

## Los criterios de autenticidad de ADN antiguo y su uso en estudios poblacionales humanos\*

MONTIEL, RAFAEL

*Departamento de Biología, Universidad de las Azores, Portugal.*

e-mail: montiel@notes.uac.pt

GARCÍA SÍVOLI, CARLOS

*Cátedra de Anatomía Dentaria, Facultad de Odontología.*

*Universidad de Los Andes, Venezuela*

e-mail: carlos.garcia@uab.cat

### RESUMEN

La contaminación, el daño molecular post-mortem y otros artefactos dificultan las investigaciones sobre ADN antiguo. Estos problemas han conducido al desarrollo de un conjunto de pautas para la autenticación del ADN antiguo (ADNa), incluyendo el uso de laboratorios exclusivos, testes de preservación bioquímica, controles negativos múltiples, cuantificación del ADN extraído, clonación y secuenciación de los productos de la PCR, evaluación del tamaño de los «amplicones» obtenidos y la reproducibilidad de los resultados. La mejor manera de prevenir o minimizar la contaminación es estableciendo medidas precautorias tan pronto como sea posible, idealmente, comenzando con la colecta y preparación de las muestras por parte de los arqueólogos, aunque esto no siempre es posible. Por lo tanto, antes de empezar un estudio de ADNa, se debe implementar un cuidadoso diseño experimental, hacer un análisis prospectivo de algunas muestras para determinar su utilidad y debe ser considerado un análisis costo-beneficio.

**Palabras clave:** ADN antiguo, autenticación, ADN mitocondrial, poblaciones humanas.

### Criteria for the authenticity of DNA dating and its use in human population studies.

#### ABSTRACT

Contamination and post mortem damage to molecules, among other factors, complicate DNA dating. This has resulted in the development of criteria to establish the authenticity of DNA dating including the use of special labs, biochemical preservation, multiple controls, quantification of extracted DNA, cloning and sequencing, and the re-evaluation of computerized enlargements. The immediate control of specimens to prevent contamination during collection and preparation is indicated, although this is not always possible. However, before beginning DNA dating all processes should be carefully designed and specimen quality should be graded in terms of cost benefit.

**Key words:** DNA dating, authentication, mitochondrial DNA, human populations

---

\* Recibido: 19- 01-2007 / Aceptado: 16- 04- 2007.

## 1. Introducción

El ADN antiguo (ADNa) es el ADN recuperado de restos biológicos preservados natural o artificialmente. Dos artículos publicados en la revista “Nature” a mediados de los ochenta, marcan el punto de inicio de este campo de investigación (Higuchi *et al.* 1984; Pääbo, 1985). En pocos años se dio un incremento exponencial del tipo de tejidos analizados y su antigüedad (Pääbo, 1993). Los artículos más espectaculares presentaron secuencias recuperadas de muestras de millones de años de antigüedad, incluyendo insectos preservados en ámbar (DeSalle *et al.* 1992; Cano *et al.* 1993) y huesos de dinosaurio (Woodward *et al.* 1994). Poco después, no obstante, fue demostrado que las secuencias recuperadas representaban, con mayor probabilidad, productos de la contaminación con ADN moderno (Walden y Robertson, 1997; Gutiérrez y Marín, 1998, sobre los estudios en ámbar; y Allard *et al.* 1995; Hedges y Schweitzer, 1995; Henikoff, 1995; Zischler *et al.* 1995, sobre los huesos de dinosaurio). Este asunto, ya considerado un fiasco (Lindahl, 1997), levantó dudas serias sobre todo el campo del ADNa. Las críticas se apoyaban en los trabajos de Lindahl (Lindahl y Andersson, 1972; Lindahl y Nyberg, 1972), que estudiando la estabilidad del ADN en soluciones acuosas concluyó que no era posible que fragmentos informativos de ADN persistieran por más de 100,000 años, bajo ninguna circunstancia (Lindahl, 1993a; 1993b). Aunque la estabilidad en el tiempo del ADN es un tema polémico, ahora parece claro que si las condiciones son óptimas, el ADN puede persistir por 500,000 o incluso un millón de años (Poinar *et al.* 1996; Hofreiter *et al.* 2001; Poinar *et al.* 2006). Sin embargo, más que nunca quedó claro el riesgo de amplificar ADN exógeno (contaminante) en los estudios de ADN antiguo. La severidad de este problema puede entenderse considerando que el ADNa está extremadamente dañado, por lo que la más mínima cantidad de ADN reciente contaminante puede sobreponerse al antiguo en los análisis subsecuentes, como la clonación

molecular o la amplificación por PCR\*. El problema se exagera en estudios de humanos antiguos, ya que los investigadores pertenecen a la misma especie que el objeto de estudio y las fuentes potenciales de contaminación aumentan de paso a paso del análisis. Así, a pesar del reconocido potencial de los estudios de ADN en la Antropología, el siempre presente problema de la contaminación ha dificultado la aplicación de esta técnica en el estudio de poblaciones humanas antiguas. La recomendación de dos de los grupos líderes en este campo es la de no trabajar con muestras humanas antiguas (Pääbo *et al.* 2004; Willerslev y Cooper, 2005). Por otra parte, los estudios sobre poblaciones humanas antiguas continúan siendo publicados año tras año (p.ej. Sampietro *et al.* 2005; Alzualde *et al.* 2006; Mooder *et al.* 2006; Töpf *et al.* 2006), quedando abierta la cuestión sobre la adecuación de los criterios estándar de autenticidad (Cooper y Poinar, 2000) al estudio de poblaciones humanas.

## **2. Ubicuidad de la contaminación con ADN humano**

La severidad de la contaminación con ADN humano fue comprendida inicialmente por los investigadores que amplificaron secuencias de ADN mitocondrial (ADNmt) específicas humanas a partir de extractos de huesos de animales (Handt *et al.* 1994; Richards y Sykes, 1995). Trabajos recientes han reforzado la percepción sobre la agudeza de este problema detectando contaminación humana en muestras paleontológicas dentales de animales (Hofreiter *et al.* 2001) y mostrando la extensa contaminación humana que pueden presentar muestras de animales conservados en muesos (Malmström *et al.* 2005). El razonamiento es que si el ADN contaminante humano está presente en muestras de animales, muy probablemente también lo estará en muestras humanas antiguas, pero en este caso, la detección de las secuencias contaminantes será extremadamente problemática, sino imposible (Gilbert *et al.* 2005b). El problema se torna más serio si los inves-

tigadores y los sujetos de estudio comparten el mismo contexto filogeográfico (es decir, si pertenecen a la misma población o incluso continente), ya que en este caso ambos presentarán marcadores genéticos similares o idénticos. Esto demuestra que los estudios de ADN humano antiguo requieren condiciones de análisis especiales y criterios de autenticidad específicos.

### **3. El problema de la autenticidad**

La autenticidad de un resultado es la prueba de que las secuencias de ADN recuperadas de muestras antiguas provienen de hecho del espécimen analizado y no de cualquier otra fuente o artefacto. Así, el problema de la autenticidad está relacionado en su mayor parte con la contaminación, pero también con el daño post-mortem que puede producir una secuencia diferente de la secuencia que en realidad presentaba el espécimen en vida (Gilbert *et al.* 2003; Gilbert *et al.* 2006). Dada la dificultad de establecer una prueba directa de autenticidad, la autenticación de un resultado comprende un proceso que comienza con las medidas tomadas durante el análisis para evitar la introducción de ADN contaminante. No obstante, resulta más importante detectar la contaminación que a pesar de todo haya podido ser introducida durante el análisis o, quizá más problemática, la que haya podido ser introducida antes de que las muestras llegasen al laboratorio. Para detectar la contaminación se realiza una serie de controles experimentales y se replican los resultados analizando dos o más muestras del mismo individuo. Sin embargo, en algunos casos las secuencias contaminantes pueden no ser detectadas con estos controles (Cooper, 1992; 1997) y entonces deben ser satisfechos algunos criterios de autenticidad para incrementar la fiabilidad de los resultados obtenidos. Por otro lado, de acuerdo con algunos investigadores, estos criterios deben ser aplicados de forma flexible e inteligente, siendo más relevante una aproximación más autocrítica que simplemente ir verificando criterios en una lista de comprobación (Gilbert *et al.* 2005a).

#### **4. Los criterios de autenticidad**

Tan pronto como el problema de la contaminación fue percibido, fue reconocida también la necesidad de establecer criterios de autenticidad. Pääbo y col. (1988) propusieron que la imposibilidad o dificultad en amplificar fragmentos relativamente grandes en extractos de ADN, podría ser un criterio adicional de autenticidad. Este criterio inicial fue después desarrollado para convertirse en el criterio de la “conducta molecular apropiada” (ver más abajo). Pero fue en respuesta a las críticas de Lindahl (Lindahl, 1993b) que los criterios de autenticidad llegaron a concretarse en propuestas formales. Handt y col. (1994) publicaron el primer conjunto integrado de criterios, pero fueron Cooper y Poinar (2000) quienes publicaron la lista de criterios más completa y rigurosa, proponiendo además que los estudios de ADN deberían satisfacerla para ser publicados o financiados. Una tercera generación de criterios fue publicada recientemente, relajando en cierta medida la rigurosidad de los criterios de acuerdo a la naturaleza y características de las muestras (Pääbo *et al.* 2004). A continuación se hace una revisión de los principales criterios con algunos comentarios sobre su aplicación en estudios poblacionales humanos.

#### **5. Áreas de trabajo separadas físicamente**

Si el análisis se realiza en un laboratorio en el que se han separado las áreas de trabajo de acuerdo a las distintas fases del análisis, el resultado tendrá más probabilidades de ser auténtico. La extracción de ADN, la preparación de la PCR y los procedimientos post-PCR deben realizarse en áreas separadas. La separación logística es imprescindible, proveyendo a cada área de todo el material y equipo necesarios para evitar la transferencia de posibles contaminantes entre las áreas. La separación temporal, consistente en realizar cada uno de los procedimientos en días distintos, puede incrementar la eficacia de la separación física (Montiel *et al.* 2001).

## 6. Controles negativos

Tanto para la extracción como para la amplificación del ADN deben ser realizados controles negativos o “blancos”, en los que se añaden todos los reactivos excluyendo las muestras y de los que se espera un resultado negativo, a no ser que exista contaminación en el material y/o reactivos, o bien, que ésta haya sido introducida durante el proceso experimental. El uso de controles se hace más eficiente cuanto menor sea la razón muestras/controles. Sin embargo, debe tenerse presente que la obtención de controles limpios no necesariamente implica la ausencia de contaminación, debido a fenómenos como el efecto “carrier” (Cooper, 1992), y a su vez, que la presencia de contaminación en los controles tampoco implicará en todos los casos que las muestras estén contaminadas (p.ej. Ivanov *et al.* 1996). Esto puede deberse al fenómeno de las contaminaciones puntuales (Montiel, 2001), que puede contaminar muestras de forma independiente, incluyendo desde luego, los blancos. Por lo tanto, los controles negativos son útiles sólo en un contexto integrado de autenticación (Montiel *et al.* 2001; Montiel, 2001).

## 7. Conducta molecular apropiada

Dado que el ADN<sub>a</sub> se presenta muy fragmentado, se espera obtener más producto de la PCR a partir de fragmentos menores, que de fragmentos mayores (Pääbo *et al.* 1988). Además, se espera obtener más ADN<sub>mt</sub> que ADN nuclear, ya que existen mucho más copias de ADN mitocondrial que nuclear, lo que incrementa la probabilidad de preservación del primero. No obstante, algunos investigadores han mostrado que la interacción de moléculas de ADN es mucho más compleja. En algunos casos resultó más fácil la amplificación de fragmentos mayores de ADN<sub>a</sub> que de fragmentos de ADN contaminante (Kolman y Tuross, 2000), lo que resta universalidad a este criterio.

## 8. Reproducibilidad

Por lo menos dos extractos de cada espécimen deben ser analizados y los resultados deben ser concordantes. La obtención de resultados contradictorios puede indicar que ha ocurrido contaminación, pero por otra parte, los resultados concordantes no garantizan la autenticidad, ya que si la muestra ha sufrido una contaminación extensiva, los diversos extractos podrían contener la misma secuencia exógena (Cooper, 1997). Esto resulta especialmente cierto en las muestras que no contienen ADN endógeno o que lo presentan altamente degradado.

## 9. Clonación

Los productos de la PCR (los amplicones), deben ser clonados y diversos clones deben ser secuenciados para evaluar la homogeneidad del ADN amplificado. Este procedimiento puede revelar las distintas secuencias que hayan podido ser amplificadas en distintas proporciones. Idealmente, fragmentos solapantes deberían ser amplificados y clonados. En general, actualmente esta es una de las pruebas de autenticidad más exigida; sin embargo, es la que puede hacer impracticables los estudios de nivel poblacional, especialmente si los beneficios no justifican los costos. De acuerdo con Bower *et al.* (2005), es necesario secuenciar al menos 20 clones para tener un nivel de confianza >95% de haber identificado la secuencia más abundante presente al 70% en una muestra antigua. Así que, por ejemplo, si debemos analizar dos extractos por individuo y amplificar al menos dos fragmentos solapantes de cada uno, deberíamos secuenciar por lo menos 80 clones por individuo. En un estudio de nivel poblacional antiguo en el que se analicen un mínimo de 25 individuos, deberíamos entonces secuenciar por lo menos 2000 clones. Por otra parte, si la cantidad inicial de ADN molde es abundante (>1000 copias; Pääbo *et al.* 2004), entonces los productos de la PCR serán más homogéneos y el procedimiento de la clonación no aportará información adicio-

nal. Por ejemplo, Ovchinnikov y col. (2000), analizando una muestra de Neandertal excepcionalmente conservada, obtuvieron el mismo resultado por secuenciación directa que mediante la secuenciación de múltiples clones. Por lo tanto, el criterio de la clonación puede relajarse si la cuantificación indica una buena preservación, pero será siempre necesaria para apoyar resultados excepcionales (aquellos que pueden contradecir o poner en duda teorías establecidas, o bien, zanjar temas polémicos).

## **10. Cuantificación**

Cuando existen pocas moléculas de ADN, el resultado de distintas amplificaciones de un mismo extracto puede ser discordante, ya que los primeros ciclos de la PCR son críticos y las distintas secuencias minoritarias (dañadas o contaminantes) podrían ser amplificadas diferencialmente en distintos experimentos de PCR. No obstante, cuando el número de moléculas iniciales es adecuado (>1000, Pääbo *et al.* 2004), las amplificaciones independientes darán muy probablemente el mismo resultado. Dado que la cuantificación implica la manipulación de las muestras incrementando el riesgo de contaminación, en algunos casos podría ser mejor analizar el resultado de los extractos independientes del mismo individuo y ver si existe o no existe discordancia antes de proceder a la cuantificación. Esta vía alternativa puede ahorrar muchas horas de trabajo y evitar riesgos de contaminación en estudios poblacionales, en los que se analizan muchas muestras y en los que el resultado del conjunto podrá ser más indicativo sobre la conservación de las muestras y la autenticidad del resultado, que el análisis exhaustivo muestra a muestra.

## **11. Replicación independiente**

La replicación intra-laboratorio debe extenderse a la replicación independiente llevada a cabo por un segundo (y a veces un tercer) laboratorio. Las muestras deben ser enviadas direc-

tamente desde el museo, o desde el organismo que realiza la colecta, para evitar la transferencia de contaminación. En estudios poblacionales, muchos investigadores replican sólo un subconjunto de las muestras (p.ej. Sampietro *et al.* 2005; Alzualde *et al.* 2006; Töpf *et al.* 2006).

## **12. Preservación bioquímica**

Las muestras deben presentar una buena preservación general y se aconseja testar la racemización de aminoácidos (Poinar *et al.* 1996). En este caso es importante considerar, al igual que con la cuantificación, que una mayor manipulación de las muestras implica un mayor riesgo de contaminación. Por otra parte, si la muestra está bien preservada contendrá un buen número de moléculas endógenas y consecuentemente, producirá un resultado homogéneo. Así que en algunos casos la manipulación adicional de las muestras no es justificable, a menos que el resultado sea de gran relevancia. Más aún, en estudios poblacionales, el porcentaje de muestras que contiene ADN amplificable, puede ser un mejor indicador de la preservación bioquímica para un yacimiento determinado.

## **13. Restos asociados**

Se aconseja analizar fauna del mismo yacimiento del que provengan las muestras (u otros restos asociados) para evaluar el grado de contaminación con ADN humano y las condiciones de preservación. Sin embargo, este criterio debe ser aplicado con cautela, pues incluso un espécimen muy bien preservado puede estar contaminado. En contrapunto, las condiciones de preservación pueden variar entre las muestras de un mismo yacimiento, por lo que el fracaso en la recuperación de ADN de restos asociados no descarta la posibilidad de preservación en otras muestras.

## **14. El criterio del investigador en el uso de los criterios de autenticidad**

En general, cuanto mayor sea la importancia de la muestra analizada o la relevancia de los resultados, mayor debe ser la rigurosidad de los criterios aplicados para su autenticación. Las muestras con una buena preservación requieren menos exigencia, especialmente en lo concerniente a la clonación y a la reproducibilidad independiente. En estos casos, el análisis de un subconjunto puede indicar que en general el trabajo ha sido llevado a cabo de forma correcta. Por otra parte, los estudios con poblaciones humanas requieren criterios adicionales, idealmente que no representen un incremento exponencial en los costos. Uno de estos criterios específicos puede ser la búsqueda de secuencias quiméricas (también conocidas como secuencias mosaico), que son formadas por la recombinación *in vitro* de moléculas diferentes de ADN a través del fenómeno de la PCR saltarina (Pääbo *et al.* 1990). Las secuencias mosaico pueden ser detectadas mediante un análisis de redes medias (Bandelt, 2005). Una mezcla de moléculas distintas puede también ser detectada analizando marcadores genéticos ligados. Esto se puede conseguir, al nivel del genoma mitocondrial completo, aprovechando la relación entre los marcadores que definen los haplogrupos mitocondriales (p.ej. Montiel *et al.* 2001).

## **15. Trabajo futuro**

Los criterios de autenticidad en los estudios de ADN deben basarse en estudios sistemáticos que evalúen los riesgos de contaminación en los distintos pasos del análisis. En este sentido, existen algunas cuestiones abiertas que deben ser abordadas: i) La probabilidad de transferencia de amplicones. Muchos investigadores reconocen que existe una alta probabilidad de transferencia de amplicones entre muestras y en consecuencia la distribución de las áreas de laboratorio se diseña para evitarla. Una forma de controlar y cuantificar esta probabilidad está dada por el uso de un

control interno modificado (para facilitar su identificación) para seguir y determinar las tasas de contaminación. Este control podría ser amplificado siempre que se amplifiquen muestras antiguas para después analizar rutinariamente las amplificaciones futuras de ADN y verificar la presencia o ausencia del control modificado; ii) La cuantificación de la cantidad de moléculas contaminantes que puede ser introducida por manipulación de la muestra, aprovechando la caracterización de las secuencias de los arqueólogos para obtener estimaciones reales. Hasta la fecha, sólo se ha realizado un estudio sistemático para analizar esta cuestión. En este estudio se determinó que un 17.3% de todos los clones secuenciados, presentaban secuencias contaminantes, siendo aquellas derivadas del personal involucrado en la recuperación y limpieza de los restos (arqueólogos) las que se presentan en mayor frecuencia en comparación con las derivadas de los antropólogos y los genetistas (Sampietro *et al.* 2006); iii) Determinación del subconjunto mínimo de muestras que debe ser replicado (en un segundo laboratorio) o analizado con mayor profundidad (p.ej. mediante clonación) para dar validez al análisis en su totalidad; iv) La mejora de los protocolos para eliminar la contaminación (p.ej. Kemp y Smith, 2005) y la búsqueda de nuevas polimerasas menos sensibles al daño molecular (p.ej. la familia de polimerasas Y; McDonald *et al.* 2006); y v) El entrenamiento de los arqueólogos de campo para un mejor muestreo y para un manejo adecuado de las muestras destinadas al análisis de ADN.

## 16. Notas

\* Mediante la PCR (Polymerase Chain Reaction) se produce un número exponencial de copias de un fragmento específico de ADN. A este proceso de copiado exponencial se le conoce como amplificación y a las copias producidas (los productos de la PCR), se les denomina amplicones.

## 17. Bibliografía

- ALLARD, M.W. et al. 1995. "Detecting dinosaur DNA". En: *Science*, N° 268. pp.11-92.
- ALZUALDE A, et al. 2006. "Insights into the "isolation" of the Basques: mtDNA lineages from the historical site of Aldaieta (6th-7th centuries AD)". En: *Am J Phys Anthropol*, N° 130. pp. 394-404.
- BANDELT, H.J. 2005. "Mosaics of ancient mitochondrial DNA: positive indicators of nonauthenticity". En: *Eur J Hum Genet*, N° 13 . pp. 1106-1112.
- BOWER, M. A., et al. 2005. "How many clones need to be sequenced from a single forensic or ancient DNA sample in order to determine a reliable consensus sequence". En: *Nucleic Acids Res*, N° 33. pp. 2549-2556.
- CANO, R.J., et.al. 1993. "Amplification and sequencing of DNA from a 120-135 million-year-old weevil". En: *Nature*, N° 363. pp. 536-538.
- COOPER, A. 1992. "Removal of colourings, inhibitors of PCR, and the carrier effect of PCR contamination from ancient DNA samples". En: *Ancient DNA Newsletter*, N° 1, pp. 31-32.
- COOPER, A. 1997. "Reply to Stoneking: Ancient DNA - how do you really know when you have it?" En: *Am J Hum Genet*, N° 60. pp. 1001-1002.
- COOPER, A. y Poinar, H.N. 2000. "Ancient DNA: do it right or not at all" En: *Science*. N° 289 pp.1139.
- DESALLE, R., et al. 1992. "DNA Sequences from fossil termite in Oligo-Miocene amber and their phylogenetic implications". En: *Science*. N° 257. pp. 1933-1936.
- GILBERT, M.T. et al. 2003. "Distribution patterns of postmortem damage in human mitochondrial DNA". En: *Am J Hum Genet*. N° 72. pp. 32-47.
- GILBERT, M.T. et al. 2005a. "Assessing ancient DNA studies". En: *Trends Ecol Evol*, N° 20 pp. 541-544.
- GILBERT, M.T.P., et al. 2005b. "Biochemical and physical correlates of DNA contamination in archaeological human bones and teeth excavated at Matera, Italy". En: *J Archaeology Sci*. N° 32. pp.785-793.

- GILBERT, M.T. et al. 2006. "Recharacterization of ancient DNA miscoding lesions: insights in the era of sequencing-by-synthesis". En: *Nucleic Acids Research*. doi:10.1093/nar/gkl483.
- GUTIÉRREZ, G. y Marín, A. 1998. "The most ancient DNA recovered from an amber-preserved specimen may not be as ancient as it seems". En: *Mol Biol Evol*, N° 15. pp 926-929.
- HANDT, O. et al. 1994. "Ancient DNA: methodological challenges". En: *Experientia*, N° 50. pp. 524-529.
- HEDGES, S.B. y Schweitzer, M.H. 1995. "Detecting dinosaur DNA". En: *Science*, N° 268. pp 1191.
- Henikoff, S. 1995. "Detecting dinosaur DNA". En: *Science*. N° 268 pp. 1192.
- HIGUCHI, R. et al. 1984. "DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family". En: *Nature*, N° 312. pp. 282-284.
- HOFREITER, M. et al. 2001. "Ancient DNA". En: *Nat Rev Genet*, N° 2. pp.353-359.
- IVANOV, P.L. et. al. 1996. "Mitochondrial DNA sequence heteroplasmy in the Grand Duke of Russia Georgij Romanov establishes the authenticity of the remains of Tsar Nicholas II". En: *Nat Genet*, N° 12. pp 417-420.
- KEMP, B.M., Smith, D.G. 2005. "Use of bleach to eliminate contaminating DNA from the surface of bones and teeth". En: *Forensic Sci Int*, N° 154. pp 53-61.
- KOLMAN, C.J. y Turros, N. 2000. "Ancient DNA analysis of human populations". En: *Am J Phys Anthropol*, N° 111. pp. 5-23.
- LINDAHL, T. 1993a. "Instability and decay of the primary structure of DNA". En: *Nature*, N° 362. pp. 709-715.
- LINDAHL, T. 1993b. "Recovery of antediluvian DNA". En: *Nature*, N° 365. pp. 700.
- LINDAHL, T. 1997. "Facts and artifacts of ancient DNA". EN: *Cell*, N° 90. pp. 1-3.
- LINDAHL, T. y Andersson, A. 1972. "Rate of chain breakage at apurinic sites in double-stranded deoxyribonucleic acid". En: *Biochemistry*, N° 11. pp.3618-3623.
- LINDAHL, T., Nyberg, B. 1972. "Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid". En: *Biochemistry*, N° 11. pp. 3610-3618.

- MCDONALD, J.P. et. al. 2006 “Novel thermostable Y-family polymerases: applications for the PCR amplification of damaged or ancient DNAs.” En: *Nucleic Acids Res*, N° 34. pp. 1102-1111
- MALMSTRÖM, H. et. al. 2005. “Extensive human DNA contamination in extracts from ancient dog bones and teeth”. En: *Mol Biol Evol.* N° 22. pp. 2040-2047.
- MONTIEL, R. 2001. “Estudio diacrónico de la variabilidad del DNA mitocondrial en población Catalana”. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona, España.
- MONTIEL, R. et.al. 2001. “Authenticating ancient human mitochondrial DNA”. En: *Hum Biol.* N° 73. pp. 689-713.
- MOODER, K.P. et. Al. 2006. “Population affinities of Neolithic Siberians: a snapshot from prehistoric Lake Baikal”. En: *Am J Phys Anthropol.* N° 129 pp. 349-361.
- OVCHINNIKOV, I.V., et al. 2000. “Molecular analysis of Neanderthal DNA from the northern Caucasus”. En: *Nature*, N° 404. pp. 490-493.
- POINAR, H.N. et.al. 1996. “Amino acid racemization and the preservation of ancient DNA”. En: *Science*, N° 272 pp. 864-866.
- POINAR, H.N. et.al. 2006. “Metagenomics to paleogenomics: large-scale sequencing of mammoth DNA”. En: *Science*, N° 311. pp. 392-394.
- PÄÄBO, S. 1985. “Molecular cloning of ancient Egyptian mummy DNA”. En: *Nature*, N° 314. pp. 644-645.
- PÄÄBO, S., et.al. 1988. “Mitochondrial DNA sequences from a 7000-year old brain”. En: *Nucleic Acids Res*, N° 16. pp. 9775-9787.
- PÄÄBO, S., et.al. 1990. “DNA damage promotes jumping between templates during enzymatic amplification”. En: *J. Biol. Chem.* N° 265. pp. 4718-4721.
- PÄÄBO, S. et.al. 2004. “Genetic analyses from ancient DNA”. En: *Annu Rev Genet*, N° 38. pp. 645-679.
- RICHARDS, M.B. y Sykes, B.C. 1995. “Authenticating DNA extracted from ancient skeletal remains”. En: *J Archaeol Sci*, N° 22. pp. 291-299.
- SAMPIETRO, M.L. et.al. 2005. “The genetics of the pre-Roman Iberian Peninsula: a mtDNA study of ancient Iberians”. En: *Ann Hum Genet*, N° 69. pp. 535-548.

- SAMPIETRO, M.L., et.al. 2006. “Tracking down human contamination in ancient human teeth”. En: *Mol Biol Evol*, N° 23. pp. 1801-1807.
- TÖPF, A.L. et.al. 2006. “Tracing the phylogeography of human populations in Britain based on 4th-11th century mtDNA genotypes”. En: *Mol Biol Evol*, N° 23. pp. 152-161.
- WALDEN, K.K.O. y Robertson, H.M. 1997. “Ancient DNA from amber fossil bees?” En: *Mol Bio. Evol*, N° 14. pp. 1075-1077.
- WILLERSLEV, E. y Cooper, A. 2005. “Ancient DNA”. En: *Proc Biol Sci*, N° 272. pp.3-16.
- WOODWARD, S.R. et.al. 1994. “DNA sequence from Cretaceous period bone fragments”. En: *Science*, N° 266. pp. 1229-1232.
- ZISCHLER, H. Et.al. 1995. “Detecting dinosaur DNA”. En: *Science*, N° 268. pp. 1192-1193.