

¿Porqué no se puede hacer estudios de ADN de restos óseos antiguos en Badajoz?

M^a JESÚS FIGUERO MAYNAR
 DIEGO PERAL PACHECO
 JOSÉ ANTONIO SÁNCHEZ SÁNCHEZ
*Facultad de Medicina
 Universidad de Extremadura*

RESUMEN

Se abordan las complicaciones y necesidades con las que nos encontramos a la hora de realizar estudios con ADN procedentes de restos óseos antiguos, así como el plantear protocolos de actuación para la mejor obtención, manipulación y mantenimiento de los mismos. Se hará referencia a la mayoría de las modificaciones moleculares que sufren estos restos óseos antiguos incluyendo su ADN y que son las causantes en muchas ocasiones de su degradación, escasez y contaminación.

ABSTRACT

We show in this study complications and necessities that we would find making studies with DNA from old bony rest, as well as raising protocols to improving the obtainig , manipulation and maintenance methods . We will talk about most of molecular modifications which old bony rest and DNA suffer and in most of cases they are the degradation, shortage and contamination originating.

INTRODUCCIÓN

Convencionalmente la identificación positiva de restos humanos se había venido realizando mediante el análisis y comparación de huellas dactilares, radiografías esqueléticas o dentales, y en ocasiones por la presencia de marcas únicas, tales como tatuajes o cicatrices.

Sin embargo, en los últimos años la tecnología del ADN, es decir, del ácido desoxirribonucleico, ha surgido como una poderosa herramienta para la identificación individual especialmente en casos donde el tejido blando está severamente descompuesto o dañado, o no se pueden hacer comparaciones odontológicas o antropológicas. Así, muchos restos humanos que consistían solamente en huesos, han sido identificados exitosamente por diferentes metodologías de ADN.

De todos es conocido que el ácido desoxirribonucleico (ADN) es el material genético que se encuentra en todas las células del cuerpo humano, que puede almacenarse en distintas zonas de las células. El ADN nuclear se encuentra en el núcleo, y se hereda mitad de la madre y mitad del padre, con excepción del ADN presente en el cromosoma Y masculino, que sólo se hereda por línea paterna.

El ADN mitocondrial está presente en los orgánulos de las células conocidos como mitocondrias y sólo se heredan por línea materna. Aunque estos dos tipos de ADN se diferencian por su origen y función, estructuralmente son similares. Ambos pueden aportar valiosas pruebas en las investigaciones.

Tres características convierten al ADNm en una herramienta especialmente útil en la reconstrucción del pasado reciente de las poblaciones humanas:

- a) La poliplasmia
- b) Su herencia materna
- c) Su elevada tasa de cambio molecular

Se denomina **poliplasmia** al elevado número de copias de ADNm que se encuentra en cada mitocondria, y por extensión en la célula. En el interior de la mitocondria el ADNm se encuentra unido a ciertas proteínas (binding proteins) formando un complejo denominado nucleoide. Una mitocondria puede contener entre 2- 10 de estas estructuras, por lo que el número de copias del ADN mitocondrial por célula oscila entre 1000 y 10000. Tal particu-

laridad hace muy recomendable el estudio de ADN mitocondrial en los casos en los que el material genético de partida es muy escaso o está muy degradado, como acostumbra a suceder los restos antiguos.

Herencia materna: El ADN mitocondrial se transmite de forma no mendeliana por línea materna. Aunque hombres y mujeres lo tienen, son únicamente las mujeres quienes lo transmiten a su descendencia.

En los últimos años se ha cuestionado, esporádicamente, la transmisión exclusivamente materna del ADNm. Algunos estudios de herencia de ADNm en familias son contradictorios a este respecto. Mientras que autores como Parsons e Irwin (2000), y Torroni et al (1998), no hallan evidencias de herencia paterna en ninguno de los descendientes analizados, otros señalan evidencias de recombinación entre el ADN mitocondrial de origen materno y paterno (Schwartz y Vissing, 2002; Hagelberg et al., 1999). Estos estudios hoy día continúan en debate sin cerrarse ni superarse. De momento la evidencia de recombinación es bastante ocasional (Hagelberg, 2003; Elson et al, 2001), pero si se demostrara finalmente, la validez de las inferencias obtenidas de los estudios de ADNm de las poblaciones humanas se vería seriamente comprometida.

Tasa de mutación: La tasa de evolución del ADNm es más rápida que la del ADNn, hasta 10 veces más rápida (Brown, 1980). Esto se ha relacionado con las características de este material genético y con el entorno que lo rodea. El ADNm no está protegido por proteínas tipo histonas como el ADNn y se ve continuamente expuesto a la acción de los radicales libres generados por el metabolismo oxidativo. Además, se ha demostrado que los sistemas genéticos de reparación del ADNm son menos eficientes que los nucleares. Los tres factores bastarían en principio para explicar la elevada tasa de mutación del ADNm, pero hay que añadirles, además, la elevada susceptibilidad de este material genético a los efectos de la deriva genética, mecanismo mediante el cual las mutaciones que experimentan tienen elevada probabilidad de fijación (Wallace, 1994).

El proceso conocido como análisis de ADN comienza con el examen del material genético recuperado de muestras diminutas tomadas de tejidos humanos o fluidos corporales; así se obtiene una “huella” o un «perfil», sinónimos en relación con este tema.

El perfil resultante es una serie de números alfanuméricos que se pueden comparar fácilmente con otros de referencia o ya conocidos, y posterior-

mente archivar en un ordenador. Si se estudian suficientes zonas del ADN, el perfil puede ser relativamente único para cada individuo, o corresponder a la línea materna o paterna.

Se han venido realizando múltiples estudios con ADN antiguo como es el caso del estudio de un segmento del gen del citocromo C mitocondrial del lobo marsupial (Thomas et al, 1989) reveló su relación con otros marsupiales australianos pero no con los sudamericanos como se había sugerido.

Otro trabajo destacable fue el desarrollado por el equipo de Alan Cooper (Cooper et al, 1992). Se estudió la relación de las moas (aves gigantes no voladoras oriundas de Nueva Zelanda) con otras especies voladoras y no voladoras de Australia y Sudamérica. Mediante la obtención de secuencias de mDNA de especímenes de cuatro especies de moas, una de ellas de 3500 años de antigüedad, se demostró que las moas estaban más relacionadas con los emúes Australianos y con los casuarios que con los Kivis. La secuencia completa del ADNm de las moas ha sido publicado recientemente, lo que ha permitido datar de una manera más precisa las divergencias dentro de este grupo y ha sugerido un origen en el cretácico tardío para estas aves no voladoras (Cooper et al, 2001).

Por otra parte, entre los estudios que han tenido mayor relevancia dentro del campo de la antropología destaca la caracterización genética del hombre de Neandertal. Los Neandertales son un grupo de homínidos extintos que habitaron Europa y el oeste de Asia entre hace 30000 y 300000 años aproximadamente. Durante parte de este tiempo coexistieron con humanos modernos «homo sapiens sapiens» originarios del continente africano. La relación filogenético de este grupo con el humano actual ha sido ampliamente discutida barajándose tres hipótesis:

1. Los Neandertales fueron los ancestros directos de los europeos actuales
2. Los Neandertales fueron totalmente reemplazados por los humanos modernos sin mezclarse
3. A pesar de ser finalmente reemplazados por el hombre moderno, existió cierta mezcla entre ambas subespecies durante el periodo de convivencia, por lo que potencialmente habría cierta contribución genética de los Neandertales al pool genético humano actual.

El análisis de la variabilidad genética actual en los genomas nuclear y mitocondrial ha contribuido a apoyar la segunda de estas hipótesis (Cann et al 1987; Vigilant et al, 1991; Hammer, 1995; Armour et al, 1996; Tishkoff et al, 1996).

El elevado número de diferencias observadas entre las secuencias de Neandertal recuperadas hasta la fecha y las secuencias humanas actuales ha sido interpretado como evidencia de ausencia de contribución genética significativa de los Neandertales al acervo genético de la humanidad actual (Krings et al 2000, 1997; Ovchinnikov et al, 2000; Schmitz et al 2002; Serre et al, 2004).

Entre las aplicaciones del ADN antiguo a la paleopatología y medicina forense cabe destacar tres principalmente: el cálculo mínimo de individuos, el diagnóstico del sexo y el establecimiento de relaciones familiares. En el ámbito de la genética forense, además de las dos últimas aplicaciones mencionadas se ha recurrido a la tecnología del ADN antiguo para la identificación personal.

La demostración de que algunas secuencias específicas del ADN pueden ser recuperadas de huesos, indica que existen vastas fuentes de material genético preservado en huesos antiguos que pueden estar disponibles para su estudio. [Por hueso antiguo se debe entender cualquier hueso que haya estado expuesto a degradación ambiental por un apreciable periodo de tiempo]. A pesar de que los huesos antiguos son una buena fuente de ADN, hay una gran dificultad para cuantificar y caracterizar la cantidad de ADN recuperada en fragmentos óseos sometidos a condiciones ambientales no controladas, debido a que:

- a) existen distintos métodos de extracción, con diferentes eficacias.
- b) el ADN recuperado de huesos antiguos es predominantemente de bajo peso molecular y puede arrastrar impurezas que den autoflorescencia bajo la luz ultravioleta a longitudes de 260-280 nm confundiendo la cuantificación por espectrofotometría o por tinción con bromuro de etidio.
- c) la mayoría del ADN recuperado de una muestra expuesta a condiciones ambientales no controladas puede provenir de hongos y otros microorganismos.

- d) el ADN antiguo puede consistir solamente de fragmentos cortos que aparecerían como de alto peso molecular en geles debido al entrecruzamiento de hebras.
- e) el ADN dañado puede interferir la hibridación con sondas específicas de especie rindiendo resultados sospechosos.

Hay que tener en cuenta para todo estudio con ADN antiguo que cuando un organismo muere comienza un proceso de degradación de sus biomoléculas, entre ellas el ADN. La muerte celular comporta la liberación de las enzimas autolíticas contenidas en los lisosomas celulares. La pérdida de la regulación celular aumenta la actividad de estas enzimas, entre las que se incluyen tanto las endo como exonucleasas, que degradan el material genético en un proceso conocido como autolisis (Pääbo et al, 1989). Cuando la actividad nucleásica cesa, se produce la colonización del organismo por bacterias, hongos, y en algunos casos insectos que continúan el proceso de descomposición. Finalmente, son procesos químicos, principalmente de hidrólisis y oxidación, los que completan la degradación del material genético (Lindahl, 1993 a). Por tanto, la hidrólisis y la oxidación son los procesos responsables de la degradación del ADN en las células, tras la muerte del organismo.

Desde el desarrollo del ADN antiguo, se ha comprobado que el material genético se conserva mejor en tejidos duros, como hueso o dientes, que en tejidos blandos (Hagelberg y Sykes, 1989; Hänni et al 1990). La causa puede ser el bajo contenido en agua y enzimas en tales tejidos, aunque también se ha propuesto que el ADN podría resultar “secuestrado” por la hidroxiapatita de los mismos, lo que lo protegería de la acción de las enzimas degradadoras (Sambrook et al 1989; Lindhal 1993b).

De los dos tejidos duros mencionados anteriormente, el diente es el que ofrece mayor garantía a la hora de recuperar información genética endógena.

También es importante las condiciones del enterramiento, las características del ambiente en el que se encuentra depositado un resto puede ralentizar e incluso detener el proceso de degradación. Los factores que más afectan son la temperatura, pH, humedad y la presencia de ciertos componentes del suelo. Las temperaturas bajas favorecen la conservación óptima del hueso, sin embargo si la temperatura es elevada no garantiza la correcta conservación del

material genético aunque conduzca a otras situaciones favorables como sequedad, ausencia de microorganismos.

La humedad ejerce un efecto adverso sobre la preservación del material genético, ya que permite la penetración en su interior de sustancias orgánicas del sedimento en el interior del resto por lo que aumentan las posibilidades de que el ADN se encuentre junto con moléculas inhibidoras. Además la humedad favorece reacciones como la degradación hidrolítica y oxidativa que da lugar a una disminución en la calidad y cantidad del ADN.

El pH neutro o ligeramente alcalino favorece la preservación del ADN. El pH conforme disminuye va provocando la degradación de la hidroxiapatita de dientes o huesos.

Algunos compuestos minerales del suelo como feldespato, cuarzo, etc, se podrían unir al ADN protegiéndolo frente a la acción endonucleásica.

En cuanto al almacenamiento se conoce que es una fase en el que el proceso de degradación del material genético continúa bajo nuevas condiciones. En general el almacenamiento frío de un resto (-20°C) inmediato tras su exhumación favorece una mejor preservación de su material genético y da lugar a resultados reproducibles (Burger et al, 1999). El grado de alteración de los materiales almacenados a temperatura ambiente es mayor y depende del tiempo de permanencia bajo estas condiciones.

El material genético ya extraído de un resto antiguo puede seguir degradándose.

Existen problemas metodológicos en la obtención de DNA antiguo que tropieza con una serie de inconvenientes técnicos, relacionadas sobre todo con el estado de preservación del ADN en esos restos. Algunas de las características de este ADN que hace más difícil su estudio a diferencia del ADN procedente de organismos vivos son:

- Escasez
- Fragmentación de cadenas
- Modificaciones moleculares
- Presencia de inhibidores de la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) en los extractos

La escasez de la muestra se debe a la degradación post-mortem del material genético donde se observan algunos acontecimientos como son las modificaciones moleculares: Algunas de las modificaciones moleculares del ADN antiguo, consecuencia de su degradación post-mortem, pueden limitar e incluso impedir totalmente su recuperación. Pueden ser modificaciones oxidativas de las bases nitrogenadas y los residuos de azúcar inducidas por acción de radicales libres como peróxido de hidrógeno, ion hidroxilo, y el ion superóxido que pueden bloquear la taq polimerasa impidiendo la elongación de las cadenas e inhibiendo por tanto la PCR. La solución a este problema puede ser la amplificación de pequeños fragmentos solapantes altamente informativos.

Otra modificación molecular puede ser la existencia de puentes cruzados entre las cadenas del DNA (puentes intramoleculares) o bien entre el DNA y las proteínas del medio (puentes intermoleculares). Este tipo de lesiones también actúan bloqueando a la taq polimerasa e impidiendo el copiado de los fragmentos de DNA por la PCR. Se ha demostrado que usando PTB (N- Fenilacil Tiazolio) se puede hacer efectivamente el estudio de aquellas moléculas afectadas (Vasan et al, 1996). Otras lesiones son las que ocurren debido a la incorporación de bases incorrectas (misCoding lesions) provocadas por algunas reacciones de hidrólisis como la desaminación. Este daño molecular da lugar a que se puedan hacer interpretaciones incorrectas de los resultados (HOFREITER et al, 2001; GILBERT et al, 2003).

Por otra parte existen productos de la propia degradación del ADN, ya sea por rupturas de sus enlaces o bien por modificaciones químicas como la reducción de los azúcares, que son capaces de inhibir su propia amplificación (Rogan y Salvo, 1990). A pesar de que se desconoce la naturaleza y los mecanismos de acción de estos inhibidores se han descrito varios procedimientos para eliminar o atenuar el efecto inhibidor. Si durante el procedimiento de extracción se realizan lavados cortos y sucesivos de polvo de hueso y/o diente con EDTA 0.5M, utilizado para su descalcificación, se consigue eliminar, al menos parcialmente el color marrón que presentan estos inhibidores y el brillo azul de los extractos de electroforesis en gel de agarosa al que dan lugar (Hagelberg y Clegg, 1991; Kolman y Tuross, 2000). Otra estrategia consiste en la purificación de los extractos, una vez concluida la extracción, mediante electroforesis en gel de azarosa, columnas Sephadex G-200, o Kits comerciales de purificación. Según Millar et al, 1999 estos tratamientos son los más efectivos. Existen otros pero su uso no es recomendable ya que sus efectos de eliminación y de atenuación de inhibidores es bastante menos efectivo.

Para tratar de contrarrestar el efecto inhibidor durante la PCR se han empleado otras estrategias. Un método comúnmente empleado a principios de los 90, consiste en la adición de albúmina sérica bovina (BSA) a la mezcla de reacción (Pääbo et al, 1988; Hagelberg et al, 1989), además existen otras de uso menos recomendable aunque todas ellas tienen un inconveniente y es el aumento en la probabilidad de contaminación por la manipulación del investigador. Sin embargo, existen otras, como el almacenamiento de los extractos en frío durante varios días previamente a su amplificación, que producen mejoras sustanciales en la amplificación y no presentan este inconveniente. Este procedimiento produce la formación de un precipitado blanquecino que queda adherido a la pared del tubo y cuya eliminación por precipitación consigue revertir la capacidad de amplificación (Higuchi 1992; Montiel et al 1997, 2001).

Los riesgos de contaminación del ADN exógeno se pueden resumir en los siguientes puntos:

- Durante la deposición del resto, por traspaso de DNA entre organismos próximos.
- Durante la excavación por el personal arqueológico
- Durante el depósito en un museo por el personal encargado de la conservación
- Durante el análisis genético en el laboratorio por el personal investigador o por material genético extraído y/o amplificado con anterioridad en el mismo lugar.
- En el caso de enterramientos colectivos pueden producirse también, al menos teóricamente, un traspaso de ADN de unos especímenes a otros si existe mucha proximidad entre ellos.

La contaminación de ADN de organismos de una especie diferente a la que se pretende estudiar no tiene por qué representar un gran problema si la región a caracterizar está lo suficientemente diferenciada a nivel de especie. Se consigue mediante el diseño de cebadores específicos y unas condiciones restrictivas de la PCR. La contaminación con ADN de la misma especie durante este periodo puede resultar o no problemática dependiendo del objetivo

final del estudio. Si se pretende establecer relaciones de parentesco entre individuos de un mismo enterramiento esta posibilidad se debe tener en cuenta.

Para intentar controlar la contaminación por parte de arqueólogos, conservadores de museos, investigadores, etc. se puede tener en cuenta lo siguiente:

- Uso de ropa protectora: bata de laboratorio, guantes de látex o similar, mascarilla y redcilla para el cabello.
- Eliminación de la capa superficial de la muestra antes de proceder a la extracción de su material genético
- Realización de las extracciones y amplificaciones en el interior de una campana de flujo laminar.
- Separación física de las áreas en las que se llevan a cabo los procedimientos de pre y post- PCR.
- Limpieza e irradiación con ultravioleta de las superficies de trabajo, antes y después de cada experimento.
- Empleo del material desechable de un solo uso.

Son numerosos los estudios que demuestran que a pesar de emplear todas las precauciones y recomendaciones siguen quedando cantidades traza de ADN contaminante.(Serre et al 2004, Lalueza-Fox et al 2005). La detección de la contaminación resulta, por tanto, vital, para descartar falsos positivos. Algunos de los procedimientos para detectar contaminación pueden ser:

1. El uso de controles negativos que contienen todos los reactivos excepto la muestra, y que se procesan en paralelo a las muestras.
2. La caracterización genética, para el marcador y fragmento que se desea estudiar, de todo el personal que haya tenido contacto con la muestra en algún momento
3. La realización de extracciones múltiples a partir de un mismo extracto, de diferentes extractos de una misma muestra, y/o de extractos de diferentes partes del organismo
4. La replicación del experimento en un laboratorio independiente por personal diferente.

Desde el inicio de los estudios con DNA antiguo se han sugerido un conjunto de criterios y medidas metodológicas para probar la autenticidad de la información genética recuperada a partir de ADN antiguo (Austin et al 1997) y son:

- Infraestructura
- Metodología
- Interpretación de los resultados
- Reproducibilidad
- Pruebas adicionales

INFRAESTRUCTURA

El laboratorio tiene que ser exclusivo de ADN antiguo. En los laboratorios en los que se realizan tareas de extracción y amplificación de ADN antiguo deben de estar separados de los laboratorios en los que se lleva a cabo cualquier otro tipo de estudio de ADN (O'Rourke et al 2000).

Tiene que existir una separación física de los procesos pre-PCR de la amplificación y los procesos post-PCR (Beraud- Colomb et al 1997).

Equipamiento de un laboratorio de ADN antiguo. Resulta recomendable que las áreas dedicadas a la extracción y amplificación de ADN antiguo estén dotadas de un fluorescente de luz UV, accionable desde el exterior, para esterilizar la zona antes y después de cada experimento.

METODOLOGÍA

- Empleo de instrumental y equipamiento exclusivo para el análisis de ADN antiguo
- Eliminación de la capa superficial del hueso/diente previamente a la extracción del material genético.
- Alicuotado de los reactivos de PCR y realización de reacciones de amplificación periódicas sobre estas alícuotas.
- Análisis de cada espécimen por un único investigador. En el caso de las determinaciones de sexo resulta recomendable la replicación de todo el proceso por un investigador de cada sexo.

- Procesado de controles o blancos, a los que se añaden todos los reactivos excepto el tejido antiguo, y que son procesados de forma paralela a las muestras objeto de estudio durante las fases de extracción del material genético y durante la reacción de amplificación.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

- Correlación inversa entre el tamaño del amplicón y la intensidad del producto de amplificación visualizado en un gel de agarosa o la eficiencia de amplificación. Esta medida permite evaluar el grado de degradación del material genético y la presencia de lesiones que bloquean la taq polimerasa

REPRODUCIBILIDAD

- Replicación del experimento dentro del mismo laboratorio y realización, de al menos, dos extracciones independientes del mismo espécimen, idealmente a partir de distintos elementos esqueléticos y/o dentales, y varias amplificaciones a partir del mismo o de diferentes extractos.
- Replicación en laboratorios independientes, con ello se pretende eliminar la posible contaminación procedente del propio laboratorio no detectada en los blancos.

PRUEBAS ADICIONALES

- Ensayos bioquímicos de preservación de otras macromoléculas de la misma muestra. Su objeto es establecer si el estado de preservación general del fósil es lo suficientemente bueno como para permitir la preservación de su material genético.
- Análisis de restos asociados de fauna
- Clonación bacteriana de los productos de amplificación y secuenciación de múltiples clones. Esta técnica permite detectar cualquier heterogeneidad presente en los productos de amplificación e identificar la fuente de la misma: contaminación, daño molecular y/o errores de la polimerasa.

CONCLUSIONES

Es conveniente para la extracción de ADN a partir de huesos humanos tanto para la investigación científico evolutiva como forense:

- Minimizar la manipulación de las muestras. En caso de especímenes arqueológicos o forenses que hallan sido extensivamente manipulados antes de ingresar al laboratorio se recomienda, en la medida de lo posible, no utilizar las partes superficiales de la muestra para el análisis de ADN, ya que pueden estar contaminadas con restos recientes de células de los manipuladores.
- Durante toda la manipulación de los especímenes, se deben utilizar guantes plásticos, utensilios quirúrgicos estériles para tomar las muestras, las cuales deben ser puestas en tubos plásticos estériles que pueden ser usados para la posterior extracción de ADN
- Debe existir una separación física de los laboratorios en un área para extracción de ADN y otra área donde se manipulará sólamente ADN amplificado por PCR.
- se debe tener un equipo de laboratorio (pipeteadores, mesas, etc) dedicado exclusivamente al manejo de ADN sin amplificar y otro para el material amplificado
- Es necesaria la inclusión de controles negativos en todas las fases. Los cuales deben ser hechos en la misma área, con los mismos reactivos y al mismo tiempo en que se efectúan los diferentes pasos de extracción y amplificación del ADN.
- Por lo menos dos muestras deben ser tomadas a partir del mismo espécimen, y deben ser extraídas así como amplificadas en ocasiones diferentes para demostrar la reproducibilidad de los resultados.
- Los resultados deben ser interpretados con base en el análisis de filogéncias o de estudios de genética de poblaciones.

BIBLIOGRAFÍA

- ANDERSON, S.; BANKIER, A.T.; BARRELL, B. G., BRUUN M. H. L., et al (1981): "Sequenze and organization of the human mitochondrial genome". *Nature*. 290: 457- 464.
- ANDREWS R. M.; KUBACKA I.; CHINNERY, P.F.; LIGHTOWNLERS R. N.; TURNBULL, D. M. y HOWELL, N. (1999): "Reanalysis and revision of the Cambridge referente sequenze for human mitochondrial DNA". *Nat Genet* 23(2): 147.
- ARROLLO-PARDO, E.; OCANA, M. A.; ARROYO, J. J.; PÉREZ-PÉREZ, A.; TURBON, D.; TRANCHO, G.; RODRÍGUEZ- ALBARRAN, M. S., CASAS, J. D. y BANDRES, F. (2002): "HPLC and UV spectrophotometry searching of ancient DNA and PCR inhibitors in old human remains". *Ancient biomolecules*. 4(1): 33-41.
- AYALA, F. J. (1995): "The myth of Eve: molecular biology and human origins". *Science*. 270: 1930-1936.
- BAASNER, A.; SCHAFER, C.; JUNGE, A.; MADEA, B. (1998): "Polymorfics site in human mitochondrial DNA control region sequences: population data and maternal inheritance". *Forensic Sci Int*. 98(3): 169-78.
- BALLARD J. W.; DEAM, M. D. (2001): "The mitochondrial genome: mutation, selection and recombination". *Curr opin Genet Dev*. 11(6): 667-72.
- BANDELT, H. J.; QUINTANA-MURCI, L.; SALAS, A. y MACAULAY, V. (2002): "The finger print of phantom mutation in mitochondrial DNA data". *Am. J. Hum. Genet*.71(5): 1150-1160.
- CANN, R. L.; STONEKING, M.; Wilson A. C. (1987): "Mitochondrial DNA and human evolution". *Nature*. 325 (6099): 31-36.
- FERNÁNDEZ, E. (2000): *Polimorfismo de DNA mitochondrial en poblaciones antiguas de la cuenca del Mediterráneo*. Universidad de Barcelona (inédita).
- GILBERT, M.T.; WILLERSLEV, E. y HANSEN. A. J. (2003a): "Distribution patterns of post-mortem damage in human mitochondrial DNA". *Am J. Hum Genet*.72(1):32-47.
- HAGELBERG E., SYKES, B.; HEDGES, R. (1989): "Ancient bone DNA amplified". *Nature* 342(6249):485.

- HOPKIN, K. (1999): "Death to sperm mitochondrial". *Scientific American* 280(3): 21.
- KELLER, G. H.; MANAK, M.M. (1989): "DNA probes". *Stockton Press*. New York.
- NEI, M. (1972): "Genetic distance between populations". *Amer. Naturalist* 106:283-92.
- NEI, M. (1987): *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press. New York.
- TUROSS, N. (1994): The biochemistry of ancient DNA in bone. *Experientia*.50: 530-535.

AGRADECIMIENTO

A la doctora EVA FERNÁNDEZ por sus consejos y por la ayuda bibliográfica prestada.

BLANCA