, W., YOO, T.-., KIM, S.-., SHIN, D.-., TYLER-SMITH, C., JIN, H.-., KWAK, K.-., KIM, E.-. y BAE, Y. (2007): "Lack of association between Y-chromosomal haplogroups and prostate cancer in the Korean population", *Plos One* 2, pp. e172.
- KING, T. E. y JOBLING, M. A. (2009): "What's in a name? Y chromosomes, surnames and the genetic genealogy revolution", *Trends in Genetics* 25, pp. 351-360.
- KISTLER, L. y SHAPIRO, B. (2011): "Ancient DNA confirms a local origin of domesticated chenopod in eastern North America", *Journal of Archaeological Science* 38, pp. 3549-3554.
- KIVISILD, T., METSPALU, M., BANDELT, H. J., RICHARDS, M. y VILLEMS, R. (2006): "The world mtDNA phylogeny", *Human Mitochondrial DNA and the Evolution of Homo sapiens* (Bandelt, H. J., Macaulay, V. y Richards, M., eds.), Springer-Verlag, Berlin, pp. 149-179
- KNAPP, M., ROHLAND, N., WEINSTOCK, J., BARYSHNIKOV, G., SHER, A., NAGEL, D., RABEDER, G., PINHASI, R., SCHMIDT, H. A. y HOFREITER, M. (2009): "First DNA sequences from Asian cave bear fossils reveal deep divergences and complex phylogeographic patterns", *Mol. Ecol.* 18, pp. 1225-1238.
- KONG, Q.-., YAO, Y.-., SUN, C., BANDELT, H.-., ZHU, C.-. y ZHANG, Y.-. (2003): "Phylogeny of East Asian mitochondrial DNA lineages inferred from complete sequences", *Am. J. Hum. Genet.* 73, pp. 671-676.
- KRAJEWSKI, C., BUCKLEY, L. y WESTERMAN, M. (1997): "DNA phylogeny of the marsupial wolf resolved", *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 264, pp. 911-917.
- KRAUSE, J., DEAR, P. H., POLLACK, J. L., SLATKIN, M., SPRIGGS, H., BARNES, I., LISTER, A. M., EBERSBERGER, I., PÄÄBO, S. y HOFREITER, M. (2005): "Multiplex amplification of the mammoth mitochondrial genome and the evolution of Elephantidae", *Nature* 439, pp. 724-727.
- KRAUSE, J., FU, Q., GOOD, J. M., VIOLA, B., SHUNKOV, M. V., DEREVIANKO, A. P. y PÄÄBO, S. (2010): "The complete mitochondrial DNA genome of an unknown hominin from southern Siberia", *Nature* 464, pp. 894-897.
- KRAUSZ, C., QUINTANA-MURCI, L. y FORTI, G. (2004): "Y chromosome polymorphisms in medicine", *Ann. Med.* 36, pp. 573-583.
- LARRUGA, J. M., DÍEZ, F., PINTO, F. M., FLORES, C. y GONZÁLEZ, A. M. (2001): "Mitochondrial DNA characterisation of European isolates: the Maragatos from Spain", *Eur. J. Hum. Genet.* 9, pp. 708-716.
- LEE, E. J., RENNEBERG, R., HARDER, M., KRAUSE-KYORA, B., RINNE, C., MÜLLER, J., NEBEL, A. y VON WURMB-SCHWARK, N. (2012): "Collective burials among agro-pastoral societies in later Neolithic Germany: perspectives from ancient DNA", *Journal of Archaeological Science*, pp. 1-7.
- LESSIG, R., WILLUWEIT, S., KRAWCZAK, M., WU, F.-., PU, C.-., KIM, W., HENKE, L., HENKE, J., MIRANDA, J., HIDDING, M., BENECKE, M., SCHMITT, C., MAGNO, M., CALACAL, G., DELFIN, F. C., DE UNGRIA, M. C. A., ELIAS, S., AUGUSTIN, C., TUN, Z., HONDA, K., KAYSER, M., GUSMAO, L., AMORIM, A., ALVES, C., HOU, Y., KEYSER, C., LUDES, B., KLINTSCHAR, M., IMMEL, U. D., REICHENPFADER, B., ZAHAROVA, B. y ROEWER, L. (2003): "Asian online Y-STR haplotype reference database", *Leg. Med.* 5, pp. S160-S163.
- LI, M., SCHÖNBERG, A., SCHAEFER, M., SCHROEDER, R., NASIDZE, I. y STONEKING, M. (2010): "Detecting heteroplasmy from high-throughput sequencing of complete human mitochondrial DNA genomes", *Am. J. Hum. Genet.* 87, pp. 237-249.
- LINDSTRÖM, S., ADAMI, H. O., ADOLFSSON, J. y WIKLUND, F. (2008): "Y chromosome haplotypes and prostate cancer in Sweden", *Clinical Cancer Research* 14, pp. 6712-6716.
- LITT, M. y LUTY, J. A. (1989): "A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification

- of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene”, *Am. J. Hum. Genet.* 44, pp. 397-401.
- LUCOTTE, G. y LOIRAT, F. (1999): “Y-chromosome DNA haplotype 15 in Europe”, *Hum. Biol.* 71, pp. 431-437.
- LUTZ, S., WEISSER, H.-., HEIZMANN, J. y POLLAK, S. (2000): “Mitochondrial heteroplasmy among maternally related individuals”, *Int. J. Legal Med.* 113, pp. 155-161.
- MACA-MEYER, N., GONZÁLEZ, A. M., LARRUGA, J. M., FLORES, C. y CABRERA, V. M. (2001): “Major genomic mitochondrial lineages delineate early human expansions”, *BMC genetics [electronic resource]* 2, p. 13.
- MAJUMDER, P. P. (2008): “Genomic inferences on peopling of south Asia”, *Current Opinion in Genetics and Development* 18, pp. 280-284.
- MOURANT, A. E., KOPEC, A. G. y DOMANIEWSKA-ZOBACZAK, K. (1976): *The Distribution of the Human Blood Groups and Other Polymorphisms*, Oxford Univ. Press, London.
- MURUGANANDHAN, J. y SIVAKUMAR, G. (2011): “Practical aspects of DNA-based forensic studies in dentistry”, *Journal of Forensic Dental Sciences* 3, pp. 38.
- OLIVEIRA, H. R., CIVÁŇ, P., MORALES, J., RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, A., LISTER, D.L. y JONES, M. K. (2012): “Ancient DNA in archaeological wheat grains: preservation conditions and the study of pre-Hispanic agriculture on the island of Gran Canaria (Spain)”, *Journal of Archaeological Science* 39, pp. 828-835.
- ORLANDO, L., CALVIGNAC, S., SCHNEBELEN, C., DOUADY, C. J., GODFREY, L. R. y HÄNNI, C. (2008): “DNA from extinct giant lemurs links archaeolemurids to extant indriids”, *BMA Evol. Biol.* 8, p. 121.
- PÄÄBO, S. (1989): “Ancient DNA: Extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, pp. 1939-1943.
- PÄÄBO, S. (1985): “Molecular cloning of ancient Egyptian mummy DNA”, *Nature* 314, pp. 644-645.
- PÄÄBO, S. (1985): “Preservation of DNA in ancient Egyptian mummies”, *Journal of Archaeological Science* 12, pp. 411-417.
- PÄÄBO, S., HIGUCHI, R. G. y WILSON, A. C. (1989): “Ancient DNA and the polymerase chain reaction. The emerging field of molecular archaeology”, *J. Biol. Chem.* 264, pp. 9709-9712.
- PÄÄBO, S., IRWIN, D. M. y WILSON, A. C. (1990): “DNA damage promotes jumping between templates during enzymatic amplification”, *J. Biol. Chem.* 265, pp. 4718-4721.
- PÄÄBO, S., POINAR, H., SERRE, D. y JAENICKE-DESPR’ES, V. (2004): “Genetic analyses from ancient DNA”, *Annu. Rev. Genet.* 38, pp. 645-679.
- PAKENDORF, B. y STONEKING, M. (2005): “Mitochondrial DNA and human evolution”, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2005:6, pp. 165-183.
- PARSONS, T. J., MUNIEC, D. S., SULLIVAN, K., WOODYATT, N., ALLISTON-GREINER, R., WILSON, M. R., BRERY, D. L., HOLLAND, K. H., WEEDN, V. W., GILL, P. y HOLLAND, M. M. (1997): “A high observed substitutional rate in the human mitochondrial DNA control region”, *Nat. Genet.* 15, pp. 362-367.
- PAXINOS, E. E., JAMES, H. F., OLSON, S. L., SORENSON, M. D., JACKSON, J. y FLEISCHER, R. C. (2002): “mtDNA from fossils reveals a radiation of Hawaiian geese recently derived from the Canada goose (*Branta canadensis*)”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, pp. 1399-1404.
- PEREIRA, L., CUNHA, C., ALVES, C. y AMORIM, A. (2005): “African female heritage in Iberia: a reassessment of mtDNA lineage distribution in present times”, *Hum. Biol.* 77, pp. 213-229.
- PÉREZ-LEZAUN, A., CALAFELL, F., SEIELSTAD, M., MATEU, E., COMAS, D., BOSCH, E. y BERTRANPETIT, J. (1997): “Population genetics of Y-chromosome short tandem repeats in humans”, *J. Mol. Evol.* 45, pp. 265-270.
- PILLI, E., MODI, A., SERPICO, C., ACHILLI, A., LANCIANI, H., LIPPI, B., BERTOLDI, F., GELICHI, S., LARI, M. y CARAMELLI, D. (2013): “Monitoring DNA Contamination in Handled vs. Directly Excavated Ancient Human Skeletal Remains”, *PLoS ONE* 8.
- POULAKAKIS, N., TSELIKAS, A., BITSAKIS, I., MYLONAS, M. y LYMBERAKIS, P. (2007): “Ancient DNA and the genetic signature of ancient Greek manuscripts”, *Journal of Archaeological Science* 34, pp. 675-680.
- PRUVOST, M., SCHWARZ, R., CORREIA, V. B., CHAMPLOT, S., BRAGUIER, S., MOREL, N., FERNANDEZ-JALVO, Y., GRANGE, T. y GEIGL, E.M. (2007): “Freshly excavated fossil bones are best for amplification of ancient DNA”, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, pp. 739.

- RAMÍREZ, O., GIGLI, E., BOVER, P., ALCOVER, J. A., BERTRANPETIT, J., CASTRESANA, J. y LALUEZA-FOX, C. (2009): "Paleogenomics in a temperate environment: Shotgun sequencing from an extinct Mediterranean caprine", *PlosOne* 4, pp. e5670.
- REBBECK, T. R., AMBROSONE, C. B., BELL, D. A., CHANOCK, S. J., HAYES, R. B., KADLUBAR, F. F. y THOMAS, D. C. (2004): "SNPs, Haplotypes, and cancer: Applications in molecular epidemiology", *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 13, pp. 681-687.
- REICH, D., GREEN, R. E., KIRCHER, M., KRAUSE, J., PATTERSON, N., DURAND, E. Y., VIOLA, B., BRIGGS, A. W., STENZEL, U. y JOHNSON, P. L. F. (2010): "Genetic history of an archaic hominin group from Denisova Cave in Siberia", *Nature* 468, pp. 1053-1060.
- REICH, D., PATTERSON, N., CAMPBELL, D., TANDON, A., MAZIERES, S., RAY, N., PARRA, M. V., ROJAS, W., DUQUE, C., MESA, N., GARCÍA, L. F., TRIANA, O., BLAIR, S., MAESTRE, A., DIB, J. C., BRAVI, C. M., BAILLIET, G., CORACH, D., HÜNEMEIER, T., BORTOLINI, M. C., SALZANO, F. M., PETZL-ERLER, M. L., ACUÑA-ALONZO, V., AGUILAR-SALINAS, C., CANIZALES-QUINTEROS, S., TUSIÉ-LUNA, T., RIBA, L., RODRÍGUEZ-CRUZ, M., LOPEZ-ALARCÓN, M., CORAL-VAZQUEZ, R., CANTO-CETINA, T., SILVA-ZOLEZZI, I., FERNANDEZ-LOPEZ, J. C., CONTRERAS, A. V., JIMENEZ-SANCHEZ, G., GÓMEZ-VÁZQUEZ, M. J., MOLINA, J., CARRACEDO, A., SALAS, A., GALLO, C., POLETTI, G., WITONSKY, D. B., ALKORTA-ARANBURU, G., SUKERNIK, R. I., OSIPOVA, L., FEDOROVA, S. A., VASQUEZ, R., VILLENA, M., MOREAU, C., BARRANTES, R., PAULS, D., EXCOFFIER, L., BEDOYA, G., ROTHHAMMER, F., DUGOUJON, J.-., LARROUY, G., KLITZ, W., LABUDA, D., KIDD, J., KIDD, K., DI RIENZO, A., FREIMER, N. B., PRICE, A. L. y RUIZ-LINARES, A. (2012): "Reconstructing Native American population history", *Nature* 488, pp. 370-374.
- RELETHFORD, J. H. (2008): "Genetic evidence and the modern human origins debate", *Heredity* 100, pp. 555-563.
- REYMENT, R. A. (1983): "Moors and Christians: an example of multivariate analysis applied to human blood-groups", *Ann. Hum. Biol.* 10, pp. 505-521.
- RICHARDS, M., MACAULAY, V., HICKEY, E., VEGA, E. y SYKES, B. (2000): "Tracing European founder lineages in the Near Eastern mtDNA pool", *Am. J. Hum. Genet.* 62, pp. 241-260.
- RICHARDS, M. B., MACAULAY, V. A., BANDELT, H. J. y SYKES, B. C. (1998): "Phylogeography of mitochondrial DNA in Western Europe", *Ann. Hum. Genet.* 61, pp. 251-254.
- RICHARDS, R. I. y SUTHERLAND, G. R. (1992): "Heritable unstable DNA sequences", *Nat. Genet.* 1, pp. 7-9.
- RICKARDS, O., MARTINEZ-LABARGA, C., CASALOTTI, R., CASTELLANA, G., TUNZI SISTO, A. y MALLEGGNI, F. (2000): "MtDNA variability in extinct and extant populations of Sicily and Southern Italy", *Archaeogenetics: DNA and the population prehistory of Europe*, pp. 175-183.
- RIZZI, E., LARI, M., GIGLI, E., DE BELLIS, G. y CARAMELLI, D. (2012): "Ancient DNA studies: New perspectives on old samples", *Genet. Sel. Evol.* 44, p. 21.
- ROBLES, F., CANO-ROLDÁN, B., RUIZ REJÓN, C., MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, L. J., ÁLVAREZ-CUBERO, M. J., LORENTE, J. A., RIQUELME CANTAL, J. A., AGUAYO DE HOYOS, P., CARRASCO RUS, J., CORTÉS SÁNCHEZ, M., SIMÓN VALLEJO, M. D., RUIZ REJÓN, M. y DE LA HERRÁN, R. (2010): "Determining the specific status of the Iberian sturgeons by means genetic analyses of old specimens", *Advances in Bioscience and Biotechnology* 1, pp. 171-179.
- RODRÍGUEZ-EZPELETA, N., ÁLVAREZ-BUSTO, J., IMAZ, L., REGUEIRO, M., AZCÁRATE, M. N., BILBAO, R., IRIONDO, M., GIL, A., ESTONBA, A. y ARANSAY, A. M. (2010): "High-density SNP genotyping detects homogeneity of Spanish and French Basques, and confirms their genomic distinctiveness from other European populations", *Hum. Genet.* 128, pp. 113-117.
- ROEWER, L. y CARRACEDO, A. (2001): "Second Forensic Y chromosome User Workshop, Institute of Legal Medicine (Humboldt-University) in Berlin, Germany 16-17 June, 2000: Foreword", *Forensic Sci. Int.* 118, p. 105.
- ROEWER, L., KRAWCZAK, M., WILLUWEIT, S., NAGY, M., ALVES, C., AMORIM, A., ANSLINGER, K., AUGUSTIN, C., BETZ, A., BOSCH, E., CAGLIÁ, A., CARRACEDO, A., CORACH, D., DEKAIRELLE, A.-., DOBOSZ, T., DUPUY, B. M., FÜREDI, S., GEHRIG, C., GUSMAO, L., HENKE, J., HENKE, L., HIDDING, M., HOHOFF, C., HOSTE, B., JOBLING, M. A., KÄRGEL, H. J., DE KNIJFF, P., LESSIG, R., LIEBEHERR,

- E., LORENTE, M., MARTÍNEZ-JARRETA, B., NIEVAS, P., NOWAK, M., PARSON, W., PASCALI, V. L., PENACINO, G., PLOSKI, R., ROLF, B., SALA, A., SCHMIDT, U., SCHMITT, C., SCHNEIDER, P. M., SZIBOR, R., TEIFELGREDING, J. y KAYSER, M. (2001): "Online reference database of European Y-chromosomal short tandem repeat (STR) haplotypes", *Forensic Sci. Int.* 118, pp. 106-113.
- ROMERO, A. A., JAMISON, M. G. y WEIDNER, A. C. (2008): "Are single nucleotide polymorphisms associated with pelvic organ prolapse?", *Journal of Pelvic Medicine and Surgery* 14, pp. 37-43.
- SAMPIETRO, M. L., CARAMELLI, D., LAO, O., CALAFELL, F., COMAS, D., LARI, M., AGUSTÍ, B., BERTRANPETIT, J. y LALUEZA-FOX, C. (2005): "The genetics of the pre-Roman Iberian Peninsula: A mtDNA study of ancient Iberians", *Ann. Hum. Genet.* 69, pp. 535-548.
- SCHMITZ, R. W., SERRE, D., BONANI, G., FEINE, S., HILLGRUBER, F., KRAINITZKI, H., PÄÄBO, S. y SMITH, F. H. (2002): "The Neandertal type site revisited: Interdisciplinary investigations of skeletal remains from the Neander Valley, Germany", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, pp. 13342-13347.
- SCOZZARI, R., TORRONI, A., SEMINO, O., SIRUGO, G., BREGA, A. y SANTACHIARA-BENERECETTI, A. S. (1988): "Genetic studies on the Senegal population. I. Mitochondrial DNA polymorphisms", *Am. J. Hum. Genet.* 43, pp. 534-544.
- SEMINO, O., PASSARINO, G., OEFNER, P. J., LIN, A. A., ARBUZOVA, S., BECKMAN, L. E., DE BENEDICTIS, G., FRANCALACCI, P., KOUVATSI, A., LIMBORSKA, S., MARCIKIAE, M., MIKA, A., MIKA, B., PRIMORAC, D., SANTACHIARA-BENERECETTI, A. S., CAVALLI-SFORZA, L. L. y UNDERHILL, P. A. (2000): "The genetic legacy of paleolithic Homo sapiens sapiens in extant europeans: A Y chromosome perspective", *Science* 290, pp. 1155-1159.
- SHRESTHA, S., SMITH, M. W., BEATY, T. H. y STRATHDEE, S. A. (2005): "Theory and methodology for utilizing genes as biomarkers to determine potential biological mixtures", *Ann. Epidemiol.* 15, pp. 29-38.
- SHUSTER, R. C., RUBENSTEIN, A. J. y WALLACE, D. C. (1988): "Mitochondrial DNA in anucleate human blood cells", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 155, pp. 1360-1365.
- SKOGLUND, P., STORÅ, J., GÖTHERSTRÖM, A. y JAKOBSSON, M. (2013): "Accurate sex identification of ancient human remains using DNA shotgun sequencing", *Journal of Archaeological Science* 40, pp. 4477-4482.
- STONE, A. C. y STONEKING, M. (1993): "Ancient DNA from a pre-Columbian Amerindian population", *Am. J. Phys. Anthropol.* 92, pp. 463-471.
- TEMPLETON, A. R. (2007): "Genetics and recent human evolution", *Evolution* 61, pp. 1507-1519.
- THANGARAJ, K., CHAUBEY, G., KIVISILD, T., REDDY, A. G., SINGH, V. K., RASALKAR, A. A. y SINGH, L. (2005): "Reconstructing the origin of Andaman Islanders", *Science* 308, p. 996.
- THOMAS, W. K., PAABO, S., VILLABLANCA, F. X. y WILSON, A. C. (1990): "Spatial and temporal continuity of kangaroo rat populations shown by sequencing mitochondrial DNA from museum specimens", *J. Mol. Evol.* 31, pp. 101-112.
- TORRONI, A., HUOPONEN, K., FRANCALACCI, P., PETROZZI, M., MORELLI, L., SCOZZARI, R., OBINU, D., SAVONTAUS, M.-. y WALLACE, D. C. (1996): "Classification of european mtDNAs from an analysis of three European populations", *Genetics* 144, pp. 1835-1850.
- TORRONI, A., SCHURR, T. G., YANG, C.-., SZATHMARY, E. J. E., WILLIAMS, R. C., SCHANFIELD, M. S., TROUP, G. A., KNOWLER, W. C., LAWRENCE, D. N., WEISS, K. M. y WALLACE, D. C. (1992): "Native American mitochondrial DNA analysis indicates that the Amerind and the Nadene populations were founded by two independent migrations", *Genetics* 130, pp. 153-162.
- VAN OORSCHOT, R. A. H., BALLANTYNE, K. N. y MITCHELL, R. J. (2010): "Forensic trace DNA: a review", *Investigative Genetics* 1, pp. 1-17.
- VERNESI, C., CARAMELLI, D., DUPANLOUP, I., BERTORELLE, G., LARI, M., CAPPELLINI, E., MOGGI-CECCHI, J., CHIARELLI, B., CASTRÌ, L., CASOLI, A., MALLEGGNI, F., LALUEZA-FOX, C. y BARBUJANI, G. (2004): "The Etruscans: A Population-Genetic Study", *Am. J. Hum. Genet.* 74, pp. 694-704.
- VIGILANT, L., STONEKING, M., HARPENDING, H., HAWKES, K. y WILSON, A. C. (1991): "African populations and the evolution of human mitochondrial DNA", *Science* 253, pp. 1503-1507.
- WALLACE, D. C. (1992): "Mitochondrial genetics: A paradigm for aging and degenerative diseases?", *Science* 256, pp. 628-632.

- WALLACE, D. C. y TORRONI, A. (1992): "American Indian prehistory as written in the mitochondrial DNA: a review", *Human Biology* 64, pp. 403-416.
- WATSON, J. D. y CRICK, F. H. C. (1953): "Molecular Structure of Nucleic Acids - A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid", *Nature* 171, pp. 737-738.
- WEBER, J. y MAY P. (1989): "Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using then polymerase chain reaction", *Am. J. Hum. Genet.* 44, pp. 338-396.
- WOLPOFF, M. H., SPUHLER, J. N., SMITH, F. H., RADOVČIĆ, J., POPE, G., FRAYER, D. W., ECKHARDT, R. y CLARK, G. (1988): "Modern human origins [1]", *Science* 241, pp. 772-773.
- XING, J., WATKINS, W. S., HU, Y., HUFF, C. D., SABO, A., MUZNY, D. M., BAMSHAD, M. J., GIBBS, R. A., JORDE, L. B. y YU, F. (2010): "Genetic diversity in India and the inference of Eurasian population expansion", *Genome Biol.* 11, p. R113.



Lám. I.—Limpieza y tratamiento de las muestras en el laboratorio.



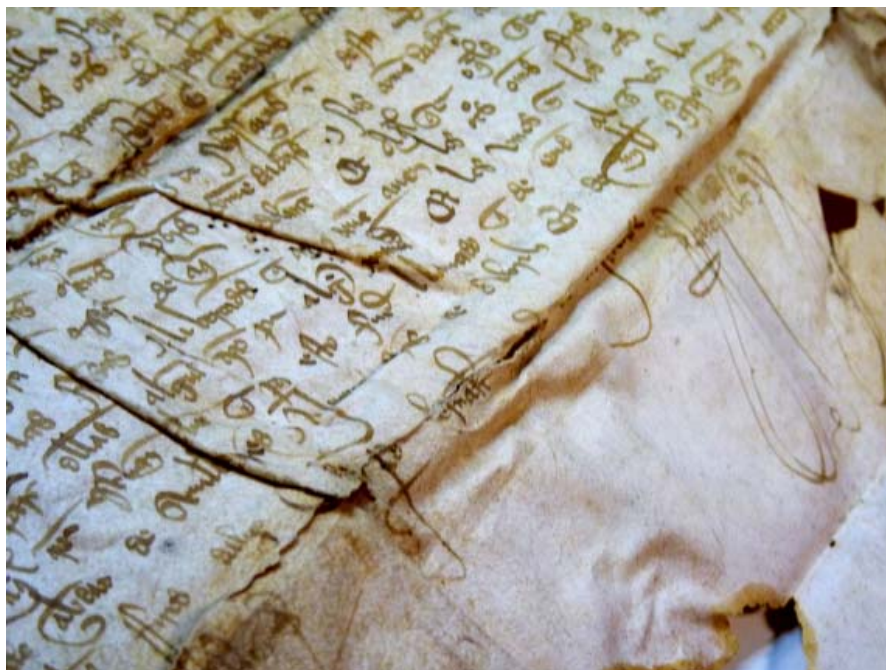
Lám. II.—Condiciones de trabajo con muestras de aDNA.



Lám. III.—Esturión capturado en el río Guadalquivir.



Lám. IV.—Restos óseos pertenecientes a Cristóbal Colón encontrados en la catedral de Sevilla.



Lám. V.—Detalle de un pergamino del siglo XIV.