

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER EN
GENÉTICA, FÍSICA Y QUÍMICA FORENSE

MÉTODOS DE ANÁLISIS PALEOGENÉTICO
EN CONTEXTOS ARQUEOLÓGICOS:
IMPORTANCIA DE LA TOMA DE MUESTRA Y
DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE DNA
ANTIGUO

– Aloña Aldasoro Zabala –

Directora(s):

Dra. Montserrat Hervella Afonso (UPV/EHU)

Dra. Esther Rodríguez Gallego (URV)

Tarragona, Septiembre de 2021

ABSTRACT

Ancient DNA (ancient Deoxyribonucleic Acid, aDNA) is the DNA present in the biological remains of already extinct or antique organisms, and is the main area of study in palaeogenetics. Its analysis, based on the remains from different archaeological contexts, has provided an opportunity to shed light on the evolutionary history of past populations. However, due to the poor preservation of aDNA in cases, palaeogenetic analysis requires great methodological precision, even demanding the establishment of a specific procedure for each type of sample. Although the current lack of information about the preservation of aDNA has been overcome thanks to the use of Next Generation Sequencing (NGS) techniques, these limitations still represent an obstacle in the evolution of sampling and extraction methods that allow an increased recovery of specific aDNA. Thus, it is crucial to establish a precise palaeogenetic experimental design in archaeological contexts, adapted to the conditions of each site and which includes appropriate criteria for the execution of a successful sampling and efficient extraction. Therefore, this review presents the different currently available aDNA sampling and extraction techniques depending on the type of sample, testing them in a case study and comparing them with the methods for degraded DNA analysis in forensic contexts. Despite of more research still needs to be done on sample preservation to overcome the existing limitations impeding the expansion of palaeogenetic applications, the experimental design proposed in this work, together with its sampling and extraction methods, can be satisfactory to extract the necessary amounts of aDNA for a big scale palaeogenetic study.

Keywords: aDNA, degraded DNA, sampling methods, aDNA extraction methods, processing of ancient skeletal samples.

RESUMEN

El DNA antiguo [*Ancient DNA (Deoxyribonucleic Acid)*, aDNA] es el DNA presente en los restos biológicos de organismos ya extintos o de cierta antigüedad, siendo el objeto de estudio de la paleogenética. Su análisis, a partir de los restos encontrados en los diferentes contextos arqueológicos, ha permitido esclarecer la historia evolutiva de las poblaciones pasadas. Sin embargo, debido a que la preservación del aDNA acostumbra a ser deficiente, el análisis paleogenético conlleva una gran precisión desde un punto de vista metodológico, requiriendo incluso establecer un procedimiento específico para cada tipo de muestra. Aunque actualmente las limitaciones que presenta el estudio de aDNA se han superado gracias al uso de Técnicas de Secuenciación Masiva (*Next generation Sequencing*, NGS), estas siguen suponiendo un obstáculo en la evolución de las metodologías de muestreo y extracción que permitan aumentar el rendimiento de recuperación del aDNA de interés. Así, es crucial el establecimiento de un buen diseño experimental paleogenético en contextos arqueológicos, que se adapte a las condiciones de cada uno de los yacimientos y que comprenda criterios para la ejecución de un muestreo adecuado y una extracción eficiente. Por todo ello, esta revisión expone las diferentes estrategias actuales de muestreo y extracción de aDNA en función del tipo de muestra, además de evaluarlas en un caso-estudio y compararlas con las metodologías de análisis de DNA degradado en contextos forenses. A pesar de que todavía quede por investigar acerca de la conservación de las muestras y así superar las limitaciones existentes que impiden una aplicación más amplia de la paleogenética, el diseño experimental planteado en este trabajo, junto con sus métodos de muestreo y extracción, puede resultar satisfactorio para extraer las cantidades necesarias de aDNA para un estudio paleogenético de gran calibre.

Palabras clave: aDNA, DNA degradado, métodos de muestreo, métodos de extracción de aDNA, procesamiento de muestras esqueléticas antiguas.

ABREVIATURAS

- aDNA: DNA antiguo [*Ancient DNA (Deoxyribonucleic Acid)*]
- ¹⁴C: Carbono 14
- CT: Tomografía Computarizada (*Computed Tomography*)
- Cytb: gen del *Citocromo b* (*Cytochrome b gen*)
- EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético (*Ethylenediaminetetraacetic acid*)
- EPI: Equipo de Protección Individual
- GuSNC: Tiocinato de guanidinio (*Guanidinium thiocyanate*)
- mtDNA: DNA mitocondrial [*Mitochondrial DNA (Deoxyribonucleic acid)*]
- NGS: Secuenciación Masiva o de Nueva Generación (*Next Generation Sequencing*)
- NRY: porción No-Recombinante del cromosoma Y (*Non-Recombinant Y*)
- pb: pares de bases (*base pair, bp*)
- PCR: Reacción en Cadena de Polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)
- RUV: Radiación Ultra Violeta
- SDS: Dodecilsulfato Sódico (*Sodium Dodecyl Sulfate*)
- SNP: Polimorfismos de Nucleótido Único (*Single Nucleotide Polimorphism*)
- STR: Microsatélites (*Short Tandem Repeats*)
- TFM: Trabajo de Fin de Máster
- UPV/EHU: Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea

ÍNDICE

<i>Abstract/Resumen</i>	
Abreviaturas	
1. Introducción.....	1
1.1. Características del DNA antiguo.....	1
1.2. Breve reseña de los estudios de aDNA.....	3
1.3. Análisis y aplicación de las técnicas de aDNA en contextos arqueológicos.....	4
2. Objetivos.....	5
3. Materiales y métodos.....	6
4. Resultados y discusión.....	7
4.1. Diseño metodológico para el análisis paleogenético en contextos arqueológicos.....	7
i. Toma de muestra.....	7
ii. Almacenamiento y/o procesamiento de las muestras.....	12
iii. Extracción de aDNA en función del tipo de muestra a analizar.....	14
a) Método del fenol cloroformo para muestras dentarias.....	15
b) Método de la <i>silica</i> de Rohland y Hofreiter para muestras esqueléticas.....	16
• Método del DNAzol para muestras óseas.....	18
c) Métodos de <i>PowerMax Soil</i> y <i>Soil gDNA Isolation</i> para muestras de sedimento.....	20
iv. Identificación de la especie.....	22
5. Aplicaciones en el ámbito forense.....	23
6. Conclusión.....	26
7. Bibliografía.....	28

ÍNDICE DE FIGURAS y TABLAS

- Figura 1. Diagrama resumen del diseño experimental planteado para el análisis paleogenómico en contextos arqueológicos..... 8
- Figura 2. Anatomía del hueso y del diente..... 9
- Figura 3. Método de procesamiento de diente (modificado de Hervella *et al.* 2015)..... 13
- Figura 4. Alineamiento múltiple de una región del gen del *citocromo b* 23
- Figura 5. Excavación arqueológica de la Ermita de Nuestra Señora de la Asunción de Ocio (Zambrana, Álava)..... 26
- Tabla 1. Principales características del DNA antiguo..... 1
- Tabla 2. Criterios para la ejecución de un buen muestreo..... 9

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Características del DNA antiguo

El DNA antiguo [*Ancient DNA (Deoxyribonucleic Acid, aDNA)*] es el DNA presente en los restos biológicos de organismos ya extintos o de cierta antigüedad, y la ciencia que se encarga de su análisis y recuperación es la paleogenética¹. La información obtenida a partir del aDNA permite abordar cuestiones científicas de diversa naturaleza; entre otras, identificación de individuos, reconstrucción de la filogenia de especies extintas, la reconstrucción de la historia evolutiva y demográfica de las poblaciones pasadas y estudios de domesticación de flora y fauna^{1,2}.

Las células, cuando están vivas, presentan sistemas de reparación del DNA que evitan o atenúan su daño. No obstante, cuando el organismo muere, la célula cesa dichos mecanismos, y los agentes físico-químicos degradan el DNA (principalmente por hidrólisis y oxidación) sin ningún impedimento^{1,3}. Como consecuencia de ello, el DNA recuperado de los tejidos antiguos se encuentra bastante dañado y degradado, siendo esta una de las principales características del aDNA (Tabla 1). Los factores ambientales también influyen en la preservación del DNA, lo cual es relevante para el estudio del aDNA. Las variables ambientales que aumentan la tasa de degradación del DNA son, principalmente, la elevada temperatura, el pH ácido, la acción del oxígeno, el elevado contenido de sales en el medio acuoso y la exposición al agua y a la radiación ultra violeta (RUV)^{4,5}.

Características del aDNA
Recuperación de escasa cantidad. El aDNA representa únicamente entre el 0,1-1% de lo que se esperaría encontrar en una muestra actual.
Altamente degradado y fragmentado. La fragmentación del DNA sucede a causa de su degradación, que principalmente se debe a los factores tafonómicos acontecidos en el lugar del enterramiento. Existe una relación exponencial inversa entre la longitud de las moléculas y la concentración de aDNA recuperado.
Elevado riesgo de contaminación por DNA exógeno de organismos presentes en el lugar del enterramiento y/o por los materiales y reactivos empleados durante el análisis molecular, siendo el personal que manipula las muestras antes, durante y después de la extracción de aDNA la principal fuente de contaminación.

Tabla 1. Principales características del DNA antiguo^{1,3,6}.

Las características inherentes al aDNA (Tabla 1), suponen una limitación a la hora de llevar a cabo su análisis, lo cual obliga a seguir unos criterios de autenticación para dar fiabilidad a los resultados obtenidos^{1,7}. Algunos de estos son: i) uso de controles negativos, tanto en la extracción como en la amplificación, con el fin de identificar posibles contaminaciones. Se trata de muestras que carecen de restos biológicos y son

sometidas al proceso de extracción y amplificación, al igual que las muestras problema; ii) cuantificación del número de moléculas de aDNA presentes en el extracto; iii) análisis por duplicado de dos extractos diferentes de la misma muestra problema; y iv) análisis del DNA del personal del laboratorio con el fin de identificar posibles contaminaciones⁷.

La fiabilidad del resultado obtenido depende de la comprobación de la ausencia de contaminación de la muestra, independientemente del tipo de muestra que se trate⁷. La contaminación más habitual se produce con DNA actual, tanto humano (procedente de los arqueólogos que manipulan la muestra en la excavación, el personal de los centros de custodia o los museos y los investigadores que manipulan la muestra para su análisis en el laboratorio) como microbiano, y puede enmascarar los resultados obtenidos ocasionando interpretaciones y conclusiones erróneas⁸. Por consiguiente, se han desarrollado protocolos de excavación especiales⁹ para minimizar estos riesgos, como por ejemplo el uso de vestimenta aislante adecuada (Equipo de Protección Individual, EPI), mascarillas, guantes, condiciones apropiadas de almacenamiento y tratamiento (temperatura y humedad constante), etc.

Durante la extracción y análisis del aDNA en el laboratorio, la muestra también puede contaminarse; por esta razón, los laboratorios de aDNA deben estar aislados de otros laboratorios de análisis de DNA actual o moderno y con espacios separados para la manipulación de muestras pre-PCR [Reacción en Cadena de la Polimerasa (*Polymerase Chain Reaction, PCR*)] y post-PCR¹. Asimismo, las instalaciones tienen que estar sometidas a estrictos protocolos de limpieza; entre otras, la desinfección de superficies con lejía al 3-10% y etanol al 70%, y la limpieza de aparatos, superficies y reactivos (mediante el *Cross-Linker*) con RUV¹. Además, es importante recalcar que la extracción de aDNA (y la consiguiente PCR) se realiza en cámaras que presenten una presión diferencial negativa, en las cuales los investigadores tienen que seguir un riguroso protocolo de vestimenta (EPI) y limpieza que evite la contaminación durante todo el tiempo de manipulación de la muestra.

Al igual que el DNA, el aDNA se puede utilizar a modo de huella genética para la identificación individual¹. La mayor parte del DNA en eucariotas se encuentra dentro del núcleo celular [DNA nuclear (*nuclear DNA, nDNA*)]. En el caso de mamíferos, se trata de una molécula lineal de doble cadena compuesta de unas 3.000 millones de pb, empaquetada formando los cromosomas^{1,7}, heredados de ambos progenitores. Por otro lado, en eucariotas, existe una pequeña porción de DNA que se encuentra dentro de unos orgánulos citoplasmáticos denominados mitocondrias [DNA mitocondrial

(*mitochondrial DNA*, mtDNA)]. El mtDNA es una molécula helicoidal de unas 16.569 pb que, a diferencia del nDNA, presenta una herencia exclusivamente materna^{1,10}.

El mtDNA es uno de los marcadores genéticos más utilizados en los estudios de aDNA¹, puesto que la célula presenta entre 2 y 10 moléculas de mtDNA por mitocondria frente a las dos copias de nDNA¹⁰, por lo que podemos encontrar un total de entre 1.000-10.000 copias de mtDNA por célula eucariota, facilitando así su supervivencia. Esto supone una gran ventaja cuando se trabaja con material genético antiguo y/o degradado^{1,10}, ya que hay una mayor probabilidad de éxito en la recuperación de aDNA.

Otras de las características que hacen que el mtDNA sea tan útil para los estudios de evolución son su elevada tasa de mutación y su herencia exclusivamente materna; esto garantiza que los cambios genéticos de una generación a otra sean debidos únicamente a mutaciones y no a recombinaciones, permitiendo, así, el análisis de la historia evolutiva reciente de las poblaciones¹. No obstante, en función del tipo de estudio que se quiera llevar a cabo, estas características pueden convertirse en limitaciones, puesto que se trata de un único *locus* que informa solamente de la historia evolutiva materna¹.

El cromosoma Y es otro marcador genético utilizado en los estudios de aDNA, principalmente la porción No-Recombinante (*Non-Recombinant Y*, NRY), dada su herencia exclusivamente paterna y su naturaleza no recombinante. No obstante, su estudio no es tan frecuente como el del mtDNA, puesto que existen únicamente dos copias de NRY por célula eucariota (diploide), convirtiendo este marcador en una herramienta más compleja de analizar en los estudios paleogenéticos; a esto hay que añadirle que la tasa de mutación de este marcador es 5-10 veces menor que en el caso del mtDNA^{1,10}.

1.2. Breve reseña de los estudios de aDNA

Nuestro conocimiento de la vida pasada se basa, principalmente, en los fósiles. El análisis filogenético de los restos fósiles se vio beneficiado por el desarrollo de las técnicas de análisis de DNA^{7,11}, dando lugar a un nuevo campo de investigación: la paleogenética¹.

El primer estudio que informó de secuencias de aDNA –pertenecientes al genoma mitocondrial de la piel de un Quagga de unos 140 años de antigüedad, por Higuchi *et al.*¹²–, se publicó en 1984, antes de la implantación de la técnica de la PCR¹³. Posteriormente, a finales de los 80, el descubrimiento de la PCR supuso un evento crucial e importante en el impulso de la investigación del aDNA, ya que permitió a los

investigadores la amplificación del DNA de muestras con cierta antigüedad (de hasta varias decenas de miles de años) y escasa cantidad de material genético, estando este DNA muy fragmentado^{13,14}. Este avance metodológico sirvió de base para el desarrollo de la tecnología actual del aDNA, convirtiéndose en una estrategia de investigación fiable que se utiliza en diferentes campos y para diferentes intereses científicos¹⁴.

Durante los últimos años, con las recientes mejoras de los diferentes métodos de extracción del aDNA, así como su análisis, se han conseguido superar algunas de las limitaciones de la paleogenética (asociadas a las características inherentes del aDNA, Tabla 1) que restringen la investigación del aDNA a meros fragmentos cortos de mtDNA. No obstante, la mayor innovación metodológica que ha revolucionado la investigación paleogenética ha sido la aparición de las técnicas de Secuenciación Masiva o de Nueva Generación (*Next Generation Sequencing*, NGS)¹³, dando lugar al desarrollo de la paleogenómica. Desde el desarrollo de la primera de estas tecnologías en 2005, y su implementación casi inmediata en la investigación del aDNA, su práctica ha alcanzado hasta ahora su punto álgido con la publicación de genomas nucleares de, entre otros, mamut (más de 1 millón de años de antigüedad)¹⁵, caballo del Pleistoceno Medio temprano (~560.000-780.000 años de antigüedad)¹⁶, humanos de la Sima de los Huesos de Atapuerca (~430.000 años de antigüedad)¹⁷, Neandertales europeos y asiáticos (~40.000-150.000 años)^{18,19}, oso de las cavernas (~360.000 años de antigüedad)²⁰ y genomas de Denisovanos²¹ y el primer híbrido Denisovano-Neandertal²².

1.3. Análisis y aplicación de las técnicas del aDNA en contextos arqueológicos

El éxito en la obtención de información genética a partir de muestras antiguas recuperadas en contextos arqueológicos está condicionado por los factores tafonómicos asociados al lugar, el tipo de material de estudio y la metodología de la excavación arqueológica⁷. Además, en cada contexto hay un número limitado de muestras a partir de las cuales se extrae el aDNA. Por ello, y en función del interés y de los objetivos del estudio, hay que establecer una metodología de trabajo que se adapte a cada una de las investigaciones.

El análisis del aDNA requiere una gran precisión y dedicación desde un punto de vista metodológico, puesto que la preservación del aDNA, aunque no sea del todo conocida⁵, acostumbra a ser deficiente e implica adaptar la metodología al tipo de muestra que se dispone¹. Pese a que los métodos de NGS han dado lugar no sólo a una transformación, sino también a una rápida expansión de la investigación del aDNA

frente a los métodos convencionales⁴ –aumentando la sensibilidad, la capacidad y el rendimiento con mayor longitud de lectura²³, que incluso permiten el análisis del genoma nuclear hasta ahora limitado a muestras excepcionalmente bien conservadas¹–, cada una de estas técnicas conlleva unas ventajas y limitaciones características que determinan su idoneidad para determinados escenarios²³. Igualmente, no hay que olvidar que se trata de técnicas caras y laboriosas, no siendo rutinarias. Por todo ello, este trabajo pretende resaltar la importancia de plantear un buen método experimental, destacando que debido a las condiciones del yacimiento arqueológico, del laboratorio y de las muestras que se disponen, no siempre existe la necesidad y/o capacidad de emplear NGS. Por consiguiente, se hace hincapié en que el desarrollo de un buen método de extracción, basado en la conservación del aDNA en las muestras, que presente una alta eficiencia en la recuperación del material genético degradado para su consiguiente análisis con técnicas convencionales (menos costosas), es suficiente para obtener toda la información necesaria para desarrollar un análisis de aDNA.

Asimismo, cabe destacar la existencia de importantes investigaciones sobre la optimización de los métodos de extracción de aDNA (sobre todo de muestras esqueléticas)^{6,11,29}. Sin embargo, se han realizado menos estudios acerca de la identificación de los mejores elementos de cada tipo de muestra a partir de los cuales obtener una mayor cantidad y calidad de aDNA⁴, lo cual podría resultar interesante para aumentar aún más el rendimiento de recuperación de aDNA. Además, hay que tener en cuenta que los análisis de DNA son intrínsecamente destructivos, siendo necesario identificar, a ser posible, las muestras más informativas de todo el conjunto de muestras que abarque el yacimiento arqueológico; y todo ello sin poner en riesgo el patrimonio histórico⁴.

2. OBJETIVOS

El **principal objetivo** de este Trabajo de Fin de Máster (TFM) se centra en discutir y revisar las diferentes estrategias de muestreo y métodos de extracción de aDNA, estableciendo las ventajas y las limitaciones que presentan cada uno de ellos. Así, se pretenden plantear las bases para el desarrollo de nuevas variantes de los métodos convencionales, que permitan recuperar aDNA con mayor eficiencia, garantizando la preservación estructural de las muestras.

Para ello, y con el fin de obtener la máxima información posible de las muestras que se encuentran con mayor frecuencia en contextos arqueológicos, se procederá a revisar la bibliografía de la metodología experimental que se sigue en un estudio

paleogenético, desde la toma de la muestra hasta la obtención de aDNA, siguiendo las siguientes fases:

- i. Selección de las muestras informativas sin dañar el patrimonio histórico.
- ii. Almacenamiento y/o procesamiento de las muestras.
- iii. Método de extracción de aDNA adecuado para cada tipo de muestra.
- iv. Identificación de la especie a nivel molecular.

El **segundo objetivo** pretende analizar la metodología derivada de la investigación paleogenética en contextos arqueológicos en otra área científica, como es la ciencia forense, por la confluencia de intereses, métodos y aplicaciones.

Finalmente, se expondrá un **caso práctico** que siga el procedimiento experimental planteado, confirmando la utilidad de la metodología propuesta.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Este proyecto se basa en una revisión bibliográfica de las investigaciones científicas existentes en publicaciones relevantes, fundamentalmente de artículos en revistas y libros especializados. También se han consultado revisiones de especialistas y otros trabajos presentados en actas de Congresos. La temática ha sido siempre el aDNA en su amplio espectro. A esto se suma la experiencia adquirida durante la estancia en el grupo de investigación *Human Evolutionary Biology* del Departamento de Genética, Antropología Física y Fisiología Animal de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU), que resultó de gran ayuda dada su experiencia en el análisis de aDNA.

En referencia a la estrategia empleada para la selección de la documentación, se realizó una búsqueda exhaustiva de la literatura relacionada con el tema a tratar. La mayor parte de los artículos científicos, además de los libros *Ancient DNA Typing. Methods, Strategies and Applications* y *Métodos y Técnicas de Análisis y Estudios en Arqueología Prehistórica*, fueron facilitados por el grupo de investigación *Human Evolutionary Biology* de la UPV/EHU. El resto de los artículos (en su gran mayoría revisiones) fueron obtenidos a través de diversos buscadores online como *PubMed*. Se introdujeron los siguientes comandos de búsqueda:

PubMed

- "Ancient DNA" [All Fields]
- "Ancient DNA" [All Fields] AND "extraction" [All Fields]
- "aDNA" [All Fields] AND "Human" [All Fields]
- "aDNA" [All Fields] AND "Soil" [All Fields]

- “aDNA” [All Fields] AND “Cytochrome b” [All Fields]

Entre toda la literatura recopilada (unos 70 artículos), se intentó seleccionar la más actual e innovadora. A continuación, se leyeron los *abstract* de estas fuentes preseleccionadas, con la finalidad de decidir si la información que contenían era la que los objetivos de esta revisión precisaban. Después, se prosiguió con la lectura de las referencias definitivas (unos 50 artículos). Teniendo en cuenta los objetivos de este trabajo, se escogió la información más relevante para la redacción del proyecto y se clasificó en base a los diferentes apartados.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Diseño metodológico para el análisis paleogenético en contextos arqueológicos

Los pasos a seguir a la hora de realizar un análisis paleogenético de los restos recuperados en un yacimiento arqueológico dependen de las condiciones del escenario hallado. Se seguirá una metodología específica en función del tipo de muestra y del origen de esta, pero todas las investigaciones siguen un procedimiento general (Figura 1): i) registro de las muestras recuperadas (esqueléticas y de sedimento, entre otras), ii) realizar un muestreo representativo, iii) almacenar el material de estudio, iv) procesar la muestra para la consiguiente extracción de aDNA y v) determinar molecularmente su especie cuando a nivel morfológico no sea posible. Además, un buen diseño experimental conlleva el establecimiento de unas medidas preventivas que eviten la contaminación y deterioro de la muestra en todos los pasos que impliquen su manipulación.

i. Toma de muestra

El estudio del aDNA implica trabajar con muestras que presentan una escasa cantidad de DNA, estando este material genético fragmentado y degradado. Dependiendo de las cuestiones que se planteen en el propio yacimiento, las muestras a seleccionar pueden ser diferentes; principalmente suelen ser esqueléticas o de sedimento. En la mayoría de los casos, los tejidos seleccionados para la extracción de aDNA son huesos y dientes, dada su robustez física y química que protege o atenúa la degradación del material genético y les permite, a su vez, su propia conservación a lo largo de los años⁷. En este trabajo nos hemos centrado en tres tipos de muestra: hueso, diente (pudiendo contener sarro, que es una importante fuente de información) y sedimento del lugar del enterramiento.

Entre todas las muestras esqueléticas, y teniendo en cuenta que los análisis de DNA son intrínsecamente destructivos, se han de seleccionar aquellas que tengan potencial de extracción, es decir, una elevada probabilidad de recuperación de aDNA, además de procurar de que no se destruya información clave para el resto de estudios sobre la misma muestra (morfológicos, cronológicos, isotópicos, etc.). Para ello, se siguen una serie de criterios expuestos en la Tabla 2. Lo mismo ocurre en el caso de las muestras de sedimento, ya que se recogen de diversas zonas, tanto donde se encuentran los restos esqueléticos como de otras donde se prevé que puede haber presencia de DNA.

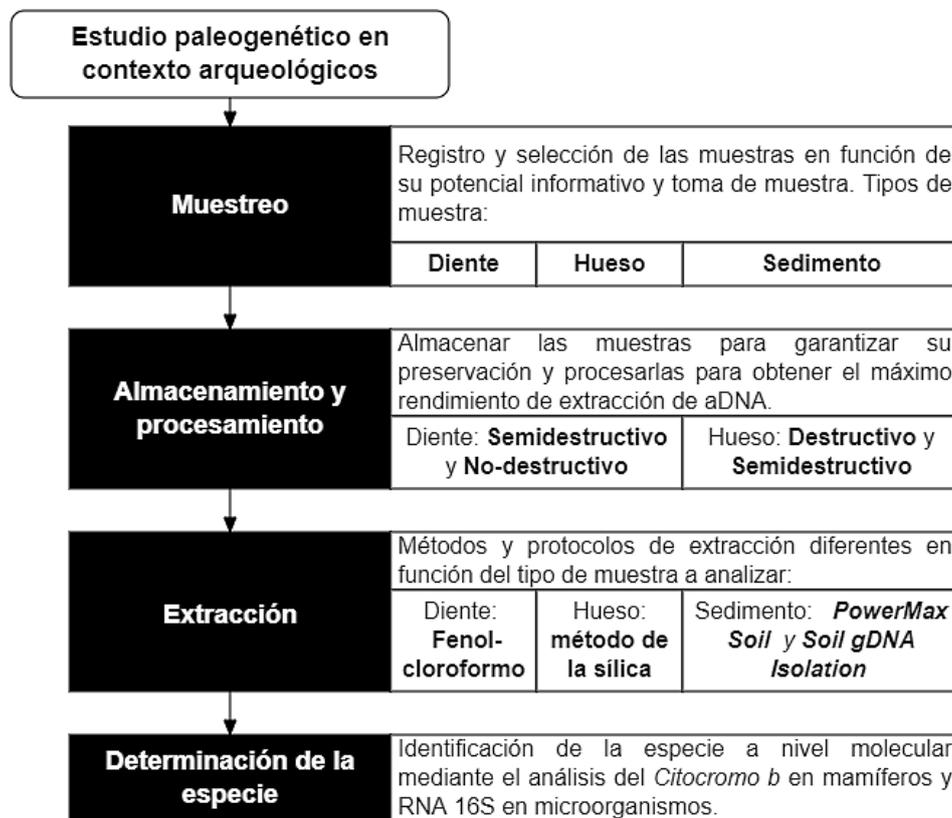


Figura 1. Diagrama resumen del diseño experimental planteado para el análisis paleogenético en contextos arqueológicos. Se expone la metodología a seguir en función del tipo de muestra recuperada. Todas las muestras se almacenan en las mismas condiciones. Mientras las muestras esqueléticas (hueso y diente) necesitan ser procesadas para la realización de la extracción, las muestras de sedimento no suelen ser tratadas.

Cuando se parte de muestras esqueléticas (huesos y dientes), los dientes son el material preferente por ser los más abundantes y contener el DNA mejor preservado y protegido por el esmalte dentario. Los **dientes** presentan en su capa más externa un esmalte dental, acelular y avascular, compuesto por calcificaciones minerales (cristales de hidroxiapatita en su gran mayoría); característica que les proporciona esa propiedad de dureza o resistencia para proteger el material genético que albergan en su interior,

en la cavidad pulpar (Figura 2a)⁷. No obstante, y aunque la mayor parte del aDNA que se ha conseguido recuperar está presente en dicha cavidad de la raíz, también se ha conseguido extraer cierta cantidad de DNA de la dentina²⁴. Además de este DNA endógeno, también se ha logrado extraer DNA y aDNA exógeno¹⁵ (de microorganismos) de los cálculos dentales o sarro^{4,25}.

Criterios de selección de muestras esqueléticas para el análisis de aDNA

Los huesos y los dientes **no han de tener fisuras o ataques microbianos** (caries).

Se seleccionan preferentemente los dientes con una **raíz bien conservada**.

Los huesos han de ser **duros y compactos**. Son preferibles los huesos largos (tibia y fémur) a los huesos porosos (a excepción del hueso petroso).

Cuando se trabaja con un gran número de individuos, es recomendable tomar el mismo elemento anatómico de todos ellos, con tal de evitar su doble tipado.

Las muestras quemadas o expuestas a una elevada temperatura no son apropiadas.

Tabla 2. Criterios para la ejecución de un buen muestreo^{4,7}.

El **hueso** (Figura 2b) se compone, principalmente, de proteínas y minerales; la parte mineral (hueso compacto), está compuesta mayormente de hidroxapatita⁵ –que proporciona soporte a la parte proteica compuesta por colágeno y osteocalcina–, excluyendo así físicamente agentes o enzimas extracelulares que dañan esta parte interior orgánica⁷. Aunque es cierto que se ha demostrado que el estado diagenético del hueso del que se extrae el aDNA está relacionado con la supervivencia y la conservación del aDNA, los mecanismos de deterioro biomolecular, así como la localización del DNA dentro de la estructura microscópica del hueso, siguen siendo poco conocidos⁶⁷.

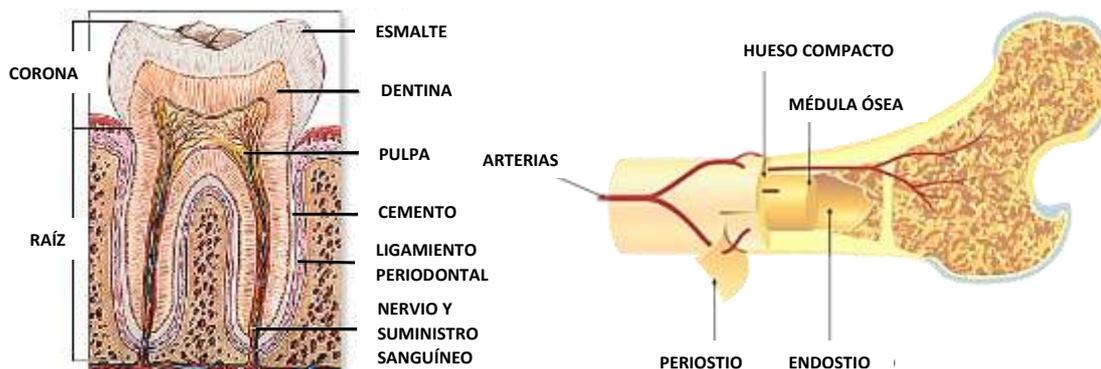


Figura 2. Anatomía del hueso y del diente. a) A la izquierda se observa la anatomía del diente; el DNA está presente en las células que componen la pulpa (fibroblastos, macrófagos y linfocitos, entre otros), también en aquellas que forman el cemento y la dentina (cementoblastos y odontoblastos). b) A la derecha, se pueden ver las partes que componen el hueso. El DNA está presente en el interior de la médula ósea; cuantas más trabéculas conformen el hueso esponjoso (más denso sea), mayor será la probabilidad de que alberguen DNA en su interior^{29,30,31}.

Sin embargo, no siempre se pueden analizar este tipo de muestras, ya sea porque no se recuperan o por ser escasas o piezas únicas. Una alternativa sería recoger muestras de **sedimento** en el lugar de enterramiento, tomando determinadas cantidades de sedimento de diferentes cuadrantes del lugar con el fin de obtener una muestra representativa. Este tipo de análisis sedimentológico de aDNA puede ser útil para determinar la presencia de especies animales y bacterianas en los suelos, además de en el caso de que se quiera llevar a cabo un estudio de posibles contaminaciones de las muestras encontradas en el yacimiento^{26,27}, ya que ocasionalmente estas pueden contaminarse por el medio que las rodea⁷. En este tipo de análisis hay que tener en cuenta que la dificultad radica en que se suelen obtener muestras con diferentes perfiles genéticos. Este inconveniente está siendo superado por el desarrollo de nuevos protocolos de extracción para este tipo de muestras, obteniendo resultados prometedores. Un ejemplo de ello es la reciente extracción de nDNA y mtDNA neandertal a través de NGS, a partir de muestras de sedimento de diferentes cuevas del Pleistoceno Superior (hace ~70.000-15.000 años)²⁸. No obstante, queda todavía mucho que investigar en relación a la eficiencia de recuperación de aDNA de los sedimentos, para llegar a desarrollar variantes mejoradas de los protocolos de extracción actuales.

En la investigación paleogenética, los restos esqueléticos (huesos y dientes) han sido y son los sustratos más estudiados. Sin embargo, dada la naturaleza compacta y resistente de estos tejidos y su antigüedad, la cantidad de DNA que presentan no es tan elevada como lo puede ser en otros tejidos con más componente orgánico y más recientes, lo que ha implicado una búsqueda extensa de estrategias para maximizar la recuperación de aDNA endógeno de especímenes esqueléticos antiguos³². Ejemplo de ello son estudios recientes que han demostrado el gran potencial de extracción de aDNA de algunos huesos poco densos, anteriormente subestimados, como, por ejemplo, la porción petrosa del hueso temporal⁴. Asimismo, otros estudios afirman haber obtenido elevadas cantidades de aDNA a partir del análisis de cabello antiguo⁴ de, entre otros, humanos^{33,34}. Otros ejemplos serían el cuero, las barbas, las garras y las plumas de animales, elementos compuestos por capas de colágeno o queratina, que aunque suelen descomponerse cuando se depositan bajo tierra, se han descrito algunos contextos extraordinarios (como, por ejemplo, enterramientos con muestras conservadas en el permafrost de bison³⁵ y de buey almizclero³⁶) en los que estos elementos pueden conservarse en el registro arqueológico reteniendo el aDNA del huésped³². No obstante, la recuperación de este tipo de muestras suele ser excepcional,

puesto que no se suelen preservar así como lo hacen las muestras esqueléticas a lo largo de los años.

Se sabe que las tasas de éxito para obtener un perfil genético varían entre las diferentes porciones esqueléticas³⁷. Esta limitación en el muestreo recae en la escasa información que se tiene acerca de la conservación del material genético en las muestras antiguas, sobre todo en las muestras óseas, ya que se desconoce cómo se degrada el DNA en el colágeno mineralizado del hueso, o dónde sobrevive en aDNA en la arquitectura de este material⁵. La densidad del hueso es un factor importante que influye en la preservación del DNA³⁷, ya que la exclusión física de los microorganismos y otros contaminantes externos pueden ser características importantes en la supervivencia del material genético^{5,38}, y también que el DNA puede quedarse atrapado en las superficies externas de las fibrillas de colágeno (en el proceso de mineralización del hueso) o en la superficie de los cristales de hidroxiapatita en desarrollo⁵. Al contrario, esta problemática no es tan limitante en el caso de las muestras dentarias, puesto que el diente presenta una estructura externa más compacta que protege el DNA en su interior, siempre y cuando no presente fisuras o caries que dejen la cavidad pulpar al descubierto.

Por todo ello, y con el objetivo de seleccionar las mejores muestras del conjunto recuperado en un yacimiento, los investigadores han tratado de desarrollar nuevos métodos de muestreo en base a toda la información desarrollada con anterioridad. A modo de ejemplo, tenemos una estrategia de muestreo que ayuda en la selección de la mejor muestra de hueso y/o porción del hueso basado en la Tomografía Computarizada (*Computed Tomography, CT*)³⁸, método ampliamente utilizado para medir con precisión la variación de la densidad en los tejidos biológicos. Un estudio reciente³⁸ ha afirmado que la CT pudo optimizar la selección de las regiones más eficientes para la extracción de aDNA de la porción petrosa del hueso temporal, mediante la revelación de las zonas más densas del propio hueso. No obstante, esta técnica es cara y laboriosa, y no está presente en la mayoría de los laboratorios paleogenéticos, por lo que es necesario seguir investigando e ir resolviendo las cuestiones limitantes acerca de la conservación del aDNA en las muestras biológicas, con el fin de establecer unos criterios de selección más óptimos no basados en suposiciones.

En resumen, existe una necesidad acuciante de modelos de selección más refinados basados en el conocimiento de la conservación del aDNA en muestras esqueléticas (sobre todo en hueso) y de herramientas que permitan maximizar el rendimiento de la extracción de aDNA y su posterior análisis. A medida que avance este

conocimiento en la conservación del material genético en los restos esqueléticos y se disponga de herramientas para abordar los límites actuales, se aprovechará el potencial de los sustratos descuidados o subexplotados para proporcionar una visión única de la filogenética, la evolución microbiana y demás procesos evolutivos³².

ii. Almacenamiento y/o procesamiento de las muestras

Antes de abordar el protocolo de extracción de aDNA, se deben de procesar las muestras para optimizar la recuperación del material genético. Para ello, es recomendable seguir una serie de instrucciones que ayuden a la preservación de las muestras y, que al mismo tiempo, eviten su contaminación.

Desde el momento del hallazgo de los restos a analizar, estos deben ser manipulados con guantes para evitar su contaminación. Cada una de las muestras recogidas se depositará en una bolsa de plástico independiente, y en el caso de que las muestras se encuentren húmedas y no puedan ser transportadas en condiciones de humedad y temperatura adecuadas, se han de trasladar en bolsas de papel para evitar su deterioro. Una vez se quiera almacenar el material de estudio, para minimizar el riesgo de contaminación post-excavación y degradación de aDNA, las muestras se han de conservar en oscuridad, a temperatura y humedad constante⁷.

Antes de llevar a cabo el análisis paleogenético de las muestras, es aconsejable realizar un registro fotográfico de todas aquellas muestras esqueléticas que se han seleccionado, ya que, en ocasiones, se destruyen parcialmente o por completo para poder realizar la extracción de aDNA. Además, es importante evitar el lavado de las muestras, ya que el agua degrada el DNA por hidrólisis⁷.

Las muestras esqueléticas, a diferencia de las muestras de sedimento, requieren de una previa preparación antes de realizar la extracción de aDNA. Además, dependiendo de la importancia de la muestra, se seguirá un método destructivo, semidestructivo o no destructivo. Por un lado, la metodología habitual para el procesamiento de los dientes implica lavar su superficie con ácidos y RUV¹, para después: i) método semidestructivo: serrarlos transversalmente en la zona del cuello cervical (Figura 3) y posteriormente limar la cavidad pulpar que queda al descubierto; o ii) método destructivo: la pulverización completa del diente, manual o automáticamente (*Freezer Mill*)²⁹. No obstante, no siempre es viable la destrucción completa o parcial del diente; es por ello que se han ido desarrollando nuevos métodos más conservadores para su análisis. Estudios recientes^{2,39} afirman que se puede obtener aDNA de los dientes sin tener que destruirlos, basándose en la extracción del material genético del cemento (tejido mineralizado que recubre la raíz, Figura 2a), a través de una incubación

del diente en su totalidad, dejando expuesta la raíz (impermeabilizando el resto del diente con *parafilm*) en un tampón de lisis^{2,39}. Otro ejemplo sería el método no destructivo desarrollado por Hervella *et al.*, 2015²⁹ (Figura 3), el cual consigue extraer aDNA de los dientes (caninos y molares, principalmente) mediante perforaciones cervicales que dejen la cavidad pulpar al descubierto.

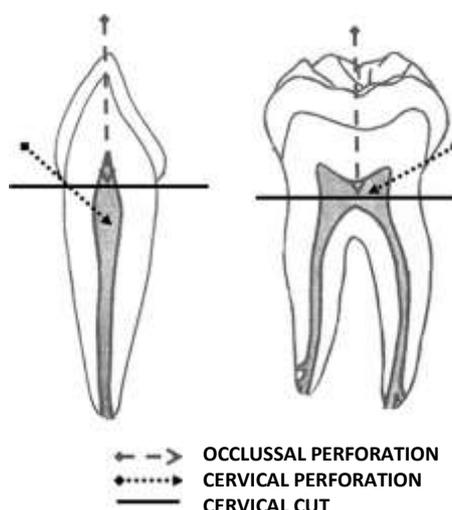


Figura 3. Método de procesamiento de diente (modificado de Hervella *et al.*, 2015).
Método semidestructivo: corte cervical del diente. Método no destructivo: perforación cervical y oclusal del diente²⁹.

Por otro lado, en el caso de los huesos, la muestra se limpia por abrasión¹. Dependiendo de las condiciones y necesidades del estudio, se puede optar por diferentes métodos de procesamiento: i) método no destructivo: perforación del hueso; o ii) método destructivo: pulverización de un fragmento de hueso. Cuando el registro de muestras esqueléticas encontradas en el yacimiento es escaso, la metodología escogida se basa en minimizar al máximo la destrucción de la muestra; se prosigue a perforar la pieza ósea con una broca de dentista, para poder pulverizar la matriz esponjosa de su interior y no dañar la estructura exterior del hueso. En otras ocasiones, cuando las muestras esqueléticas no son limitantes, es permisible pulverizar una pieza ósea al completo (costilla) o parte de ella (fragmento de hueso largo) para poder sacar el máximo rendimiento de la extracción. La pulverización de toda la pieza se realiza manual o automáticamente (*Freezer Mill*); la pulverización automática se lleva a cabo mediante un molino de impacto electromagnético refrigerado con nitrógeno líquido.

Estudios acerca de la conservación del aDNA en tejidos antiguos⁴⁰ afirman que una “predigestión” enzimática breve basada en la incubación con Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA, *Ethylendiaminetetraacetic acid*) de los huesos pulverizados aumenta de manera notable la cantidad y calidad de aDNA endógeno recuperado, puesto que el EDTA –tampón que desmineraliza la capa superficial del

hueso— puede recuperar el aDNA retenido en la hidroxiapatita. También indican que, en el caso del diente, la extracción de aDNA de las células de la capa externa de la raíz (cemento) es más eficiente, en cuanto a la recuperación de aDNA, que la de las células de la dentina interna⁴⁰.

iii. Extracción de aDNA en función del tipo de muestra a analizar

El paso más importante en los estudios paleogenéticos es la extracción de aDNA. La búsqueda del método más apropiado para la obtención de aDNA de muestras antiguas ha sido considerable; existen muchos métodos de extracción de aDNA de muestras antiguas, puesto que cada laboratorio adapta y varía los protocolos existentes en función de sus necesidades, limitaciones y experiencia. Sin embargo, la mayoría de las publicaciones tienen como objetivo maximizar el rendimiento de la recuperación de aDNA, en lugar de realizar investigaciones sistemáticas dirigidas a la mejora y comprensión del propio protocolo⁴¹ para estandarizar el método de extracción. Además, las muestras antiguas son individuales, cada una requiere un procedimiento específico y, aunque por muchas razones no es posible ni recomendable realizar un protocolo individual para cada muestra, es difícil concretar un método de extracción que sea útil para muestras con DNA de calidades completamente diferentes¹⁴.

La extracción de aDNA, a rasgos generales, se basa en un proceso de decalcificación y/o desmineralización [p. ej. con EDTA y/o Dodecil Sulfato Sódico (*Sodium Dodecyl Sulfate*, SDS)] y posterior hidrólisis de posibles membranas celulares y/o proteínas (mediante proteasas o agentes reductores, p. ej. proteinasa K) remanentes unidas al DNA recuperado de una muestra antigua¹, con el objetivo de aislar el material genético. Este proceso sigue una metodología diferente en función del tipo de muestra a analizar; dada la búsqueda bibliográfica realizada, se proponen los siguientes protocolos de extracción que actualmente más se utilizan en los estudios de aDNA, por el hecho de presentar un mayor número de ventajas que de limitaciones: la extracción de aDNA a partir de diente por el método del fenol-cloroformo, la extracción de aDNA de muestras esqueléticas por el método de Rohland & Hofreiter (basado el método de la *silica*) y la extracción a partir de sedimento por kits comerciales como *PowerMax Soil* y *Soil gDNA Isolation*. Según Rohland & Hofreiter⁴¹, 2007, muchos productos químicos utilizados en los diferentes métodos de extracción, afectan de forma negativa al rendimiento de recuperación de aDNA, incluso hay veces que lo disminuyen. Por ello, se procederá a exponer el método de extracción optimizado por estos autores que supera a todos los demás métodos en términos de rendimiento de extracción. Sin embargo, a raíz de este, han surgido otros métodos más específicos y novedosos para

cada tipo de muestra, los cuales mejoran algunos aspectos limitantes del método tradicional.

a) Método del fenol-cloroformo para muestras dentarias

La extracción de DNA basada en el método del fenol-cloroformo ha tenido éxito en muchos tipos de materiales como, por ejemplo, huesos, dientes y heces¹⁴. El fenol es un potente agente desnaturizante, necesario para romper las histonas que empaquetan el nDNA y poder llegar a obtener, así, no sólo el mtDNA sino también el nDNA¹⁴. Teniendo en cuenta que los dientes tienen una estructura externa muy mineralizada y compacta que preserva el DNA en su interior, además de aislarlo de agentes inhibidores, es más probable extraer nDNA o fragmentos de DNA de mayor tamaño, así como coextraer menos inhibidores, de este tipo de muestras que de otras muestras orgánicas (menos conservadas). Por ello, y dado que la extracción en base de *silica* es preferible para la recuperación de fragmentos de DNA más pequeños, es el método del fenol-cloroformo el que se emplea, sobre todo, en las muestras dentarias. No obstante, en comparación con el método en base de *silica*, el método del fenol-cloroformo coextrae más inhibidores, lo cual puede generar problemas a la hora de realizar la PCR.

En referencia al protocolo, primeramente, y una vez la pieza dental esté procesada (serrada o pulverizada), hay que incubar la muestra en una solución de lisis (0,5M EDTA; 0,5mM Tris HCl; SDS 0,5%; 200µL proteinasa K) durante 2h a 56°C (u *over night* a 37°C), con rotación mecánica. A continuación, se procede a extraer el DNA de los restos celulares con la adición de la solución de fenol por un lado y la de cloroformo por otro; el fenol hace que la parte proteica del extracto se desnaturalice y quede disuelta en la parte fenólica, mientras que el DNA permanece en la parte acuosa. El cloroformo también tiene la función de separar el DNA de las proteínas a la que esta molécula se pueda unir, mediante cambios en el pH del extracto que desnaturaliza las proteínas. La parte acuosa recuperada será, después, purificada y concentrada mediante filtración, con el uso del Centricon-30^{29,42}. Además, en cada tanda de extracción se incluye, como mínimo, un blanco de extracción, o un blanco de extracción por cada cuatro muestras⁴².

Este método, por lo tanto, se basa en un procesamiento semidestructivo o destructivo de la muestra, ya que hay que cortar o pulverizar, respectivamente, el diente para dejar la cavidad pulpar al descubierto y que el tampón de lisis trate el DNA que alberga en su interior. A pesar de que el método semidestructivo permita la reconstrucción de la muestra para poder realizar otro tipo de análisis sobre la misma

(antropológicos, morfológicos, etc.) –lo cual hace que sea más usado que el método destructivo–, no siempre es permisible cortar la muestra dentaria; es por ello que los investigadores se han esforzado para obtener variaciones de los métodos ya establecidos que sean más conservadores y poder mejorar así la ejecución del muestreo. Ejemplo de ello es el mismo método desarrollado por Hervella *et al.*, 2015²⁹, el que demuestra que, a través de las perforaciones realizadas en el procesamiento de la muestra (sobre todo la cervical) y la ayuda de diferentes herramientas que atraviesan el diente por ambos orificios (orificio cervical y orificio del ápice), es posible la extracción del aDNA que la cavidad pulpar alberga gracias a un sistema de irrigación endodóntico; este sistema introduce el tampón por un orificio y hace que salga del otro, recuperando a su paso el aDNA retenido en el interior, aunque la cantidad de aDNA que se extrae de esta manera suele ser menor en comparación al resto de los procedimientos de procesamiento.

Aunque es cierto que las muestras dentarias presentan una menor cantidad de inhibidores de la PCR en comparación, por ejemplo, con las muestras óseas, una de las mayores limitaciones del método del fenol-cloroformo es la falta de eliminación de dichas impurezas. Con el fin de solucionar este inconveniente, y debido a la alta cantidad de aDNA recuperado con el método del fenol-cloroformo³⁷, se podría plantear una estrategia combinada: para aquellas muestras dentarias en las que se prevé una elevada cantidad de inhibidores, se podría emplear, inicialmente, el método de extracción del fenol-cloroformo para recuperar la máxima cantidad de aDNA; y una vez extraído el material genético, y con el fin de eliminar los posibles inhibidores, el extracto resultante se podría purificar mediante una re-purificación ya planteada en algunos métodos de extracción forenses (basados en el método de purificación de la *silica*)³⁷. No obstante, y teniendo en cuenta que el protocolo de extracción del método del fenol-cloroformo ya es, de por sí, laborioso, esta re-purificación del extracto aumentaría el tiempo de análisis, aumentando también la manipulación y la probabilidad de contaminación de la muestra. En definitiva, hay que tener en cuenta las ventajas y las limitaciones que cada uno de los métodos desarrollados ofrece, para que después el analista, en función de las condiciones tanto del yacimiento como de las muestras, seleccione uno u otro.

b) Método de la *silica* de Rohland y Hofreiter para muestras esqueléticas

Según Rohland & Hofreiter⁴¹, 2007, la mayoría de los productos químicos añadidos de manera rutinaria en los diferentes métodos de extracción de aDNA no

presentan efectos positivos en el rendimiento de recuperación del material genético. Ejemplo de ello son los surfactantes utilizados para la lisis de las membranas celulares, ya que en las muestras antiguas no se esperan encontrar células intactas o que conserven su membrana celular (a excepción de especímenes conservados procedentes del entorno del permafrost). De hecho, determinaron⁴¹ que ninguno de los productos químicos añadidos al tampón de extracción, a excepción del EDTA y la proteinasa K, tienen un efecto positivo en el rendimiento de obtención de aDNA.

La problemática expuesta se puede reflejar en la existencia de diferencias en la recuperación de aDNA entre los diversos métodos o protocolos utilizados para las extracciones de muestras antiguas, además de en la capacidad de eliminar las impurezas o inhibidores de la PCR¹⁴. También es de considerar el efecto (aunque menor) que pueden tener tanto la temperatura como los tiempos de incubación, puesto que al estar el material genético degradado, hay que aumentar ambas condiciones para compensar la recuperación de aDNA. No obstante, hay que tener en cuenta que los métodos de extracción de aDNA también tienen que evitar tratamientos demasiado agresivos, incluyendo las elevadas temperaturas o el uso de detergentes fuertes, puesto que, aunque estos tratamientos podrían aumentar la liberación del aDNA, disminuirían el rendimiento general de la recuperación del material genético al infringir más daños a dichas moléculas⁴³.

En base a todos estos factores, Rohland & Hofreiter⁴³, 2007, se centraron en desarrollar un método que alcance la máxima recuperación de aDNA. Basado en el método de la suspensión de la *silica*, consiste en someter a incubación el polvo esquelético utilizando un tampón de lisis que contiene únicamente EDTA y proteinasa K. La purificación del DNA mediante su unión a la matriz de sílice se realiza en presencia de altas concentraciones de tiocinato de guanidinio (GuSNC), para que, después, en el paso de la elución, se consiga optimizar al máximo la recuperación de aDNA^{6,11,43}. Este método proporciona un equilibrio entre la liberación del DNA, la degradación del DNA durante la extracción y la separación del DNA y los inhibidores, maximizando el aDNA disponible para las consiguientes aplicaciones⁴³.

Una de las grandes ventajas de este método es su amplia aplicabilidad a muestras óseas y dentales en un tiempo relativamente corto, aunque también es una de sus grandes limitaciones, puesto que es específica para este tipo de muestras debido a las altas concentraciones de EDTA necesarias para disolver las matrices óseas y dentales compuestas de hidroxiapatita. No obstante, existe una variación de este método de extracción desarrollado por el mismo Rohland *et al.*, 2018¹¹, el cual también

abarca la extracción de aDNA a partir de muestras sedimentológicas, gracias a la adopción de nuevos tampones para la unión del DNA a la sílice, además de reducir los tiempos de incubación para las muestras sedimentológicas. Otra de las limitaciones puede ser la falta de uso de columnas pre-fabricadas que contienen las matrices de sílice en su interior, lo que hace que el procedimiento de la extracción se facilite, además de que disminuya el tiempo de manipulación de la muestra; es el caso de los métodos de extracción de DNAzol²⁷ (para muestras óseas) y de Svensson *et al.*, 2021⁴⁴ (para muestras esqueléticas), los cuales presentan en sus protocolos las columnas de extracción de *QIAgen* y *Roche*.

En conclusión, y en comparación con otros métodos publicados y anteriormente desarrollados, este protocolo presenta, en promedio, los valores más altos de aDNA amplificable⁴³. Esto no quiere decir que, para determinadas muestras, otros protocolos no puedan dar mejores resultados, sino que dado su rendimiento superior y en ausencia de un conocimiento previo de qué método funciona mejor con la muestra a analizar, este puede considerarse como el método de extracción más prometedor o apropiado para comenzar el análisis de las muestras antiguas⁴³. De hecho, este método y sus variantes son los más utilizados para la extracción de aDNA que, posteriormente, se pretende analizar mediante NGS (p. ej. el descubrimiento de los *Homo Sapiens* más antiguos de Europa en la cueva Bacho Kiro, Bulgaria⁴⁵).

- **Método del DNAzol para muestras óseas**

Una de las variaciones del método de Rohland & Hofreiter es el método de extracción de aDNA a partir de hueso pulverizado mediante el reactivo DNAzol (*Applied Biosystem*), empleado en el laboratorio de aDNA de la UPV/EHU. A diferencia del método del fenol-cloroformo, y tal y como algunos estudios indican¹⁴, este método recupera fragmentos de aDNA de menor tamaño, por lo que acostumbra a utilizarse con muestras óseas; esto se debe a que presentan una estructura externa menos compacta que la estructura de los dientes, siendo más vulnerables a los factores tafonómicos acontecidos a lo largo de los años, haciendo que el DNA que albergan en su interior esté más fragmentado y presente una mayor concentración de inhibidores. Por ello, el método basado en la *silica* obtendrá más fácilmente los fragmentos del aDNA degradado del interior del hueso. Asimismo, a causa de que este protocolo de extracción comprende un número elevado de filtraciones (para eliminar impurezas), la cantidad de inhibidores recuperados a partir de este método es mucho menor que en el caso del método del fenol-cloroformo, lo cual beneficia la posterior amplificación de las muestras

por PCR. Sin embargo, esto también supone una limitación, ya que se puede perder parte del aDNA recuperado en estas filtraciones seriadas.

El protocolo de extracción se inicia con la incubación del hueso pulverizado con el reactivo DNAzol durante tres días en oscuridad, con agitación manual y periódica. El DNAzol contiene GuSNC, un desnaturalizante de proteínas o agente caotrópico que ayuda en el aislamiento de los ácidos nucleicos que conforman el DNA. Tras la incubación, el sobrenadante se concentra y se purifica mediante columnas recolectoras que contienen unas bolas de sílice a modo de filtro (*QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN*); el DNA recuperado se une a la matriz de la sílice y así, finalmente, al añadir el tampón de elución, se aísla el DNA retenido en ellas^{27,42}. Al igual que en la extracción de diente, se añade como mínimo un blanco en cada tanda de extracción, o uno por cada cuatro muestras.

La problemática que limita el rendimiento de las extracciones de aDNA a partir de huesos es la escasa información que se tiene respecto a cómo se degrada el DNA en el colágeno mineralizado del hueso, o sobre dónde sobrevive el aDNA en la arquitectura del material⁵. Como ya se indicado, se sabe que la exclusión física de los microorganismos y otros contaminantes externos pueden ser características importantes en la supervivencia del material genético^{5,38}, también que el DNA puede quedarse atrapado en las superficies externas de las fibrillas de colágeno (en el proceso de mineralización) o en la superficie de los cristales de hidroxiapatita en desarrollo. En base a toda esta información recopilada acerca de la diagénesis del DNA en el hueso, se han propuesto dos posibles mecanismos para la conservación o estabilización del DNA en las muestras óseas: la unión i) al mineral (hidroxiapatita) y ii) al colágeno⁵. Sin embargo, aunque estas hipótesis propuestas tienen importantes implicaciones para el desarrollo de métodos de extracción de DNA más eficientes, algunos protocolos implican la eliminación y el descarte de la fase mineral⁵.

Según el estudio llevado a cabo por Campos *et al.*, 2011⁵, cualquier método de extracción (o procesamiento) que implique descartar el sobrenadante que contiene hidroxiapatita tras la desmineralización es menos eficiente en términos de recuperación de DNA que aquellos métodos que lo retienen; es por ello que los métodos de extracción (o procesamiento) que se basan en el uso de EDTA para liberar DNA, o que combinan EDTA con proteinasa K, son tan eficientes (como es el caso de los métodos de extracción basados en la *silica* desarrollados por Yang *et al.*⁴⁶, 1998; Rohland & Hofreiter⁴³, 2007; Dabney & Meyer⁶, 2019).

En resumen, la extracción de aDNA a partir de hueso mediante el método del DNAzol (tanto con un procesamiento destructivo como con un procesamiento no destructivo) ha resultado exitoso en muchos estudios paleogenéticos (p. ej. en el estudio de los factores genéticos y ambientales en la génesis de la espondiloartritis en muestras antiguas de la necrópolis de la catedral de Vitoria/Gasteiz, por Laza *et al.*, 2020⁴²), por lo que es un método a considerar a la hora de realizar un estudio paleogenético a partir de estas muestras. No obstante, cuando la muestra ósea no se presente en buenas condiciones y/o los resultados con este método no sean concluyentes o satisfactorios, una de las alternativas podría ser emplear otra de las variaciones más novedosas del método de extracción tradicional de Rohland & Hofreiter²⁹ o Yang *et al.*⁴⁶: el método de extracción de aDNA desarrollado por Svennson *et al.*, 2021⁴⁴, que también permite la extracción de aDNA de diente.

c) Métodos de *PowerMax Soil* y *Soil gDNA Isolation* para muestras de sedimento

Debido a que muchos yacimientos carecen de restos biológicos, el alcance de los análisis genéticos se ha visto limitado durante muchos años. Incluso, en ocasiones, cuando se encuentran muestras antiguas, a menudo no cubren todo el rango cronológico que el yacimiento abarca²⁸. Esta limitación ha supuesto un gran problema a lo largo de la historia de los estudios paleogenéticos, lo que ha empujado a que los investigadores busquen nuevos caminos para el análisis y conocimiento de las poblaciones pasadas. La reciente publicación de Vernot *et al.*, 2021²⁸, ha demostrado la viabilidad de la secuenciación de no sólo mtDNA, sino también de nDNA de humanos a partir de sedimentos de cuevas de la época del Pleistoceno, evidencia que verifica la posibilidad de realizar un análisis genético detallado para muchos más yacimientos arqueológicos de lo que antes se pensaba.

Sin embargo, en referencia a los métodos de extracción a partir de muestras de sedimento, los protocolos no están tan establecidos o definidos como en el caso de las extracciones de muestras esqueléticas, puesto que se trata de un nuevo procedimiento paleogenético relativamente novedoso. Es por ello que investigaciones las recientes²⁸ que emplean esta estrategia, se basan en la elevada sensibilidad de métodos de análisis paleogenómico para obtener resultados (es decir, en el uso de las técnicas NGS), debido a la dificultad y a la escasa cantidad de aDNA recuperado en los métodos de extracción en muestras antiguas. El método de extracción empleado por Vernot *et al.*, 2021²⁸, se basa en una actualización del método de extracción de Rohland & Hofreiter, 2007⁴³, desarrollado por Rohland *et al.*, 2018¹¹, que no solo sirve para muestras óseas

y dentarias, sino que también para las muestras de sedimento. Este método, basado en la suspensión de perlas magnéticas de la *silica* que permiten extraer el DNA sin necesidad de centrifugación, se diferencia en una selección de tampones de unión de DNA a las matrices de sílice que permite adaptar la recuperación de secuencias de aDNA a de diferentes tamaños en función del interés del investigador. No obstante, este método está dirigido al procesamiento en paralelo de un gran número de muestras, además de su consiguiente análisis mediante NGS. Sería interesante, por lo tanto, un impulso en la investigación para el desarrollo de una metodología de extracción eficaz y sencilla para este tipo de muestras.

En la actualidad, existen diversos kits de extracción de DNA a partir de sedimento. El grupo de investigación *Human Evolutionary Biology* de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU) (Ferrándiz Jiménez, 2020)²⁶, se centró en estudiar y comparar la utilidad de dos kits comerciales en análisis paleogenéticos: el método de extracción de *MO BIO's PowerMax Soil DNA Isolation kit (QIAgen)*⁴⁷ y el método de extracción de *NZY Soil gDNA Isolation kit (Nyztech)*⁴⁸.

Por un lado, con el método de extracción de *PowerMax Soil*, las muestras de sedimento se añaden (en cantidades elevadas) a un tubo de extracción, que contiene microesferas de sílice, con un tampón propio suministrado por el fabricante, para una homogeneización rápida y su consiguiente lisis celular. A continuación, el DNA extraído se captura en la membrana de sílice en formato de columna de centrifugado; además, este filtro permite la limpieza de contaminantes disueltos. Finalmente, se realizan una serie de lavados y se eluye el DNA^{26,47}.

Por otro lado, con el método de extracción de *Soil gDNA Isolation*, se recomienda dividir la muestra en dos submuestras, ya que el kit proporciona dos tampones de disolución inicial alternativos. Las muestras se disuelven y se lisan mecánicamente mediante la adición de uno de los buffer y aditivos potenciadores proporcionados por el fabricante, en unos tubos de extracción con doble filtro: el primer filtro (de perlas de cerámica) impide el paso de sustancias que no sean ácidos nucleicos en el extracto, mientras que el segundo (de microesferas de sílice) separa el DNA del resto de sustancias no filtradas en el primero; así, las proteínas y otros inhibidores de la PCR se eliminan eficazmente en los pasos de lavado. Finalmente, con la adición del eluyente, se obtiene el extracto de DNA^{26,48}.

De acuerdo con los resultados obtenidos por Ferrándiz Jiménez, 2020²⁶, aunque se añadió más cantidad de muestra en el kit de *PowerMax Soil* (0,5-10g de sedimento), la eficiencia de extracción de aDNA por cantidad de sedimento fue mucho mayor en el

caso del método de *Soil gDNA Isolation* (0,25g de sedimento para cada uno de los tampones). Se concluyó que lo que probablemente marque la diferencia entre los dos kits, respecto a la eficiencia de recuperación de aDNA (en cuanto a cantidad), es la limpieza de los contaminantes en disolución, ya que el método de extracción de *Soil gDNA Isolation* presenta dos filtros, mientras que el método de extracción de *PowerMax Soil* sólo comprende uno. Por todo ello, los resultados apuntan a que es preferible utilizar la base metodológica del protocolo de *Soil gDNA Isolation* para el análisis de muestras antiguas, aunque sería sugerente la realización de futuros análisis que respaldaran y dieran fuerza a los aquí concluidos.

iv. Identificación de la especie

Una vez se recupera el aDNA de las muestras problema, y en el caso de que se desconozca la especie a la que pertenecen los restos esqueléticos o sedimentológicos, el primer paso es la identificación de la especie. Por un lado, la antropología física se encarga del estudio de la variabilidad humana de los caracteres biológicos, tanto de los fenotípicos como de los genotípicos, y en relación a los contextos arqueológicos, interesa, sobre todo, la información que aporta en el estudio de los restos óseos⁸. En el caso de que se traten de restos humanos, la identificación de la especie se puede realizar a través de un inventario y un estudio morfológico. Así, la determinación de la especie en muestras humanas puede realizarse incluso antes de la extracción aDNA.

Si no se trata de restos humanos, se debe realizar una identificación zooantropológica de la especie animal a la que pertenezca la muestra. No obstante, la identificación definitiva y certera que ayuda en la distinción de las diferentes especies de mamíferos es el análisis del gen mitocondrial *Cytb* (Figura 4). Este gen presenta considerables niveles de variabilidad o polimorfismos entre las diferentes especies de mamíferos, clasificándolos taxonómicamente; esto lo convierte en una herramienta ideal para las investigaciones inter-especie^{14,49}. La identificación de la variabilidad del *Cytb* se realiza mediante la secuenciación directa del fragmento mitocondrial en cuestión¹⁴.

Por otro lado, puede ser que no haya ningún resto del que, *a priori*, podamos obtener aDNA en el lugar del enterramiento. En estos casos, se puede optar por recoger muestras de sedimento del lugar donde hay evidencias de que puedan hallarse restos biológicos. El aDNA de estos suelos será extraído por protocolos específicos para este tipo de muestra²⁶, como los comentados anteriormente^{11,47,48}; una vez recuperado el aDNA, serán necesarios, por un lado, el análisis del *Cytb* para identificar la existencia de DNA de especie animal y, por otro lado, el uso de determinados *primers* (16S)^{26,27} para la identificación de microorganismos con el fin de identificar la especie o especies

presentes en la muestra. Este mismo análisis se puede realizar en el sarro recuperado de algunos dientes, cuyo fin puede ser identificar infecciones sufridas, así como determinar la dieta del individuo al que pertenecía la muestra, tal y como se descubrió en un estudio paleogenético a partir de muestras de sarro y de abscesos dentarios en los neandertales de la cueva del Sidrón (Piloña, Asturias), que incluso permitieron indicar el uso de plantas medicinales²⁵.

		14380		14390		14400																												
14371	C	G	A	G	A	C	G	T	A	A	A	T	T	A	T	G	G	C	T	G	A	A	T	C	A	T	C	C	G	C	human			
211	G	A	cattle
211	A	goat	
211	G	A	sheep		
212	C	pig	
214	.	.	G	A	G	chicken	
214	.	.	.	A	A	T	turkey	
211	T	dog	
211	T	fox	
330	T	G	A	elephant		
211	kangaroo	
									14410							14420																		
14401	T	A	C	G	T	T	C	A	C	G	C	C	A	A	T	G	G	C	G	C	C	T	C	A	A	T	A	T	T	C	human			
241	.	.	.	A	.	A	A	T	cattle	
241	.	.	.	A	.	A	A	goat	
241	.	.	T	A	.	A	A	T	sheep	
242	.	.	T	.	A	.	.	T	.	.	.	A	.	.	.	C	pig	
244	A	.	T	.	.	C	A	.	.	.	C	T	.	C	.	.	.	chicken	
244	A	C	.	.	T	.	G	T	.	C	.	.	.	turkey	
241	.	.	T	A	.	G	A	T	.	C	dog	
241	.	.	.	A	.	A	.	.	T	.	.	A	.	.	.	C	.	.	A	.	.	A	.	.	.	T	T	fox	
357	C	.	A	.	.	A	.	.	.	T	.	A	.	.	.	C	.	.	A	.	.	A	.	.	.	C	.	T	elephant	
241	A	.	T	.	.	A	C	.	A	.	.	A	.	.	.	C	kangaroo	

Figura 4. Alineamiento múltiple del gen del *Citocromo-b*. Los puntos que sustituyen nucleótidos en las secuencias indican que son coincidentes con la secuencia humana¹⁴.

5. APLICACIONES EN EL ÁMBITO FORENSE

Hoy en día, los laboratorios de genética forense contribuyen en muchos procesos judiciales realizando, entre otras, pruebas de paternidad, exoneración de inculpados, acciones humanitarias (identificación de personas desaparecidas o de tragedias en grandes catástrofes) y prevención y resolución de muchos actos delictivos. Un error en sus resultados puede provocar una conclusión errónea que conducirá a una sentencia incorrecta e injusta, por lo que es imprescindible realizar cuidadosamente todos los pasos del análisis que estas muestras jurídicas impliquen. Esta meticulosidad en la metodología hace que las etapas que comprenden el estudio de las evidencias jurídicas sean muy similares al estudio de las muestras antiguas en contextos arqueológicos.

La genética forense, al igual que la investigación del aDNA, tiene una gran limitación: la escasa cantidad de DNA endógeno disponible en las muestras a analizar⁴¹. Esto se debe a que los estudios genéticos forenses, al igual que los paleogenéticos, comprenden muestras con DNA degradado, con una cantidad y calidad baja de material genético, mezclas de perfiles genéticos de múltiples contribuyentes y presencia de inhibidores de la PCR⁵⁰. Todos estos factores dificultan el análisis de las muestras a través de los métodos convencionales, dando lugar a perfiles genéticos de baja cantidad y calidad, insuficientes para las respectivas comparaciones posteriores con las muestras indubitadas.

Tanto la recogida, la caracterización, la conservación y la recuperación del DNA de las muestras son de vital importancia para obtener un resultado satisfactorio, independientemente del procedimiento de tipificación de DNA utilizado con posterioridad; si las muestras no se manipulan de manera adecuada en estas fases iniciales de la investigación, ninguna de las etapas finales del análisis o de la interpretación de los datos podrá compensarlo⁴⁸.

Por un lado, la recogida y almacenamiento de las muestras en contextos forenses debe llevarse a cabo siguiendo un estricto protocolo, estableciendo una cadena de custodia que indique constantemente el estado y lugar de la muestra, con el fin de producir perfiles genéticos de DNA que sean significativos y legalmente aceptados en los tribunales⁴⁸. Estas medidas, elaboradas por el Instituto Nacional de Justicia, están expuestas en un folleto titulado "*What Every Law Enforcement Officer Should Know About DNA Evidence*"³, que contiene consejos útiles para el personal policial que es el primero en llegar al lugar del delito. Estas medidas son muy similares a aquellas empleadas en los protocolos de excavación especiales dirigidos al análisis paleogenético en contextos arqueológicos⁹, puesto que ambas tienen el objetivo de minimizar al máximo la probabilidad de contaminación de las muestras problema, además de favorecer su preservación.

Por otro lado, la existencia de eficientes métodos de extracción para la obtención del DNA que las muestras problema albergan también es esencial en la genética forense, debido a que, al igual que el aDNA, las muestras que se investigan suelen presentar un material genético especialmente degradado y en un bajo número de copias⁵⁰. Las causas de esta degradación acostumbra a ser diferentes en el ámbito paleogenético y forense, a excepción de algunos casos como pueden ser las acciones humanitarias, donde los huesos y/o dientes de los desaparecidos pueden encontrarse dañados a causa de los factores tafonómicos asociados al lugar.

Tradicionalmente, los enfoques de la genética forense para analizar los restos óseos se han centrado en los métodos de extracción convencionales, no específicos para muestras antiguas⁵¹. No obstante, en los casos donde los restos de las personas desaparecidas hayan estado durante un largo periodo de tiempo sometidos a diferentes condiciones ambientales, estos métodos⁵¹ no resultan tan eficientes. A pesar del establecimiento de diversos procedimientos de extracción para muestras antiguas, la adopción de nuevos protocolos en los laboratorios forenses parece ser un proceso más lento y laborioso, debido al requerimiento de diversas y rigurosas pruebas de validación y rendimiento con el fin de evaluar su gama de aplicaciones dentro de los flujos del trabajo forense. Por ello, las limitadas aportaciones de polvo de hueso que pueden presentar los protocolos para muestras antiguas (como por ejemplo Dabney & Meyer⁶, 2019, que pueden disminuir el rendimiento del análisis) y la recuperación de fragmentos relativamente cortos de DNA (insuficientes para los análisis de STRs y su consiguiente aprobación en los tribunales), pueden resultar una limitación para su aceptación en este campo⁵⁰.

Sin embargo, una publicación reciente de Parson *et al.*, 2021⁵⁰, ha demostrado que la combinación de los métodos de extracción de DNA de hueso empleados en muestras antiguas y los métodos de extracción de DNA de hueso utilizados en contextos forenses, ambos basados en la técnica en base de *silica*, aportan resultados prometedores para las futuras investigaciones forenses que requieran la identificación genética de muestras degradadas. Por lo tanto, existe la necesidad de investigar más acerca de este tema, con tal de desarrollar un método permisible que llegue a establecerse en los contextos forenses.

Otro ejemplo sería el caso de los restos dentales humanos encontrados en los casos criminales, de personas desaparecidas o en las tragedias por grandes catástrofes. Aunque estas muestras no siempre son la primera opción a analizar, constituyen una valiosa fuente de información para la tipificación del DNA, puesto que en dichos casos no siempre se suele disponer de tejidos blandos adecuados, tampoco de huellas dactilares. Estas muestras dentarias pueden ser difíciles de analizar con los métodos tradicionales, ya que suelen resultar dañadas por diferentes razones, lo que da lugar a secuencias de DNA de baja cantidad y/o calidad, obteniendo, en consecuencia, perfiles insuficientes para las posteriores comparaciones. Por lo tanto, es necesario examinar el rendimiento de estos métodos de extracción con el fin de mejorar la recuperación de este material genético⁴⁷.

Ejemplo de ello es el estudio desarrollado por Carrasco, Inostroza and Didier, 2019⁴⁹, que a través del kit de procesamiento de DNA *DFK Kit* (basado en perforar y extraer el tejido que contiene DNA con una herramienta rotativa y limas endodónticas, semejante al método desarrollado por Hervella *et al.*, 2015²⁹) consiguieron recuperar DNA de una manera eficiente de los tejidos de la pulpa dental y del cemento de la raíz, al mismo tiempo que se preservaba la estructura dentaria (para posibles estudios antropológicos forenses). No obstante, su método está testado mediante el uso de técnicas NGS para la amplificación de las muestras, por lo que sería interesante realizar estudios que validen este procedimiento de procesamiento y consiguiente extracción de DNA con técnicas convencionales, además de investigar para un futuro desarrollo de posibles métodos más sencillos y eficientes, parecidos a los que se llevan a cabo en el estudio paleogenético.

6. CONCLUSIONES

La revisión y discusión realizada de las diferentes estrategias de muestreo y de extracción de aDNA en contextos arqueológicos, junto con la aplicación experimental de la metodología planteada, ha permitido llegar a las siguientes conclusiones:

1.- Los criterios vigentes aplicados para la selección de aquellas muestras que sean más óptimas para la obtención de aDNA en contextos arqueológicos resultan válidos. Sin embargo, dada la complejidad de los procesos tafonómicos que pueden afectar a las distintas muestras arqueológicas y, por tanto, a la preservación del DNA contenido en las mismas, resulta difícil diseñar un protocolo único de muestreo que permita optimizar la selección de aquellas muestras (o las mejores porciones de éstas) que tengan alta probabilidad de preservar el material genético. Es preciso, por lo tanto, disponer de más investigaciones para desarrollar unos criterios que permitan valorar el estado de preservación del DNA en muestras antiguas antes de realizar la extracción, con el fin de abordar las limitaciones actuales y aprovechar el potencial de los sustratos descuidados o infra-utilizados.

2.- Los métodos de extracción revisados, discutidos y evaluados en este trabajo, son óptimos para extraer las cantidades necesarias de aDNA para realizar estudios paleogenéticos en contextos arqueológicos, siendo los siguientes métodos los que ofrecen mejores resultados en los estudios paleogenéticos: el método semidestructivo del fenol-cloroformo para muestras dentarias, el método semidestructivo en base de *silica* (DNAzol) para muestras óseas y el método de *Soil gDNA Isolation* para muestras de sedimento. Sin embargo, se propone una mejora en alguno de estos métodos, de forma que se engloben diferentes tipos de muestras para realizar la extracción de aDNA;

p. ej. se recomiendan las variantes del método de Rohland & Hofreiter²⁹, tales como el método de Svensson *et al.*,⁶² y el método de Rohland *et al.*¹⁹, en donde los mismos protocolos pueden aplicarse a muestras esqueléticas y/o de sedimento.

3.- Las metodologías de procesamiento de las muestras no destructivas (o semidestructivas) permiten mantener la integridad de la muestra al mismo tiempo que posibilitan la extracción de una cantidad suficiente de aDNA; estos métodos pueden ser muy útiles en el caso de las piezas “únicas”, así como para el caso en el que las muestras puedan ser objeto de estudios multidisciplinarios (genéticos, isotópicos, antropológicos, cronométricos, etc.). En resumen, es el investigador el que tiene que definir un método de procesamiento u otro, en función de las condiciones de la muestra y del yacimiento, de la importancia de la muestra y la potencialidad de la misma para un enfoque pluridisciplinar, entre otras variables.

4.- Los métodos de extracción de aDNA en contextos arqueológicos pueden aplicarse en el ámbito forense, dado que comparten el mismo tipo de problemática en cuanto a la degradación del DNA. Además, son dos campos científicos que muestran otros aspectos en común, como la metodología analítica, lo cual implica que los avances tecnológicos y metodológicos en uno de estos ámbitos son de beneficio mutuo. Por lo tanto, aunque la validación de los protocolos empleados en la genética forense sea más laboriosa y rigurosa, hay que potenciar el interés por realizar más estudios comparativos y colaborativos entre ambos campos. Así, se podría acelerar la introducción de nuevos métodos de extracción y toma de muestra (como los probados y validados en la investigación de aDNA), mejorando las dos disciplinas e impulsando el estudio del DNA degradado.

AGRADECIMIENTOS

Por último, quería agradecer a Concepción de la Rúa Vaca por permitirme formar parte del grupo de investigación que dirige, y por sus consejos y ayuda tanto a lo largo de mi estancia en las prácticas como en la elaboración del TFM.

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] de la Rúa, C. & Hervella, M. (2013). Paleogenética Humana. In: M. García-Díaz and L. Zapata, ed., *Métodos y Técnicas de Análisis y Estudio en Arqueología Prehistórica. De lo técnico a la reconstrucción de los grupos humanos. Servicio editorial de la Universidad del País Vasco*, pp.428-438
- [2] *New, almost non-destructive archaeogenetic sampling method developed* (2021, May 5). Retrieved from: <https://phys.org/news/2021-05-non-destructive-archaeogenetic-sampling-method.html>
- [3] National Institute of Justice (NIJ). (1999). *What Every Law Enforcement Officer Should Know About DNA Evidence*. Retrieved from: <https://nij.ojp.gov/library/publications/what-every-law-enforcement-officer-should-know-about-dna-evidence>
- [4] Pinhasi R, Fernandes D, Sirak K, Novak M, Connell S, *et al.* (2015). Optimal Ancient DNA Yields from the Inner Ear Part of the Human Petrous Bone. *PLoS ONE*, 10(6), e0129102.
- [5] Campos, P., Craig, O., Turner-Walker, G., Peacock, E., *et al.* (2012). DNA in ancient bone – Where is it located and how should we extract it?. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*, 194(1), pp.7-16.
- [6] Dabney J. & Meyer M. (2019). Extraction of Highly Degraded DNA from Ancient Bones and Teeth. In: Saphiro B., Barlow A., Heintzman P., Hofreiter M., Pajimans J., Soares A. (eds) *Ancient DNA. Methods in Molecular Biology*, vol 1963, pp.25-29. *Human Press, New York, NY*.
- [7] Saiz, M., Álvarez, M^aJ., Martínez, L.J., Álvarez J.C. & Llorente J.A. (2013). El ADN Antiguo una Herramienta para Descifrar la Historia. *Ancient DNA as a Tool to Decipher the History. Cuadernos de prehistoria y arqueología de la Universidad de Granada*, ISSN 0211-3228, N^o 22, 2012, pp.11-47.
- [8] Gracia, A., García, R., Rodríguez E. & Lira, J. (2013). Antropología Física. In: M. García-Díaz and L. Zapata, ed., *Métodos y Técnicas de Análisis y Estudio en Arqueología Prehistórica. De lo técnico a la reconstrucción de los grupos humanos. Servicio editorial de la Universidad del País Vasco*. pp.409-426.
- [9] Lalueza, C. (2010). DNA y Arqueología. In: Á. Pérez and B. Soler, ed., *Restos de vida, de muerte. La muerte en la prehistoria. Museu de Prehistòria de València*, pp.73-80.
- [10] Doimo, M., Pfeiffer, A., Wanrooij, H. P. & Wanrooij, S. (2020). mtDNA replication, maintenance, and nucleotide organization. In: G. Gasparre and a. Porcelli, ed., *The Human Mitochondrial Genome. Academic Press*, pp.3-33.
- [11] Rohland, N., Glocke, I., Aximu-Petri, A. & Meyer, M. (2007). Ancient DNA extraction from bones and teeth. *Nature Protocols*, 12(11), pp.2447-2461.
- [12] Higuchi, R., Bowman, B., Freiberger, M., Ryder, O. & Wilson, A. (1984). DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature*, 312(5991), pp.282-284.
- [13] Knapp, M. & Hofreiter, M. (2010). Next Generation Sequencing of Ancient DNA: Requirements, Strategies and Perspectives. *Genes*, 1(2), pp.227-243.
- [14] Hummel, S. (2011). *Ancient DNA typing*. Berlin: Springer.
- [15] van der Valk, T., Pečnerová, P., Díez-del-Molino, D., Bergström, A., Oppenheimer, J. *et al.* (2021). Million-year-old DNA sheds light on the genomic history of mammoths. *Nature*, 591(7849), pp.265-269.
- [16] Orlando L., Ginolhac, A., Zhang, G., Froese, D., Albrechtsen, A., *et al.* (2013). Recalibrating Equus evolution using the genome sequence of an early Middle Pleistocene horse. *Nature*, 499(7456), pp.74-78.
- [17] Meyer, M., Arsuaga, J.L., de Filippo, C., Nagel, S., Aximu-Petri, A., *et al.* (2016). Nuclear DNA sequences from the Middle Pleistocene Sima de los Huesos hominins. *Nature* 531(7595), pp.504-507.
- [18] Prüfer, K., Racimo, F., Patterson, N., Jay, F., Sankararaman, S., *et al.* (2014). The complete genome sequence of a Neanderthal from the Altai Mountains. *Nature* 505(7481), pp.43-49.

- [19] Green, R., Krause, J., Briggs, A., Maricic, T., Stenzel, U., *et al.* (2010). A Draft Sequence of the Neandertal Genome. *Science*, 328(5979), pp.710-722.
- [20] Dabney, J., Knapp, M., Glocke, I., Gansauge, M. T., Weihmann, A., *et al.* (2013). Complete mitochondrial genome sequence of a Middle Pleistocene cave bear reconstructed from ultrashort DNA fragments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(39), pp.15758–15763.
- [21] Meyer, M., Kircher, M., Gansauge, M., Li, H., Racimo, F., *et al.* (2012). A High-Coverage Genome Sequence from an Archaic Denisovan Individual. *Science*, 338(6104), pp.222-226.
- [22] Hajdinjak, M., Mafessoni, F., Skov, L., Vernot, B., Hübner, A., *et al.* (2021). Initial Upper Palaeolithic humans in Europe had recent Neanderthal ancestry. *Nature* 592(7853), pp.253–257.
- [23] Ari, Ş. & Arıkan, M. (2016). Next-Generation Sequencing: Advantages, Disadvantages, and Future. *Plant Omics: Trends and Applications*, pp.109-135.
- [24] Krütli A, Bouwman A, Akgül G, Della Casa P, Ruñhli F, *et al.* (2014). Ancient DNA Analysis Reveals High Frequency of European Lactase Persistence Allele (T-13910) in Medieval Central Europe. *PLoS ONE* 9(1): e86251.
- [25] Weyrich, L., Duchene, S., Soubrier, J., Arriola, L., Llamas, B., *et al.* (2017). Neanderthal behaviour, diet, and disease inferred from ancient DNA in dental calculus. *Nature* 544, pp.357–361.
- [26] Jiménez Ferrándiz, A.C. (2020). Un estudio de las epidemias del cólera del siglo XIX, basado en el análisis de ADNaa de los enterramientos de la Ermita de Ntra. Sra. de la Asunción (Ocio, Álava). Posibles escenarios sobre interacción bacteriana. (Trabajo de Fin de Grado en Biología). Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea.
- [27] Gonzalez Toral, C. (2017). La epidemia de cólera del siglo XIX y su afectación en la población enterrada en el yacimiento de Ocio (Álava). (Trabajo de Fin de Máster en Antropología Física). Universidades de Alcalá, Autónoma de Madrid, Complutense de Madrid, Universidad del País Vasco/Euskal herriko Unibertsitatea.
- [28] Vernot, B., Zavala, I. E., Gómez-Olivencia, A., Jacobs, Z., Ston, V., *et al.* (2021). Unearthing Neanderthal population history using nuclear and mitochondrial DNA from cave sediments. *Science*, 372(6542), p.eabf1667.
- [29] Hervella, M., Iñiguez, M., Izagirre, N., Anta, A. & de-la-Rúa, C. (2014). Nondestructive Methods for Recovery of Biological Material from Human Teeth for DNA Extraction. *Journal of Forensic Sciences*, 60(1), pp.136-141.
- [30] Borke, J., Zieve, D. & A.D.A.M. Editorial team (2020). Anatomía del diente: MedlinePlus enciclopedia médica ilustración. [online] Medlineplus.gov. Available at: https://medlineplus.gov/spanish/ency/esp_imagepages/1121.htm [Accessed 15 June 2021].
- [31] Contenidos didácticos de la Licenciatura en Enfermería y Obstetricia - Universidad de Guanajuato. (2021). Unidad didáctica 6: El tejido óseo. [online] Available at: <https://blogs.ugto.mx/enfermeriaenlinea/unidad-didactica-6-el-tejido-oseo/> [Accessed 15 June 2021].
- [32] Green, E. & Speller, C., (2017). Novel Substrates as Sources of Ancient DNA: Prospects and Hurdles. *Genes*, 8(7), p.180.
- [33] Rasmussen M., Guo, X., Wang, Y., Lohmueller, K. E., Rasmussen, S., *et al.* (2011). An Aboriginal Australian Genome Reveals Separate Human Dispersals into Asia. *Science*, 334(6052), pp.94-98.
- [34] Rasmussen, M., Li, Y., Lindgreen, S., Pedersen, J. S., Albrechtsen, A., *et al.* (2010). Ancient human genome sequence of an extinct Palaeo-Eskimo. *Nature* 463(7282), pp.757–762.
- [35] Shapiro, B., Drummond, A. J., Rambaut, A., Wilson, M. C., Matheus, P. E., *et al.* (2004). Rise and Fall of the Beringian Steppe Bison. *Science*, 306(5701), pp.1561–1565.
- [36] Campos, P., Willerslev, E., Sher, A., Orlando, L., Axelsson, E. *et al.* (2010). Ancient DNA analyses exclude humans as the driving force behind late Pleistocene musk ox (*Ovibos moschatus*) population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(12), pp.5675-5680.

- [37] Barrio-Caballero, P., (2013). Revisión de métodos de extracción de ADN a partir de restos óseos en el laboratorio forense. *Revista Española de Medicina Legal*, 39(2), pp.54-62.
- [38] Alberti, F, Gonzalez, J, Paijmans, J. L. A., Basler, N., Preick, M., *et al.* (2018). Optimised DNA sampling of ancient bones using Computed Tomography scans. *Molecular Ecology Resources*, 18: pp.1196-1208.
- [39] Harney, E., Cheronet, O., Fernandes, D. M., Sirak, K., Mah, M., *et al.* (2021). A minimally destructive protocol for DNA extraction from ancient teeth. *Genome research*, 31(3), pp.472-483.
- [40] Damgaard, P., Margaryan, A., Schroeder, H., Orlando, L., Willerslev, E., *et al.* (2015). Improving access to endogenous DNA in ancient bones and teeth. *Scientific Reports*, 5(1).
- [41] Rohland, N. & Hofreiter, M. (2007). Comparison and optimization of ancient DNA extraction. *BioTechniques*, 42(3), pp.343-352.
- [42] Laza, I. M., Hervella, M., & De-La-Rua, C. (2016). Genetic Markers in a Medieval Case of Ankylosing Spondylitis. *The Journal of rheumatology*, 43(3), pp.679-681.
- [43] Rohland, N. & Hofreiter, M., (2007). Ancient DNA extraction from bones and teeth. *Nature Protocols*, 2(7), pp.1756-1762.
- [44] Svensson, E., Günther, T., Hoischen, A., Hervella, M., Munters, A. R., *et al.* (2021). Genome of Peștera Muierii skull shows high diversity and low mutational load in pre-glacial Europe. *Current Biology*, 31(14), pp.2973-2983.e9.
- [45] Hublin, J. J., Sirakov, N., Aldeias, V., Balley, S., Bard, E., *et al.* (2020). Initial Upper Palaeolithic Homo sapiens from Bacho Kiro Cave, Bulgaria. *Nature* 581, pp.299–302.
- [46] Yang, D. Y., Eng, B., Wayne, J. S., Dudar, J. C., & Saunders, S. R. (1998). Improved DNA extraction from ancient bones using silica-based spin columns. *American Journal of Physical Anthropology*, 105(4), pp.539-543.
- [47] Carrasco, P., Inostroza, C., Didier, M., Godoy, M., Holt, C. L., *et al.* (2020). Optimizing DNA recovery and forensic typing of degraded blood and dental remains using a specialized extraction method, comprehensive qPCR sample characterization, and massively parallel sequencing. *International Journal of Legal Medicine*, 134, pp.79–91.
- [48] Butler, J. M. (2012). Sample Collection, Storage, and Characterization. *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*, pp.1-27.
- [49] Irwin, D., Kocher, T. & Wilson, A. (1991). Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *Journal of Molecular Evolution*, 32(2), pp.128-144.
- [50] Xavier, C., Eduardoff, M., Bertoglio, B., Amory, C., Berger, C., *et al.* (2021). Evaluation of DNA Extraction Methods Developed for Forensic and Ancient DNA Applications Using Bone Samples of Different Age. *Genes*, 12(2), p.146.
- [51] Loreille, O., Diegoli, T., Irwin, J., Coble, M. & Parsons, T. (2007). High efficiency DNA extraction from bone by total demineralization. *Forensic Science International: Genetics*, 1(2), pp.191-195.
- [52] Herrasti, L., Etxeberria, F., & Berjón, M.A. (2012). Muerte violenta en 1822: una fosa común en Ocio (Zambrana, Álava). *Munibe Antropologia-Arkeologia*, 63:345-366, pp.345-366.
- [53] Kim, S.J., Ahn, J.H., Weon, H.Y., Hong, S. B., Seok, S.J., *et al.* (2015). *Chujaibacter soli* gen. nov., sp. nov., isolated from soil. *Journal of Microbiology*. 53, pp.592–597.