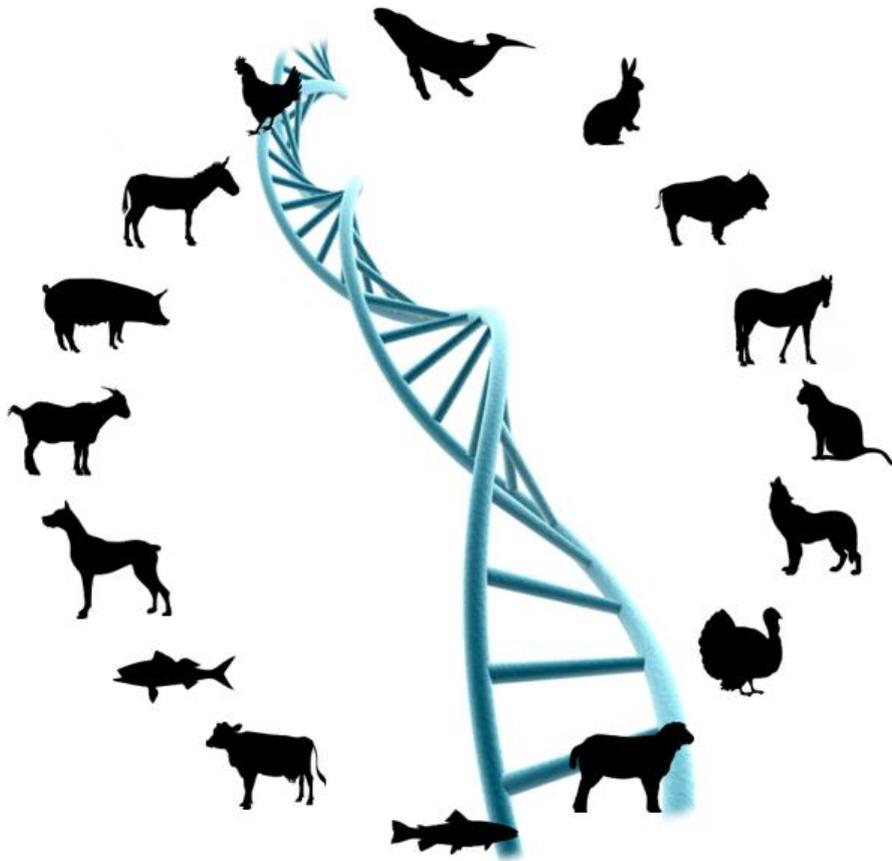


Trabajo de Fin de Grado. Curso 2017-18

Lo que nos cuentan los fósiles

Aplicaciones en el campo de la arqueología
de estudios genéticos en restos faunísticos



Trabajo realizado por: Emilio Vacas Fumero

Dirigido por: Matilde Arnay de la Rosa

GRADO EN HISTORIA

SECCIÓN DE GEOGRAFÍA E HISTORIA

Resumen

Este trabajo tiene como objetivo hacer una recopilación bibliográfica representativa de los estudios genéticos que se han realizado en el campo de la zooarqueología. Se pretende mostrar sus múltiples aplicaciones actuales y su capacidad para dar respuesta a distintas preguntas de carácter arqueológico e histórico.

Palabras clave: ADN, genética, zooarqueología, arqueología, fauna

Abstract

The objective of this work is to make a representative bibliographic compilation of the genetic studies that have been carried out in the field of zooarchaeology. Its aim is to show its multiple current applications and its capacity to answer different questions of an archaeological and historical nature.

Key words: aDNA, genetic, zooarchaeology, archaeology, fauna

Índice

Introducción.....	3
Presentación	3
Conceptos.....	4
Genética.....	4
ADN y ADN _a	6
ADN _n y ADN _{mt}	7
Marcadores genéticos	8
Gen y mutación	9
Especie y población.....	10
Conservación del material genético.....	10
Degradación	11
Contaminación	14
Inhibidores	15
Métodos usados para el análisis de ADN	15
Procedimientos y prevención de la contaminación y degradación	16
Selección del material de estudio y extracción de ADN _a	18
Técnicas de laboratorio	22
PCR	22
Preamplificación inespecífica	24
Clonación	25
Mapa genético	25
Genoteca.....	26
Aplicaciones en arqueología sobre restos faunísticos	26
Identificación de especies	26
Evaluación de otras técnicas	29
Patologías.....	30
Reconstrucción del contexto faunístico (doméstico o salvaje).....	32
Aparición o desaparición de especies.....	33
Evolución o desarrollo de las especies	36
Actividades económicas	37
Otros usos	38
Conclusión.....	39
Bibliografía.....	41

Introducción

Presentación y objetivo del trabajo

Este trabajo tiene como objetivo llevar a cabo una recopilación bibliográfica de las aplicaciones que tiene, en el campo de la arqueología, una de las disciplinas más innovadoras y versátiles de los últimos tiempos, la genética. No obstante, nos centraremos en el caso específico de los estudios genéticos que se han realizado sobre restos de fauna. Con esto, pretendemos exponer de manera clara y concisa, las posibilidades que esta ofrece para la rama de la zooarqueología.

Los motivos que me han llevado a elegir este tema (descontando el evidente interés personal que se ha de tener al iniciar una tarea como esta), se relacionan fundamentalmente con la capacidad que esta línea tiene para desarrollarse en multitud de ámbitos distintos, haciendo que pueda aplicarse en cualquier periodo y circunstancia, siempre y cuando se cuente con los materiales necesarios para hacer dichos estudios.

La naturaleza de la materia vehicular de este trabajo (la genética), requiere una estructura introductoria sólida, que permita atacar el eje del trabajo (que son los estudios realizados sobre restos faunísticos) sin necesidad de hacer continuas interrupciones para aclarar conceptos. Para ello hemos introducido previamente al inicio del tema central, las nociones básicas para luego poder seguir su desarrollo.

En primer lugar, se desglosa un conjunto de términos que serán constantemente utilizados en el texto relacionados con la genética, que van desde algunos muy básicos (como qué entendemos por genética) hasta otros más técnicos, pero que sin embargo son fundamentales (como mutación).

A continuación pasamos a desarrollar dos temas que, especialmente en una ciencia como la genética aplicada a los restos antiguos, son de vital importancia, como es la conservación y los métodos empleados para el estudio. En conservación abordaremos las principales amenazas a las que está expuesto el material genético y como prevenir su aparición y disminuir el daño, mientras que en los métodos describiremos la forma mediante la cual se trabajan los materiales de estudio y las técnicas que se utilizan para extraer información de interés de los mismos.

Una vez explicados todos los conceptos que consideramos fundamentales, mostramos los ejemplos seleccionados de estudios realizados sobre restos de origen animal con

implicaciones en arqueología. Hemos intentado hacer una selección que represente un amplio abanico de casos, periodos y materiales de estudio, tanto para mostrar las capacidades del método, como para hacer de este trabajo una recopilación de un espectro considerable de los posibles usos de la genética en los estudios zooarqueológicos actuales.

Conceptos

Con el fin de sentar las bases teóricas del trabajo y evitar en la medida de lo posible las explicaciones dentro del cuerpo del trabajo, empezaremos describiendo una serie de conceptos fundamentales para lo que será el desarrollo del mismo.

Genética

El primero de ellos, como no puede ser de otra manera, será el de “genética”, y con su definición trataremos de analizar la importancia de esta disciplina. Cuando hablamos de genética hacemos referencia a la ciencia que se encarga del estudio de la transmisión de la información hereditaria de una generación a la otra, siendo su objeto de estudio los “genes” (Rodríguez Arnaiz, Castañeda Sortibrán, & Ordáz Téllez, 2004).

No cabe duda de que la genética es uno de los campos de investigación que más novedades y proyectos está impulsando hoy en día, siendo frecuente encontrarnos con artículos, tanto de divulgación como académicos, en los que de una manera o de otra se hace referencia a los estudios del ADN para muy diversos fines. Esto podría llevarnos a pensar que la genética es una materia que está “de moda” en la actualidad, pero es interesante preguntarnos el “porqué” de ese auge.

En el ámbito de la biología, la genética representa las bases mismas de esta. Todos los organismos vivos (e incluso los que se encuentran en el limbo de esta acepción como pueden ser los virus) tienen en común la presencia de un código genético que los caracteriza y que se pasa de una generación a otra. De ello se deduce que en muchos campos de la biología (como la evolución, inmunología, fisiología o embriología) o de la medicina se requieran unos conocimientos mínimos de la genética.

Las aplicaciones de esta disciplina han llegado a límites insospechados, como puede ser la informática (introduciendo con éxito datos en moléculas de ADN sintetizadas), la nanotecnología (diseñándose nano robots de material genético para fines médicos) o para almacenar y estudiar el genoma de las especies que hay sobre la tierra (con proyectos como “Proyecto de Bio Genoma de la Tierra”). También se hacen estudios de ADN en criminalística, tanto para identificar a víctimas de asesinatos como a los agresores en caso

de que se conserven restos de materia orgánica (como puede ser en los casos de agresiones sexuales).

A la luz de todo esto, no es de extrañar que la versatilidad de la genética permita también responder a algunas de las preguntas que desde la arqueología se pueden formular sobre las formas de vida o los entornos de las poblaciones humanas del pasado, las cuales pueden ser de muy diversa índole. Para ejemplificar esto nos basaremos en una serie de casos de estudio en los que la genética ha sido utilizada.

En primer lugar, hablaremos sobre la recuperación de restos humanos depositados en la fosa común de El Raso de Urbasa (Herrasti, y otros, 2015) tras su asesinato en el contexto de la Guerra Civil Española. En este estudio se incluye, además de un pormenorizado análisis bioantropológico para describir la forma de la muerte, un apartado en el que se coteja el ADN de los individuos exhumados con el de los familiares, consiguiendo un 80% de éxito a la hora de identificar los cuerpos.

La investigación genética también es útil a la hora de asociar determinadas prácticas a unas comunidades concretas a través de la identificación de los recursos vegetales que utilizaban. Una prueba de ello es un estudio en el que se analizan los coprolitos prehistóricos encontrados en una cueva de Texas (Reinhard, Chaves, Jones, & Iñiguez, 2008). De ellos extraen ADN cloroplástico que se puede relacionar con plantas medicinales o alucinógenas.

A continuación, trataremos una de las más novedosas aplicaciones de la genética en el campo de la arqueología, la búsqueda de ADN extraído directamente del sedimento. Este estudio (Slon, y otros, 2017) propone una nueva técnica a la hora de demostrar la presencia de diversas especies (entre ellas las propias del género humano) en los distintos yacimientos. Los autores consiguieron identificar una amplia diversidad de especies animales (entre ellas humanos) en yacimientos cuyas cronologías corresponden al Pleistoceno Medio y Superior. Este artículo lo volveremos a tratar más adelante por las implicaciones que tiene para la línea argumental de este trabajo.

Por último, mostraremos un ejemplo de la gran posibilidad que existe hoy para obtener este material de estudio, a través de una investigación en la que se obtiene el ADN del interior de ánforas griegas (Foley, Hansson, Kourkoumelis, & Theodoulou, 2012). En este último trabajo vemos como los investigadores consiguen recuperar material genético a partir de ánforas griegas encontradas en navíos comerciales naufragados. Los resultados

permitieron evidenciar, no solo la posibilidad de extraer esta información incluso de recipientes vacíos, sino también que estos contenían una variedad de productos mayor a la estimada (que se ceñía fundamentalmente al vino).

Todo esto nos sirve de ejemplo de lo dicho anteriormente, y es que la genética es un campo que día a día ofrece respuestas y posibilidades de investigación nuevas en múltiples ramas del conocimiento, lo que la convierte en una herramienta que, al igual que en otras disciplinas, está ganando cada vez más presencia en el campo de la arqueología y la historia.

ADN y ADN_a

Pasamos ahora a hablar de la materia prima por excelencia de todos los estudios genéticos, el ADN. El ADN (ácido desoxirribonucleico) es una molécula presente en todos los organismos vivos y en la cual está contenida toda la información que heredará un individuo de sus progenitores (García-Díez & Zapata, 2013). La unidad, desde el punto de vista químico, de esta macromolécula, es el nucleótido, el cual está formado a su vez por un glúcido llamado desoxirribosa, un grupo fosfato y una base nitrogenada, que puede ser de cuatro tipos (adenina, guanina, timina y citosina) que se combinan entre sí y cuya disposición da lugar a la secuencia genética, que determina a su vez la información que contiene, los genes.

Entendemos por genes a las zonas del ADN que codifican una proteína concreta y que se encuentran por duplicado (a través de la estructura helicoidal que conecta dos hebras antiparalelas) en el material genético. No obstante, el ADN no está compuesto de una larga secuencia de genes contiguos unos a otros, de hecho, la mayor parte de este está formado por largas regiones de material no codificante (es decir, que no se usan para sintetizar ninguna proteína). El ADN de cada célula se comprime hasta formar los cromosomas, lo que hace que de una longitud de unos 2 metros se vuelva lo suficientemente compacto como para permanecer en el interior del núcleo celular.

La síntesis de las proteínas se produce mediante la creación de un ARNm (molécula conocida como ácido ribonucleico mensajero, que está formada por una sola cadena) que lleva la información del ADN (mediante la transcripción¹) a los orgánulos celulares responsables de la creación de las proteínas, los ribosomas.

¹ Proceso mediante el cual se crea la cadena de ARNm copiando la información genética del ADN gracias a la acción de una enzima llamada ARN polimerasa.

Por su parte, el ADN_a (que hace referencia al ADN antiguo) es el material genético extraído de muestras orgánicas del pasado, y gracias al cual podemos conocer información sobre estos organismos (que en muchos casos están extintos). El poder recuperar este ADN preservado en restos fósiles antiquísimos ha permitido abrir nuevos enfoques en diversos campos de la investigación, como la arqueología, la paleontología o la antropología.

A pesar de todas las posibilidades que hemos dicho que ofrece el uso de ADN_a para la investigación de seres vivos del pasado, hemos de tener en cuenta que también entraña una gran dificultad, lo que hace que su recuperación y aprovechamiento no pueda llevarse a cabo. Entre estos problemas hay que destacar la escasez de las muestras, la fragmentación de las mismas, las modificaciones moleculares que hayan podido darse, la existencia de inhibidores de PCR y desde luego la contaminación de las muestras (de estas dificultades hablaremos con detalle más adelante).

ADN_n y ADN_{mt}

En este apartado hablaremos de dos tipos de ADN que son de gran importancia en los estudios de genética. Por tanto, desglosaremos sus características y los beneficios de cada uno de ellos.

El ADN_n (nuclear) se presenta como una cadena lineal en la que está representado tanto el material procedente de la herencia paterna como de la herencia materna (Hortolá, 2005). Este tipo de ADN se encuentra duplicado en todas las células somáticas² salvo en los eritrocitos maduros³ en el caso de los mamíferos (ya que a lo largo de su desarrollo pierden el núcleo celular que contiene este ADN). Estas dos copias son idénticas y como ya apuntábamos anteriormente, son el resultado de la unión del material genético de ambos progenitores. Por otro lado, en las células sexuales (óvulos y espermatozoides) hay una sola copia⁴, y estas se recombinarán para dar lugar al genotipo individual de esa descendencia.

² Célula somática es toda aquella célula del organismo salvo las destinadas a la reproducción, es decir, óvulos y espermatozoides.

³ Los eritrocitos son lo que comúnmente conocemos como glóbulos rojos y son los encargados de transportar el oxígeno dentro del torrente sanguíneo.

⁴ Se utiliza la fórmula $2n$ para hablar de células en las que el material genético está duplicado y n para hablar de las que solo presentan una copia ($n =$ copia de ADN).

En ese ADN, solo una pequeña parte corresponde a los cromosomas⁵ sexuales (que indican el sexo del individuo, XX para las hembras y XY para los machos), y estos cromosomas solo se transmitirán de madres a hijas y de padres a hijos.

Algo parecido a lo mencionado anteriormente con los cromosomas sexuales (especialmente el cromosoma Y ya que es el único que nos permite seguir la línea paterna) ocurre con el ADNmt (mitocondrial). Para empezar a hablar del ADNmt es importante decir cuál es la función de la mitocondria. La mitocondria es el orgánulo celular responsable de la respiración celular, proceso mediante el cual las células animales consiguen la energía para funcionar.

El ADNmt se encuentra en la matriz mitocondrial y tiene forma circular (Hortolá, 2005). Una de las características más destacadas de cara a los estudios de reconstrucción genética de poblaciones es el hecho de que todo el ADNmt procede de la línea materna⁶, lo cual, sumado a su mayor tasa de preservación, hace que se recurra a él para este tipo de investigaciones. Lo que hace que tengamos más posibilidades de recuperar el ADNmt que el ADNn es muy sencilla. Las células cuentan con un número de mitocondrias que puede ir desde unas 10 hasta 10.000, y dentro de cada una de ellas encontramos entre 2 y 10 copias de ADNmt. Por el contrario, cada célula tiene un único núcleo que contiene dos copias de ADNn.

Esto supone una gran diferencia a la hora de recuperar el material contenido en cada uno de los dos tipos de ADN. No obstante, el gran inconveniente para su uso es la limitación que supone el contar solo con la información de la línea materna, convirtiéndolo en un marcador genético (término del que hablaremos a continuación) que solo nos proporciona datos de la mitad de la ascendencia.

Marcadores genéticos

Los marcadores genéticos son zonas del material genético en las que al acumularse las mutaciones se puede extraer gran cantidad de información (Goyache, Ramírez, Capote, & Amills, 2016). Se utilizan marcadores que no estén implicados en la asignación de ningún carácter hereditario (lo que hace que su presencia no esté condicionada por la selección natural). A la hora de determinar la eficacia de un marcador genético se buscan

⁵ Se trata de estructuras hechas de ADN súper compactado que se construyen en varias fases mediante las cuales el ADN va ocupando un espacio cada vez más pequeño.

⁶ La explicación para esto es que las mitocondrias presentes en el cigoto (célula resultante de la unión del espermatozoide y el óvulo) vienen del óvulo, ya que en el espermatozoide las mitocondrias se encuentran en el flagelo, que es el elemento motor del gameto masculino, y este no entra en el gameto femenino.

tres características: alto polimorfismo, herencia codominante⁷, que sea fácil de encontrar y se pueda reproducir en un gran número de laboratorios.

Un alto grado de polimorfismo (o variabilidad) hace posible establecer diferencias entre los individuos y las poblaciones, lo cual lo hace crucial para detectar regiones de procedencia además de la variedad dentro de esos grupos. La herencia codominante permite ver los caracteres transmitidos a la descendencia y ver que alelos se heredan de manera más frecuente en diferentes regiones. Por último, los dos aspectos finales encierran cuestiones técnicas, y lo que buscan es que los estudios puedan realizarse de la manera más eficaz y universal posible.

Gen y mutación

Otro concepto tan fundamental como complejo por su variedad es el de gen. Podemos diferenciar cuatro acepciones posibles según la disciplina en la que nos estemos moviendo (Hortolá, 2005, pág. 49). Si lo definimos desde la biología molecular, gen equivaldría a un fragmento del ADN que codifica una proteína y las características de su síntesis. La genética mendeliana definiría gen como una parte de los cromosomas que determinan los rasgos que se heredan. Por otro lado, la biología de poblaciones nos dice que los genes son las diferencias mediante las cuales distinguimos a los individuos dentro de su población. Por último, la biología evolutiva define gen como los vestigios de las transformaciones que los seres vivos han experimentado a lo largo de su desarrollo como especie.

En lo que respecta al término mutación, podría ser definido en dos niveles de profundización. En primer lugar, entendemos que mutación es la variación o cambio de una estructura, por lo que asociado a la genética hará referencia a cambios en el material genético, que en este caso debe tener un carácter permanente y heredable. Si tratamos de ser más precisos, debemos dividir los tipos de mutación en tres (Hortolá, 2005, pág. 49), las mutaciones cromosómicas, las genómicas y las génicas.

Las mutaciones cromosómicas suponen variaciones en la estructura de los cromosomas, y pueden dar varios resultados posibles (falta de un fragmento del cromosoma o duplicación de este, o también cambios en la ordenación de esos fragmentos). Las mutaciones genómicas, en cambio, son alteraciones en la dotación cromosómica que

⁷ Se da herencia codominante cuando ninguno de los caracteres se impone sobre el otro, de manera que ambos se manifestarán (un ejemplo es el grupo sanguíneo AB, en el que A y B se manifiestan conjuntamente).

pueden deberse a una división incorrecta durante alguna de las fases de la meiosis⁸ (dando como resultado que los individuos sean $4n$ o $3n$). Para finalizar, las mutaciones génicas son aquellas que realmente generan cambios en la estructura del ADN. Algunas formas mediante las cuales se manifiestan este tipo de mutaciones son: con variaciones en las bases nitrogenadas (esto es, que se sitúa una guanina (G) donde debería ir una timina (T)), ausencia de una de estas (sin que sea sustituida, por lo que queda un *gap*⁹).

Especie y población

El término especie en biología hace referencia (Codes Valcarce & Espino Nuño, 2003), dentro de los seres vivos con reproducción sexual, a aquellos grupos dentro de los cuales es posible la reproducción y en los que sus integrantes rara vez son capaces de tener descendencia con los miembros de otros grupos. Taxonómicamente las especies se agrupan por cercanía genética en géneros y se ramifican en subespecies¹⁰.

Por otro lado, entendemos como población, desde un punto de vista genético a las comunidades de una misma especie entre las cuales es posible un intercambio de genes (Codes Valcarce & Espino Nuño, 2003). Esta posibilidad no viene dada (como en el caso del concepto especie) por una afinidad genética, sino por el hecho de ocupar un mismo territorio. De esta manera, si entre dos grupos de la misma especie existe un accidente geográfico que imposibilita el contacto entre ellos estamos ante dos poblaciones. Esto supone que los miembros de una misma población tendrán un grado de parentesco variable, aunque superior al que tienen con otras poblaciones. Esto permite hacer un estudio de la evolución de esa población, ya que mientras los individuos mueren, esa carga genética que tienen en común los miembros de la población perdura (salvo casos como veíamos anteriormente de mutaciones).

Conservación del material genético

Como ya adelantamos anteriormente, un aspecto fundamental, y por tanto merecedor de un desarrollo particular, es la conservación del ADN. Como ya mencionamos en el capítulo anterior, las principales causas que dificultan la recuperación del ADN son: la

⁸ Es el proceso mediante el cual se unen dos gametos para dar como resultado un nuevo individuo (reproducción sexual), mientras que la mitosis sería la que se da cuando se divide una célula $2n$ (reproducción asexual).

⁹ Del inglés “hueco” o “espacio”.

¹⁰ Se trata de un grupo de individuos de una especie que genéticamente puede diferenciarse pero que continúa siendo capaz de engendrar descendencia fértil con el resto de los grupos de la misma especie.

degradación (que se puede presentar de múltiples formas), la contaminación y la presencia de inhibidores.

Debido a este tipo de alteraciones, los elementos que podemos utilizar para el estudio del ADN son los huesos y los dientes. Esto se debe a que su composición los hace resistentes a alteraciones físicas y químicas, pero no invulnerables. Para entender cómo se deterioran, es importante saber también las características que permiten que estos restos en determinadas condiciones puedan mantener material genético que servirá para llevar a cabo los estudios pertinentes (Calderón Ordóñez, 2017).

En primer lugar, tenemos los dientes, el tejido más duro del cuerpo. Esta propiedad se la confiere la presencia de un material que recubre la estructura dentaria conocida como esmalte. Además, resultan ser una muy buena elección por estar protegido por tejidos calcificados que forman la dentina. Dentro de esta capa se encuentra la pulpa dentaria, el material más empleado para realizar estudios genéticos por su gran cantidad y su baja tasa de afección por contaminantes. Estas características lo hacen que los dientes sean el material prioritario para los estudios relacionados con la química de los huesos (no solo genética, sino también dataciones y composición química e isotópica).

El otro gran aportador de ADN sería el material óseo, que está compuesto fundamentalmente de proteínas y minerales. Estos dos componentes mayoritarios están dispuestos de manera que lo mineral provee a lo proteico de una cobertura ante ataques enzimáticos u otros elementos que pongan en peligro su integridad. Por tanto, el mantenimiento de estas estructuras en el mejor estado posible está directamente relacionado con la supervivencia del ADN de los huesos (Saiz, Álvarez Cubero, Martínez González, Álvarez, & Lorente, 2012).

Degradación

El ADN que se encuentra en las células vivas cuenta con procesos de reparación que mantienen la integridad de este. No obstante, una vez que el organismo muere, esos mecanismos se detienen, dejando la preservación del material genético completamente expuesta a los factores del medio.

Entre estos factores debemos destacar aspectos de carácter tafonómico, tales como el pH del sedimento, la humedad o la temperatura (así como las variaciones en estas variables, que son igualmente nocivas) (Saiz, Álvarez Cubero, Martínez González, Álvarez, & Lorente, 2012). El daño producido por la temperatura puede venir por dos vías. Por una

parte, las altas temperaturas hacen que los agentes responsables de la degradación del ADN se intensifiquen, acelerando indirectamente su destrucción. Además de esto, las variaciones de temperatura generan fragmentaciones en las moléculas orgánicas, algo que puede ser muy problemático en algunas regiones, como en el Próximo Oriente, donde las fluctuaciones son muy violentas.

Esto ha sido estudiado por un equipo de la Universidad de Mainz (Bollongino & Vigne, 2008), que analizó la variación térmica de las muestras orgánicas antes, durante y después de la excavación. Para ello se utilizaron muestras de varios yacimientos neolíticos y preneolíticos de esta región.

Los métodos empleados para la excavación y extracción de las muestras son los convencionales para la preservación del material genético, por lo que no nos centraremos en ello. Lo novedoso de este trabajo viene en las técnicas empleadas para medir la temperatura de los restos en todas las fases de trabajo. En primer lugar, el cálculo de la temperatura antes de la excavación tuvo que ser obtenido mediante estimaciones, para lo cual se utilizó la fórmula de Hillel (Bollongino & Vigne, 2008):

$$T(z, t) = T_a + \left(A_0 e^{-\frac{z}{d}} \right) \sin \left[\frac{2\pi(t - t_0)}{365} - \frac{z}{d} - \frac{\pi}{2} \right]$$

En esta fórmula se hace uso de variables como la “Temperatura promedio del suelo” (T_a), la “Amplitud anual de la temperatura de la superficie” (A_0 , que mide la diferencia entre la temperatura máxima y la mínima durante un periodo de un año) o la “Profundidad de amortiguación” (d). Con esta fórmula es posible aproximarse a la temperatura a la que han estado sometidos los materiales en una franja de tiempo dada por las necesidades de los investigadores y la cantidad de datos de los que se disponga.

Para el resto de las temperaturas se usaron termómetros digitales (con un grado de error de $\pm 0,1$ °C) que permitían medir tanto la temperatura del aire como la del interior del hueso, gracias a un pequeño sensor que se introducía dentro de este).

A pesar de que los resultados finales no pudieron demostrar de manera eficiente la relación entre los cambios de temperatura y el deterioro del material genético, vemos por trabajos como éste la importancia que este factor tiene desde el punto de vista de los estudios moleculares. Lo que sí nos ha permitido es saber cuáles son las fases del trabajo de campo y de laboratorio en la que se producen los cambios más dramáticos de temperatura, lo cual sirve para tener la precaución debida más allá de conocer

exactamente la incidencia que tienen (de estos pasos hablaremos en el capítulo de “Métodos usados para el análisis de ADN”).

Una consecuencia de lo mencionado es que con frecuencia las muestras de ADN nos llegan fragmentadas (mediante ruptura de las cadenas de ADN), algo que se incrementa conforme pasa el tiempo. Esta ruptura puede producirse por la actuación de microorganismos o la presencia después de la muerte de las células de enzimas (nucleasas¹¹) que destruyen esa estructura. Otra causa de degradación son las conocidas como modificaciones moleculares, entre las cuales destacaremos las lesiones hidrolíticas, lesiones por oxidación y los crosslinks de ADN (Calderón Ordóñez, 2017).

Dentro de las lesiones hidrolíticas, una de las más frecuentes es la de desaminación¹², lo que produce una sustitución de bases nitrogenadas que afecta a la estructura del ADN (sustituyendo una citosina por una timina y una adenina por una guanina (González Fortes, Grandal D’Anglade, Vidal Romaní, & Hofreiter, 2017)). Esta desaminación es especialmente sensible en los extremos (3’ y 5’) de la cadena, ya que están más expuestos a las afecciones al estar en los bordes de esta.

En cuanto a las lesiones por oxidación vemos que pueden llegar a producir bloqueos a la acción de la polimerasa¹³, lo cual puede generar secuencias erróneas o directamente interrumpir la amplificación. Por último, el *crosslink* (enlace cruzado) se da cuando un polímero (en este caso el ácido desoxirribonucleico) se une a otro por un enlace químico, algo que produce, al igual que en el caso contrario, la detención del proceso de amplificación.

Otro procedimiento que ha causado controversia en cuanto a la degradación que puede producir en el ADN es el uso de rayos X. Los rayos X son muy empleados en bioarqueología, y se consideró durante mucho tiempo que se trataba de una técnica no invasiva, algo que es cierto si atendemos únicamente al plano macroscópico y microscópico. No obstante, lo que sucede a nivel molecular es una cuestión que hasta hace unas décadas era una completa incógnita.

Sería en 1995 cuando en la Universidad de Estocolmo (Götherström, Fischer, Linden, & Liden, 1995) se analizaron, mediante la radiación diferencial, distintas muestras de cerdos

¹¹ Se encargan de destruir los enlaces fosfodiéster que mantienen unidas las moléculas de desoxirribosa (en el ADN) y ribosa (en el ARN).

¹² Se trata de una pérdida (mediante un proceso de hidrólisis en este caso) del grupo amino NH₂.

¹³ Enzima responsable de la transcripción y replicación de los ácidos nucleicos.

modernos (una muestra sin radiar, otra con radiación baja y otra con radiación más alta), para ver cómo se afectaban las moléculas. Concluye que el uso de rayos X es nocivo para la preservación del ADN, ya que, si es perjudicial para muestras modernas, cuyo grado de conservación es mucho mejor que el del ADN_a, también se debe prescindir de su uso para muestras antiguas.

No obstante, esto ha sido rebatido por trabajos como el realizado por la Universidad de California (Fehren Schmitz, y otros, 2016), en los que se usan muestras antiguas (prehistóricas e históricas) para comprobar ese impacto. Los resultados de este trabajo sentencian que el uso de rayos X no está relacionado con la degradación del ADN_a, y que lo que usó Götherström como base de su argumentación, es realmente su mayor debilidad. Esto quiere decir que mientras las cadenas de ADN de las muestras modernas (como las que usó Götherström) son largas, las del ADN_a son de menor longitud debido a la fragmentación, y esta característica las hace menos vulnerables a las afecciones por rayos X.

Todos los procesos descritos no son exclusivos, es decir, pueden darse de manera conjunta alterando la composición interna de la molécula de ADN hasta el punto de hacer que la recuperación de la información que esta contiene sea imposible.

Contaminación

Otro gran problema con el que se encuentran los investigadores que trabajan con muestras de ADN_a es la contaminación de las muestras, algo que es especialmente sensible cuando se trata de ADN humano (Calderón Ordóñez, 2017).

A esta cuestión se le han dedicado gran cantidad de trabajos y de tiempo, tanto en el análisis teórico como en su aplicación práctica, ya que del buen hacer en este sentido dependerá que los resultados provenientes de estos estudios sean fiables o no. Esto se debe a que el ADN de los propios investigadores puede suponer una fuente de contaminación para las muestras, además de los instrumentos que se utilizan, que pueden contribuir también si no son esterilizados correctamente.

Se han dedicado también muchos esfuerzos para determinar el grado de profundidad que alcanza esta contaminación en los restos, encontrando discrepancias entre los que afirman que su capacidad de penetración es poca y los que dicen que el ADN exógeno¹⁴ consigue

¹⁴ En contraposición al endógeno, que sería el propio de la muestra.

impregnar el interior de las muestras. En este proceso uno de los grandes inconvenientes es a la vez una de las grandes revoluciones de la genética moderna, la técnica de PCR (de la que hablaremos en profundidad más adelante), que sirve para amplificar el ADN que se encuentra en secuencias cortas.

El PCR es un método de gran precisión, lo que hace que cualquier contaminación, por mínima que sea, se amplifique, más teniendo en cuenta que las contaminaciones serían de ADN moderno (mejor conservado que el ADN_a), por lo que se priorizaría la amplificación de este. Trataremos con detalle los pasos en los que se produce, y las causas fundamentales, de la contaminación, así como las formas de prevención de las mismas en un capítulo especialmente dedicado a ello.

Inhibidores

Otro de los grandes problemas en el estudio de muestras de ADN_a son los conocidos como inhibidores de la PCR. Estos inhibidores son sustancias que interrumpen la acción de la polimerasa que actúa durante este proceso, impidiendo que la amplificación pueda llevarse a cabo.

Entre estos inhibidores encontramos los taninos¹⁵, ácidos húmicos¹⁶, ácidos fúlvicos¹⁷ y productos de Maillard. Los tres primeros son elementos que se encuentran asociados a procesos de degradación del suelo, lo que hace que sea probable su presencia en muestras orgánicas que llevan bajo tierra durante mucho tiempo. El daño que estos compuestos hacen a la hora de la amplificación es interferir en la acción de la polimerasa, a diferencia de los productos de Maillard, que lo que hacen es provocar *crosslinks* que de manera indirecta provocan que la polimerasa no pueda actuar.

Métodos usados para el análisis de ADN

Un problema al que se tienen que enfrentar con frecuencia los investigadores en los laboratorios de genómica es el trabajar con muestras afectadas por algunos o varios de los procesos mencionados en el capítulo anterior. Por ello, es importante conocer muy bien los procedimientos, tanto en el trabajo de campo (para reducir en la medida de lo

¹⁵ Se trata de un compuesto presente en semillas, corteza madera y demás partes de las plantas.

¹⁶ Son sustancias presentes en el humus (compuesto que resulta de la descomposición de materia orgánica).

¹⁷ Al igual que los anteriores son compuestos que resultan de la degradación de la materia orgánica y nitrogenada.

posible los perjuicios que haya sufrido la muestra a lo largo de la formación del yacimiento) como posteriormente en el propio laboratorio.

Procedimientos y prevención de la contaminación y degradación

Con todo lo dicho hasta ahora, ha quedado claro que las medidas para mantener en el mejor estado posible el ADN deben comenzar en la propia intervención arqueológica. Es en este momento donde se dan muchos de los procesos que afectan a la estructura de las muestras debido a los cambios en las condiciones de las mismas.

Uno de estos cambios, que además ya ha sido mencionado en este trabajo, es el de las circunstancias térmicas. Como vemos en el trabajo de la Universidad de Mainz sobre la incidencia de las variaciones en la temperatura (Bollongino & Vigne, 2008), está demostrado que, en las diferentes etapas de la intervención arqueológica, se producen grandes alteraciones en la temperatura (extracción del material del sedimento, durante el lavado del mismo o incluso en el momento de tomar la muestra del ADN). Las franjas más altas de temperatura (que alcanzan entre los 40-50 °C) se dan cuando el material está expuesto en la superficie y cuando se almacena en bolsas de plástico. No obstante, el paso que genera un mayor impacto desde el punto de vista del estrés por una fluctuación en la temperatura se da cuando se limpia el hueso con agua (que equivale a un cambio de 11.000 °C/h).

El deterioro causado tanto por estas variaciones en la temperatura como por otros muchos factores (variaciones o condiciones extremas de pH y las variaciones o condiciones extremas de humedad que favorezcan la proliferación de microorganismos dañinos para los restos, son algunos de los elementos que afectan al ADN), son un problema debido a que las cantidades de ADN en condiciones óptimas para la amplificación disminuyen. Sin embargo, esta reducción de las muestras entraña un problema más, y es que cuanto mayor sea el deterioro de la muestra antigua, más probabilidad hay de que las contaminaciones modernas se den y afecten a los resultados.

Las fuentes de contaminación se pueden dar en muchos pasos del proceso de investigación, desde el trabajo de campo hasta la extracción y amplificación en el laboratorio, e incluso después. El primer momento de peligro, obviando el deterioro y la predisposición que este genera hacia la contaminación, viene con la excavación y almacenamiento de los restos. En esta fase pueden producirse aportaciones de ADN

moderno de los propios trabajadores (mediante el sudor) o de restos que pueda transportar el agua con la que se lavan los huesos.

Posteriormente, en el momento de la extracción y la amplificación, debemos dar por hecho la presencia del ADN en todo el laboratorio (por aportación de las personas que trabajan allí), tanto en el ambiente como en las herramientas (incluso las que no se han estrenado), lo que convierte en una medida fundamental esterilizar todo antes de utilizarlo. En el caso de que se detectara contaminación de ADN exógeno en los controles que se realizan antes de iniciarse la PCR, la muestra será desechada y se tomará otra del mismo individuo.

Por último, están las fuentes de contaminación denominadas de arrastre, que hacen referencia a la incorporación de ADN de otras muestras procesadas (amplificaciones o clonaciones) en un laboratorio (Calderón Ordóñez, 2017). Esto es fácil de entender ya que sabemos que cuando una reacción de PCR sale bien, podemos estar hablando de concentraciones de ADN de más de 10^{12} - 10^{15} moléculas por cada 50 μ l. Esto hace que procesos tan cotidianos y necesarios como el abrir los recipientes o cambiar los compuestos de envases hace que se disperse gran cantidad de copias.

Esta dispersión puede llevar a que se extiendan estas moléculas por laboratorios, plantas e incluso por edificios enteros (simplemente por los desplazamientos del personal o los sistemas de ventilación). Esta contaminación, aunque pudiera parecer ínfima, resulta muy perjudicial si tenemos en cuenta que cantidades absurdamente pequeñas del líquido en el que se encuentran esas copias de ADN (de unos 0,005 μ l), pueden contener más ADN que una muestra de 1 g de material orgánico antiguo, haciendo así que los datos reflejen el material exógeno.

Todo esto demuestra la necesidad de establecer protocolos en los que se tengan preparadas las medidas de protección antes incluso de que el material sea expuesto. Estas medidas tienen que incluir¹⁸, para un mantenimiento adecuado de la temperatura: una rápida extracción de los materiales, guardarlo en bolsas estériles (individuales para cada una de las muestras) y en lugares con temperaturas relativamente bajas y en ambientes secos y oscuros (y en el caso de que no se den estas condiciones, tener habilitadas zonas

¹⁸ Utilizaremos un supuesto en el que las muestras a extraer son de origen humano, ya que este es el caso en el que más precauciones se deben tener debido a la posibilidad de contaminación con ADN moderno del personal que lo está extrayendo.

en las que enterrar las muestras a una profundidad suficiente como para aislarlas del calor). Hay que trabajar siempre con materiales que protejan los restos de la aportación de ADN externo (guantes, batas y mascarillas), esterilizar las herramientas con lejía y la no reutilización de los guantes entre el tratamiento de una muestra y otra. Para mayor seguridad, las muestras para estudios de ADN se deben tomar por duplicado y realizarse estudios de comprobación en laboratorios independientes para minimizar el falseamiento de los resultados (Calderón Ordóñez, 2017).

Además, es importante tomar muestras de control, tanto del sedimento en el que se encontraban los restos estudiados (ya que pueden producirse contaminaciones desde el propio suelo), como de los investigadores que hayan manipulado los restos (en caso de ser restos humanos), ya que de esta manera se podrán controlar las posibles fuentes de contaminación.

Incluso cuando las muestras llegan al laboratorio, es necesario continuar con controles para prevenir la contaminación de los materiales de estudio. Los métodos que existen para la reducción de la contaminación son varios, empezando por la limpieza de las superficies de las muestras (para lo cual se utilizan métodos químicos como el hipoclorito de sodio o el ácido clorhídrico, o físicos, como la abrasión de la superficie para eliminar los contaminantes). Otra opción es la estimación de las formas en las que las moléculas se fragmentan, para así poder diferenciar entre el ADN antiguo y el moderno (Calderón Ordóñez, 2017).

Para la prevención de la contaminación por arrastre, la principal vía es la separación física de los laboratorios. A esto debe sumarse que los itinerarios que llevan a cabo los investigadores deben ser en un solo sentido. Esto significa que, si dividimos las estancias en las que se realizan las distintas fases del proceso en “zona de extracción”, “zona pre-PCR” y “zona post-PCR”, este debe ser el orden en el que los trabajadores circulen.

Selección del material de estudio y extracción de ADN

Una vez llegados a este punto, es necesario saber cómo seleccionar una muestra correctamente para aumentar las posibilidades de obtener resultados óptimos (Saiz, Álvarez Cubero, Martínez González, Álvarez, & Lorente, 2012). En primer lugar, es importante entender que la densidad ósea está estrechamente vinculada con la supervivencia del hueso, y por tanto con la del propio ADN. Por tanto, es necesario saber que esta densidad no es igual en todos los huesos (lo cual establece un orden de

prioridades que se establece en función de la mayor o menor posibilidad de recuperar material genético en buen estado de esas muestras (*Fig. 1*). Incluso en los propios huesos encontramos zonas que se conservan mejor que otras, siendo preferible tomar las muestras en las regiones medias de estos.

Como hemos mencionado anteriormente y que se puede ver también en la figura anterior, los dientes son una de las mejores muestras que se pueden tomar para recuperar el ADN. No obstante, a la hora de seleccionarlos, se debe previamente hacer una revisión de sus condiciones de integridad, evitando fisuras, caries o desgastes que hacen que la protección del esmalte, que confiere al diente de su condición de favorito, se pierda.

En el caso de los restos óseos, además de primar los huesos largos (como los de las piernas o los brazos) para muestrear, es necesario hacer un análisis macroscópico (si bien es verdad que es difícil predecir la conservación del ADN a estos niveles), en los que se busca un hueso sin fisuras en la cortical, que no muestre signos de acción de microorganismos que pongan en peligro su integridad o que presente una buena densidad.

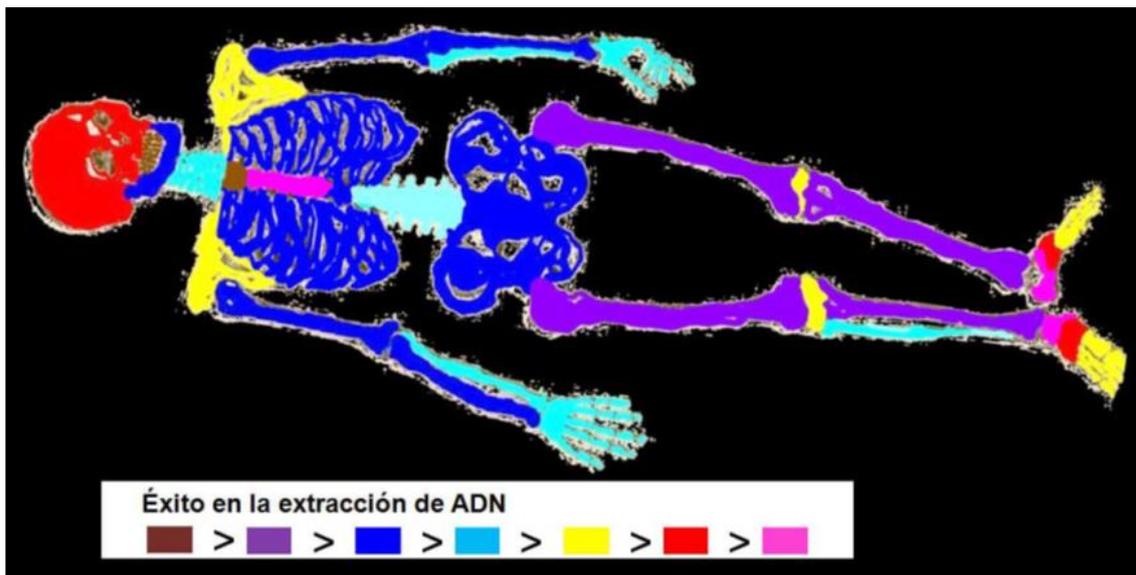


Figura 1 Esquema en el que se muestran las posibilidades comparadas de éxito en cada hueso. Imagen tomada de María Saiz et al. 2012.

Una vez cumplidos de la mejor manera posible estos requisitos, la forma de actuar en el paso siguiente dependerá de si la muestra escogida es diente o hueso. En el caso de los dientes, le limpiará su superficie mediante el uso de lejía y luz UV (cuyo objetivo es eliminar de la superficie del diente de cualquier tipo de agente contaminante). Después se llevará a cabo un corte a la altura del cuello del diente para extraer de la pulpa el material genético. En cambio, si se trata de un hueso, se buscará una porción de unos 2 cm² que muestre signos de buena conservación, la cual será limpiada mediante abrasión

para obtener la muestra, que luego se reducirá a un polvo sumamente fino, y de este se obtendrá el ADN (García-Díez & Zapata, 2013).

Para extraer de estos restos el material genético se procede luego a la descalcificación de la muestra, y después a la ruptura de las membranas celulares (lisis) mediante la aplicación de un tampón¹⁹ de lisis. Después se obtiene la materia orgánica mediante el protocolo de extracción con fenol-cloroformo (que permite conseguir el ADN sin proteínas ni enzimas que puedan afectar al material genético o a los procesos que se realizarán más adelante). Por último, antes de pasar a la PCR, se purificará y concentrará el resultado de la extracción con fenol-cloroformo para que la proporción de moléculas de ADN en la disolución aumente (Calderón Ordóñez, 2017).

Como ya hemos dicho, los restos duros del cuerpo (dientes y huesos) son los más recomendables debido a su perdurabilidad física y capacidad de mantener el material genético en buenas condiciones. No obstante, existen otras fuentes de obtención de ADN, aunque menos utilizadas (Calderón Ordóñez, 2017).

Una de ellas son los tejidos blandos del cuerpo, los cuales si se encuentran disecados pueden conservar el material genético debido a que se suprimen algunos procesos de descomposición como la hidrólisis (de la que ya hablamos en capítulos anteriores). No obstante, incluso cuando se toman muestras de tejido no superficial (por estar este más expuesto), las afecciones a las que están sometidos este tipo de muestras hacen que sean difíciles de amplificar.

También se puede recuperar ADN del material queratinoso (pelo, uñas, cuernos o plumas) y quitinoso (presente en el exoesqueleto de los artrópodos o en las paredes celulares de los hongos). Recientemente han pasado a ser una fuente muy popular de material genético, y entre sus características vemos algunas ventajas sobre otras muestras, como el hecho de que las impurezas son más fáciles de eliminar.

La obtención del ADN de las estructuras queratinosas se hace mediante la ruptura de estas, algo que se consigue con la aplicación de algunos compuestos (como el dodecilsulfato sódico o el ditiotreitól). Una vez hecho esto, el siguiente paso sería la purificación del ADN a través del uso de sílica²⁰ o disolventes orgánicos e isopropanol

¹⁹ Un tampón es una sustancia que se encarga de mantener equilibrado el pH en una disolución.

²⁰ Se trata de una síntesis del dióxido de silicio que debido a su gran porosidad se utiliza para eliminar la humedad en algunos ambientes.

(que se usa como antiséptico²¹). A pesar de tener algunas desventajas, el uso de pelo como material queratinoso podría ser una muy buena opción, ya que incluso en los casos en los que las muestras recuperadas están deterioradas, presentan una gran resistencia a la contaminación de ADN exógeno.

También encontramos, entre las muestras potenciales de extracción de ADN, los coprolitos (excrementos de animales antiguos). Estos coprolitos suponen una fuente muy interesante de material orgánico, ya que de ellos podemos recuperar tanto el ADN del responsable de la deposición como de los organismos presentes en su dieta. Este tipo de muestras requieren un procedimiento en el que se compense la necesidad de obtener muestras de ADN suficientes con la eliminación de agentes que puedan actuar como inhibidores en la PCR (Calderón Ordóñez, 2017).

Una fuente de recuperación de ADN que mencionábamos en la introducción de este trabajo por su carácter novedoso, es el sedimento. Especialmente en arqueología o paleontología, las muestras con las que se trabaja proceden de intervenciones en yacimientos arqueológicos. La gran mayoría del material que se extrae de un yacimiento es sedimento (vulgarmente llamado tierra), pero no es hasta hace muy poco tiempo que este resto ha empezado a mirarse como un objeto más de estudio y no solo la matriz en la que se encuentran insertos los materiales “auténticos”.

El sedimento ha demostrado ser un buen portador y conservador de ADN que procede de plantas, hongos y animales en determinados medios (áridos, templados, tropicales y árticos). No obstante, los productos de los que hablábamos anteriormente y que actuaban como inhibidores de la PCR (como los ácidos húmicos o fúlvicos) pueden estar presentes y afectar el proceso de amplificación. Es por ello que se requiere de una purificación concienzuda de ese sedimento para evitar la presencia de estos agentes en el momento de la PCR (Calderón Ordóñez, 2017).

Otro problema con el que nos encontramos a la hora de utilizar el sedimento para recuperar muestras de ADN, es la dispersión de este a lo largo del registro. Esto hace que se tenga que buscar un equilibrio entre una cantidad lo suficientemente grande como para que la prueba sea positiva (es decir, que haya posibilidades de encontrar ADN en la muestra tomada), pero que su tamaño no haga que se abarque un periodo de tiempo muy amplio (ya que los eventos deposicionales y la formación del suelo se producen a ritmos

²¹ Que sirve para la eliminación de agentes microbianos.

variables y es necesario prestar atención a este aspecto para tomar la muestra). Además, también es importante, al igual que en el caso anterior, procurar tomar muestras que contengan la menor cantidad posible de inhibidores.

Por último, otro material que nos ofrece un gran rendimiento desde el punto de vista de los estudios de ADN, son las cáscaras de huevo. El ADN en este material se mantiene protegido por la calcita, que evita la contaminación por ADN exógeno. Además de esto, la cáscara de huevo es una estructura que conserva el ADN en una amplia variedad de ambientes y durante mucho tiempo, lo cual multiplica las posibilidades de recuperar ese material genético.

Técnicas de laboratorio

Este apartado está destinado a explicar las técnicas que se llevan a cabo en los laboratorios. Algunas de ellas ya han sido mencionadas a lo largo del trabajo, como la reacción de PCR, pero existen otros procesos que se desarrollan y que tienen diferentes fines en el estudio y comprensión del genoma.

PCR

Llega el momento de explicar la sumamente conocida y repetida en este trabajo reacción de PCR (*Polymerase Chain Reaction* o Reacción en Cadena de la Polimerasa), la cual es una de las grandes revoluciones en los estudios de genética de los últimos tiempos. Hasta su conceptualización en 1983 por Kary Mullis, la obtención de múltiples copias a partir de unas pocas se conseguía a través de la clonación (de la que hablaremos más adelante). No obstante, este proceso requería mucho tiempo y medios, algo que lo dificultaba. La reacción de PCR permitía conseguir lo mismo en menos tiempo y usando un tubo de ensayo.

Una explicación somera de este proceso requiere nombrar una serie de compuestos que son necesarios para poder ponerla en marcha. Entre estos compuestos encontramos (Pierce, 2006):

- 1) Muestra de ADN: molécula de ADN que se pretende amplificar²².
- 2) ADN polimerasa: se trata de una enzima que consigue la replicación de las cadenas de ADN.
- 3) Nucleótidos: se introducen también los nucleótidos con las cuatro bases nitrogenadas (G, C, A y T) que dan lugar a todas las combinaciones en el ADN.

²² Obtener múltiples copias a partir de unas pocas.

- 4) **Cebadores:** cadenas cortas de ADN (de 17 a 25 nucleótidos) que delimitan el fragmento de ADN que se quiera amplificar. Este elemento es esencial en los estudios de genética de poblaciones, en los que interesa amplificar solo algunas regiones de ADN en las que se encuentran genes concretos.
- 5) **Tampón:** sustancia que mantiene las condiciones de la disolución estable en diferentes parámetros (pH o salinidad).

Con la combinación de estos compuestos y la ayuda de cambios en algunas de las condiciones (como la temperatura) para que estos reaccionen de la manera que deseamos, somos capaces de poner en marcha la reacción de PCR. Los pasos que la componen (que podemos ver en la Fig. 2) serían (Pierce, 2006):

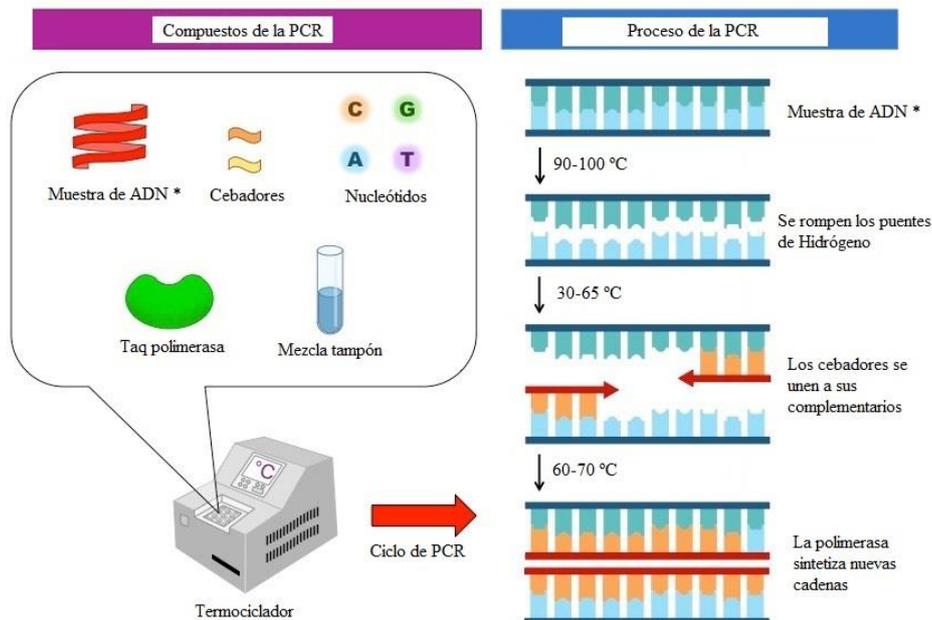


Figura 2 Explicación de los compuestos y pasos que componen una reacción de PCR. Imagen tomada de <http://blogs.baylor.edu/cili-cure-spring2017/2017/04/30/lab-13-posters-and-pcr-3/> y modificada por Emilio Vacas Fumero.

- 1) **Desnaturalización de la cadena:** esto se hace elevando la temperatura de la disolución a unos 90 o 100 °C, consiguiendo que de la cadena de ADN bicatenaria obtengas dos cadenas monocatenarias (gracias a la ruptura de los puentes de Hidrógeno).
- 2) **Complementación de los cebadores:** en este paso se bajará la temperatura (30-65 °C) durante un tiempo lo suficientemente corto como para que las dos cadenas no vuelvan a unirse, pero suficiente como para que los cebadores se unan a sus complementarios y delimiten la secuencia que será amplificada.

- 3) Catalización de la ADN polimerasa: por último, la temperatura vuelve a incrementarse (60-70 °C) para que la enzima ADN polimerasa pueda actuar y utilice los nucleótidos presentes en la disolución para cubrir los huecos de la cadena delimitada por los cebadores.

Este proceso se llevará a cabo dentro de un termociclador que se encargará de someter la muestra a la temperatura requerida mientras gira en un tambor que rotará a un número determinado de revoluciones por minuto (rpm).

Preamplificación inespecífica

La preamplificación inespecífica es un método que podría ayudar a mejorar las condiciones de degradación de las muestras antes del inicio de la reacción de PCR. La preamplificación inespecífica fue usada por investigadores de la Wayne State University (Golenberg, Bickel, & Weihs, 1996) para comprobar la posibilidad de recuperar la integridad de ADN muy deteriorado, para lo cual crearon ellos mismos esas condiciones degradando artificialmente el material genético y luego volviéndolo a unir. Para este segundo paso se sometió a la muestra a un proceso de PCR inespecífico (sin el uso de cebadores para delimitar el fragmento de interés).

No obstante, el deterioro que se puede dar en una cadena de ADN intencionalmente fragmentada no es el mismo que se da de manera natural con el paso del tiempo. Por tanto, en otros trabajos, como el realizado en la tesis de Lourdes Prieto Solla (Prieto Solla, 2002), se pretende repetir este experimento con muestras óseas que hayan sufrido unas condiciones parecidas a las de un hueso enterrado durante décadas o centurias. Para ello estableció varios modelos con procesos de degradación distintos y de ellos seleccionó para la prueba el que mayor grado de destrucción presentaba (aquellos que den resultados negativos en los exámenes pre-PCR).

Una vez seleccionada la muestra ideal, se llevó a cabo este ciclo de PCR inespecífico, que se repitió varias veces. El resultado final del experimento mostró que tras someter las muestras que en un principio no daban resultados a la preamplificación se logran identificar los rasgos genéticos deseados, lo cual demuestra que es una prueba que efectivamente podría ayudar a reparar ADN que se encontrara en condiciones inadecuadas para la reacción de PCR.

Clonación

Como ya hemos mencionado anteriormente, la clonación era el único medio que se tenía, antes de la PCR, para aumentar la cantidad de moléculas con las que se contaba de ADN. Este método consiste en introducir en el ADN bacteriano la secuencia de ADN que queramos replicar, de manera que cuando la bacteria se reproduzca, el fragmento de ADN que hemos incluido en su material genético se transmitirá a los nuevos individuos, teniendo así más copias de este (Pierce, 2006).

El principal inconveniente por tanto es que, si el único objetivo es obtener más ejemplares de ese fragmento de ADN, debemos esperar al proceso de crecimiento y reproducción de cada una de las bacterias, y esto se debe repetir un número suficientemente elevado de veces como para tener la cantidad deseada de copias.

Este tiempo de maduración hizo que la PCR fuera mucho más eficiente, tanto desde el punto de vista técnico como temporal. No obstante, la clonación nos puede ofrecer información de otro tipo, ya que muestra, al ser fruto de procesos de creación de nuevos individuos, los cambios que puede sufrir el fragmento debido a las mutaciones que se dan de manera natural, que se pueden diferenciar (algo que ya en sí mismo da información) de las contaminaciones o degradaciones propias del ADN.

Mapa genético

El mapa genético es una herramienta que permite localizar genes dentro del paquete cromosómico, de manera que estos pueden aislarse y estudiarse de manera concreta. Esto ofrece a los investigadores la posibilidad de encontrar enfermedades hereditarias y ver cómo se comportan a la hora de pasar la carga genética y sus manifestaciones (Pierce, 2006).

En primer lugar, es importante entender dos conceptos. El primero de ellos sería el de recombinación. La recombinación sería el proceso mediante el cual una cadena de ADN se fragmenta para unirse con una cadena distinta, algo que pasa durante la reproducción sexual en el momento de unión de los gametos para dar lugar a un nuevo individuo. Por tanto, la herencia recombinante sería fruto de la unión de las hebras de ADN aportadas por los progenitores. En contraposición a la herencia recombinante estaría la herencia parental, que es la que se da sin necesidad de recombinación (se puede dar en la meiosis y en la mitosis).

La elaboración de un mapa genético se basa en la realización en el laboratorio de cruzamientos de cromosomas y ver como se transmiten. Cuanto mayor sea el porcentaje de transmisiones mediante el proceso de recombinación (máximo 50%²³), mayor será la distancia entre esos genes. Por otro lado, si la proporción de recombinaciones de dos genes es muy baja significa que están muy cerca y su transmisión no es por recombinación, sino por herencia parental (es decir, se transmiten de manera asociada).

Genoteca

Una genoteca es una forma de almacenar todo el material genético de una especie. Consiste en clonar distintos fragmentos de ADN (por ejemplo, humano) en bacterias, de manera que se genere una colonia de bacterias que en conjunto guardan todo el ADN de la especie humana (Pierce, 2006).

Su realización es simple desde el punto de vista teórico (más después de haber aclarado la idea de clonación). Se coge todo el genoma de una especie y se fragmenta en secuencias lo suficientemente pequeñas como para clonaras en el ADN bacteriano. Una vez clonado todo el genoma humano, habremos creado una colonia de bacterias que contienen todo el ADN de nuestra especie.

Aplicaciones del ADN en arqueología sobre restos faunísticos

Pasamos por fin a describir el uso que se hace de los estudios genéticos en un caso concreto dentro de la arqueología, el de los restos de animales. Presentaremos los casos en los que este tipo de investigaciones pueden aportar información relevante para la reconstrucción del contexto histórico y cuáles pueden ser esos datos.

Para ello dividiremos este capítulo en diferentes temas para los cuales puede ser de ayuda contar con análisis genéticos apoyándonos en artículos en los que se presentan las aplicaciones que los distintos investigadores han hecho de estas técnicas.

Identificación de especies

Al igual que vemos en las series policíacas o de médicos, en las que a partir de una pequeña muestra de un individuo se puede identificar quién es mediante comparación, bien con una muestra de un familiar o bien con una muestra de ese mismo individuo guardada en una base de datos, se puede hacer lo mismo con la identificación de especies animales.

²³ El hecho de la proporción máxima que se puede dar es del 50% se debe a que la probabilidad de heredar un gen de uno de tus progenitores es de mitad y mitad.

Es necesario para ello conocer o tener muestras contrastadas de esa misma especie para lograr una determinación certera de la identidad de la muestra, y en caso de no tenerla, esta puede ser aproximada a través de la vinculación que tenga su material genético con el de otras especies emparentadas.

Por tanto, para poder iniciar estudios en los que se pretenda determinar la procedencia de unos restos, es necesario contar con los resultados que los estudios previos han dado, así como de los análisis de ADN que se hacen a organismos vivos, que permiten tener nociones sobre el origen de dicha muestra y usarlos como guía para los estudios sobre fósiles.

Es evidente que el empleo del estudio de ADN para analizar todas las muestras biológicas que se obtienen del registro arqueológico es algo inviable, ya que por todo lo que hemos visto anteriormente que necesitan este tipo de procesos resultaría extremadamente costoso y además no resultaría de gran utilidad en un gran número de casos. Por este motivo es fundamental ajustar los métodos empleados a las necesidades de la investigación.

Un ejemplo de esto lo vemos en los estudios histológicos²⁴ (Greenlee & Dunnell, 2010), que permiten una aproximación más precisa que los tradicionales análisis morfológicos, especialmente cuando estos son inviables debido al estado de fragmentación de los huesos. Si tuviéramos que establecer una tabla de prioridad de métodos, el primero que se pondría sería el análisis morfológico macroscópico, en segundo lugar vendrían los estudios microscópicos (como el histológico, ya que requieren infraestructuras más complejas y suponen un gasto mayor) y por último los análisis moleculares, dentro de los cuales estaría el del ADN.

No obstante, es evidente que hay casos en los que el grado de precisión que se requiere es tan alto que no es suficiente con los métodos microscópicos, teniendo que usar obligatoriamente estudios moleculares para responder a las preguntas planteadas.

Un ejemplo de este tipo de preguntas es la determinación del sexo de los restos faunísticos encontrados. Esta cuestión, aunque pueda parecer que no aporta nada al discurso histórico que se desarrolla sobre una comunidad, es muy importante para identificar algunos comportamientos tales como los métodos de caza, la gestión que hacían del ganado o de

²⁴ La histología es la disciplina que se encarga del estudio de los tejidos orgánicos, permitiendo establecer diferencias a través de dichas estructuras.

rituales. El estudio realizado por la *University of York* y la *Simon Fraser University* (Speller & Yang, 2016) trataba de comprender mejor la utilización que se hacía del pavo (*Meleagris gallopavo*), en la región sur oeste de los Estados Unidos durante la época anterior al contacto europeo.

En especies con un marcado dimorfismo sexual, como puede ser el caso del pavo (en el que los machos presentan por norma un mayor tamaño que las hembras), es normalmente más recomendable el uso de técnicas morfométricas, especialmente para el estudio de huesos largos bien conservados de un amplio número de individuos. Sin embargo, cuando la muestra de la que se dispone es escasa o incluye restos fragmentados o de individuos juveniles, el uso de estudios de ADN se vuelve necesario.

Otro caso sería cuando se requiere de una precisión taxonómica muy elevada debido a las diferencias que existen en los comportamientos de distintas especies dentro de un mismo género, como ocurre en el caso del género *Oncorhynchus*, que engloba truchas y salmones. En el estudio realizado por M. L. Moss (Moss, Judd, & Kemp, 2014), se busca diferenciar entre las vértebras de los *Oncorhynchus* presentes en múltiples registros arqueológicos del Pacífico Norte.

El método morfométrico utilizado hasta el momento permitía un grado de acierto en cuanto a la diferenciación de especies en torno a un 57%, lo cual requería una aproximación más certera. Esto se debe a que la presencia de cada una de las especies de anádromos²⁵ está condicionada tanto por la acción, antrópica (que ha afectado a estas poblaciones desde la antigüedad), como por los cambios en las características medioambientales.

Los análisis de ADN se dividieron en dos grupos de 28 muestras cada uno, permitiendo identificar el 68% de las especies del primer grupo y el 64% de las del segundo, lo cual nos habla de un estado de conservación relativamente bueno de las mismas. La aplicación de este tipo de técnicas podría permitir una mejor comprensión de las actividades pesqueras de las poblaciones estudiadas, así como del medio al que se enfrentaban, solo a través de la determinación de la especie a la que pertenecen los restos encontrados.

Algunas técnicas están buscando dar solución a los problemas inherentes a los análisis moleculares (como su elevado coste, lo cual hace que no puedan ser empleados con

²⁵ Anádromos, en contraposición a catádromos, son los peces que van desde el mar hasta la parte superior de los ríos para desovar.

frecuencia). Una de ellas es la denominada *bulk-bone metabarcoding* (Murray, y otros, 2013) (Grealy, y otros, 2016), en la que con un esfuerzo relativamente bajo se están consiguiendo sorprendentes resultados. Con esta técnica se consigue, mediante el tratamiento de los cúmulos de huesos inidentificables como una única muestra (haciendo separaciones en funciones de las UE²⁶), identificar taxones distintos dentro de ese conjunto. Este tipo de técnicas han permitido disponer de una gran cantidad de información de elementos como el sedimento o los coprolitos.

Evaluación de otras técnicas

Como ya hemos tratado en el apartado anterior, existen métodos de análisis del registro faunístico que no requieren de los estudios de ADN. El más empleado de estos es sin duda el análisis morfométrico, que se basa en unas dimensiones medias establecidas para los huesos de cada especie. No obstante, este tipo de aproximaciones métricas suelen contar, para el caso de especies antiguas, con datos de referencia proporcionados por los individuos actuales de las mismas especies.

Esto significa que parten de una serie de premisas que tienen que ser contrastadas, como que dichas especies no han sufrido alteraciones morfológicas a lo largo de los años. Un estudio realizado por un equipo japonés (Eda, Baba, Koike, & Higuchi, 2006) tomaba en cuenta estas cuestiones partiendo de una idea contraria a las que sustentan este tipo de métodos, ya que consideran que si por ejemplo en el caso de varios mamíferos terrestres, se ha apreciado una variación considerable del tamaño debido a microevoluciones o a la plasticidad fenotípica²⁷, esta puede afectar también a otros tipos de animales.

Por tanto, se pretende conseguir una estimación de la variación que ha sufrido a lo largo del tiempo una serie de especies de aves. Para ello, fueron tomadas muestras iguales (del mismo hueso) de ejemplares modernos de tres especies de albatros procedentes de distintos museos, y de la misma manera se consiguieron restos antiguos (también tomando el mismo hueso) de albatros arqueológicos, datados en unos mil años.

El estudio concluyó que, con algunas diferencias en cuanto a la efectividad del método morfométrico para diferenciar entre unas especies que en otras, la aproximación que se

²⁶ Unidades estratigráficas

²⁷ En genética, hemos de diferenciar entre “genotipo” (conjunto de genes) y “fenotipo” (que sería el conjunto de rasgos que se manifiestan). Los rasgos no son transmitidos directamente, sino que se hacen a través de los genes, que mediante su interacción con factores ambientales dan lugar a los rasgos. Es decir, el fenotipo equivale al genotipo más el ambiente. Por tanto, la variabilidad del ambiente da lugar a una multitud de posibles fenotipos para un mismo genotipo, dando lugar a la plasticidad fenotípica.

consigue para el caso de la distinción de tipos de albatros es bastante buena. También podemos hacer referencia al estudio de la *University of York* (Martínez Lira & Corona M., 2016), en el que se quería comprobar si los métodos que se estaban utilizando para diferenciar las especies era fiable. Sobre las implicaciones de este trabajo hablaremos en apartados posteriores.

Algo parecido pasa con las técnicas utilizadas para la determinación del sexo de los restos faunísticos, ya que, como vimos anteriormente, este dato es de suma importancia para entender las características de la explotación animal. En un estudio de la Uppsala University (Svensson, Götherström, & Vretemark, 2008) se buscaba corroborar la capacidad del método morfométrico para dilucidar las diferencias sexuales dentro del ganado.

Para ello se tomaron 26 muestras al azar de huesos largos de ganado pertenecientes a un yacimiento medieval del siglo XIII. De estas muestras, cuatro no habían preservado material genético, lo que las hizo inútiles para este estudio. No obstante, el cien por cien de las muestras de las que si se extrajo ADN permitieron la identificación sexual, coincidiendo esta con los resultados del análisis osteológico.

En definitiva, el contar con una técnica que ofrece resultados tan precisos (siempre que las muestras se conserven en óptimas condiciones) y que utiliza elementos objetivos (es decir, no sujetos a la interpretación de los investigadores como el tamaño o la forma) permite respaldar las conclusiones a las que se llega a través de otros métodos.

Patologías

El campo del conocimiento de la salud de las poblaciones del pasado es también una de las grandes vías de investigación que ofrecen los análisis moleculares, teniendo un lugar destacado el estudio de las patologías que padecían las poblaciones del pasado, dando especial información el estudio de los parásitos. El contar con un mejor conocimiento de los ciclos y comportamientos, así como la identificación de dichos parásitos permitiría construir un escenario muy aproximado de los hábitos y la salud de las comunidades en las que están presentes (Côté & Bailly, 2017).

Las primeras extracciones de ADN procedente de parásitos se realizaron en el año 2001, con dos estudios llevados a cabo por distintos equipos. El primero de ellos (Loreille,

Roumat, Verneau, Bouchet, & Hänni, 2001) utilizó los restos de huevos de helmintos²⁸ encontrados en unos coprolitos de un yacimiento medieval de Bélgica (*Places d'Armes*) escogido por sus excelentes condiciones de conservación. Para este estudio se hidrató el coprolito y luego se recolectaron 104 huevos de parásito intestinal con la intención de identificar su especie (o en caso de ser varias, la cantidad de especies presentes en la muestra). En este caso, no se pudo extraer con claridad la información relacionada con el parásito al que pertenecían dichos huevos, pero los resultados conseguidos permitían concluir que se trataba de una única especie (es decir, que no había una mezcla de varios tipos distintos de helmintos) del género *Ascaris*.

En el segundo caso (Madden, 2001) se utilizan momias como objeto de estudio. Estas momias proceden de la zona del desierto de Atacama, una región que debido a su alto grado de desertización y su intensa sequedad (con una pluviosidad sumamente escasa), se dan procesos de momificación natural que conservan la materia orgánica. El objetivo es identificar la *Trypanosoma cruzi*, un protista²⁹ que es responsable de la “Enfermedad de Chagas”. Este protista, que resulta muy complicado de identificar a través de análisis anatómicos o microscópicos, puede ser determinado mediante estudios moleculares gracias a la presencia de varios miles de copias de un minicírculo³⁰ de ADN 1433-nucleótido³¹.

Se tomaron muestras de diversas momias tratando de localizar restos del material genético de la *T. cruzi*. Los resultados confirmaron la presencia del protista en la mayoría de los casos, demostrando además la posibilidad de recuperar información de fragmentos muy cortos de las cadenas de ADN.

No obstante, este tipo de trabajos han ido haciéndose más comunes en los últimos años, siendo a día de hoy numerosos los estudios que han conseguido la recuperación de ADN procedente de patógenos. Estudios más modernos (Shin, y otros, 2013) han logrado identificar, a partir de los restos de sedimento adheridos al hueso de la cadera de una momia coreana del siglo XVII la presencia de huevos del parásito *Clonorchis sinensis*.

²⁸ Grupo de parásitos con características morfológicas similares a los anélidos (comúnmente conocidos como gusanos).

²⁹ Uno de los cinco reinos en los que se dividen los seres vivos. Los protistas son eucariotas (que tienen núcleo verdadero) y se asocian a ambientes húmedos, tanto marinos como con presencia de agua o en el interior de otros organismos.

³⁰ Se trata de unas pequeñas estructuras circulares de pequeño tamaño que se encuentran en grandes cantidades en los cinetoplastos (mitocondrias asociadas al movimiento de los flagelos de los cinetoplastos).

³¹ Esta fórmula hace referencia al número de nucleótidos que componen esta cadena de ADN.

Estos, pese a ser determinados a partir de análisis microscópicos, también permitieron la extracción de material genético que posibilitó su reconocimiento de manera unilateral (gracias a una coincidencia del cien por cien con el material genético moderno de este mismo patógeno).

Sin embargo, también puede confirmarse la presencia de algunas bacterias gracias a los análisis genéticos, algunas de ellas responsables de enfermedades tan conocidas como la lepra (*Mycobacterium leprae*). Determinar, mediante este tipo de estudios, la presencia de dicha bacteria fue el objetivo del trabajo de la *Academy of Sciences of the Czech Republic* (Likovsky', Urbanova, Hájek, Cerny', & Cech, 2006). Para ello tomaron como sujetos de estudio dos esqueletos, datados entre la segunda mitad del siglo XI y principios del XII, encontrados en un cementerio de Bohemia. Estos esqueletos presentaban claros signos de haber padecido la enfermedad de la lepra, que fue un mal frecuente durante la Edad Media.

El estado de conservación y preservación de ambos cuerpos marcó la diferencia en cuanto a los resultados que uno y otro ofrecieron. En el primer caso, estaban presentes la gran mayoría de las piezas del esqueleto, algo que no pasaba con el segundo, que carecía tanto del cráneo como de bastantes huesos del lado izquierdo (fémur, tibia, peroné, y todas las costillas de ese lado entre otros). En cuanto a los resultados del análisis molecular, una vez más fue el primer esqueleto el que respondió mejor, dando claros pruebas de la presencia de la bacteria (algo que también presentaba el segundo sujeto pero con evidencias mucho más frágiles).

Reconstrucción del contexto faunístico (doméstico o salvaje)

El aumento de la capacidad de los estudios de ADN para establecer las relaciones filogenéticas entre diversas especies (gracias a la mayor acumulación de información genética almacenada en bases de datos accesibles) ha permitido desarrollar investigaciones que permitan ver la evolución de esas especies, algo que ayuda a reconstruir el contexto natural de un entorno del pasado mediante los restos faunísticos del registro arqueológico (Haile, Larson, Owens, Dobney, & Shapiro, 2010).

Con esto se puede además ver especies que han estado vinculadas a los seres humanos, tanto animales domesticados como animales oportunistas que fueron adaptando sus ciclos y costumbres a los comportamientos de los *Homo sapiens sapiens* para aprovechar sus excedentes. No obstante, para hacer uso de este tipo de información, es necesario contar

con una base de datos de material genético muy amplia, que abarque un gran número de taxones, y además que esa información esté asociada a elementos característicos de una región (que permitan determinar la procedencia de esas muestras) (Haile, Larson, Owens, Dobney, & Shapiro, 2010).

Una prueba de ello es el estudio realizado por el Doctor James Haile (Haile, Larson, Owens, Dobney, & Shapiro, 2010), en el cual se logró identificar la procedencia de los cerdos encontrados en el registro de dos yacimientos de una pequeña isla cercana a Australia. Se trata de la isla *Lord Howe Island*, ubicada en el mar de Tasmania, en la que se dio un rápido proceso de ocupación después de su descubrimiento a finales del siglo XVIII, convirtiéndose en un enclave comercial y de abastecimiento para las actividades desarrolladas en la zona.

Los resultados demostraron que entre el primer y el segundo caso (diferenciados por unas cuantas décadas) el origen genético de los cerdos cambiaba, siendo de procedencia europea el cien por cien de los primeros mientras que los segundos provenían del este de Asia.

Otro ejemplo, realizado además en una zona relativamente cercana, fue el estudio llevado a cabo por C. L. Oskam (Oskam, y otros, 2011). En este caso, nos encontramos ante un yacimiento neozelandés del siglo XIII, en el cual se encontraron numerosos fragmentos de huevo de la familia moa (extinta). Estos se hallaban junto a una estructura de combustión (concretamente un horno de tierra), lo cual hacía que una parte de las muestras tomadas no pudieran ser aprovechadas para el análisis de ADN debido a la termoalteración.

No obstante, a partir de los resultados obtenidos se pudieron identificar tres especies distintas de esta familia, además de la cantidad de estos, permitiendo obtener porcentajes de la presencia de cada una de las especies.

Aparición o desaparición de especies

Sin duda, el surgimiento o pérdida de alguna especie en el hábitat de alguna comunidad humana es un hito destacable, más aún si esta se debe a la participación directa de la mano de los seres humanos a través de presión por el aprovechamiento de los recursos o por la domesticación de alguna especie, algo que genera cambios con respecto a sus primos no domésticos.



Figura 3 Diferencias entre *Gallus gallus* (izquierda) y *Gallus gallus domesticus*. Imágenes tomadas de https://es.wikipedia.org/wiki/Gallus_gallus#/media/File:Gallus_gallus_female_-_Kaeng_Krachan.jpg y https://es.wikipedia.org/wiki/Gallus_gallus_domesticus#/media/File:Coq_orpington_fauve.JPG y modificadas por Emilio Vacas Fumero.

El artículo de J. L. Cardoso (Cardoso, Vilstrup, Eisenmann, & Orlando, 2013) muestra un ejemplo de la llegada de una nueva especie a un contexto geográfico concreto, en este caso, la Península Ibérica. Hablamos de una nueva especie de equino que vino a incorporarse a la variedad de este género en la Península, la cual se mantenía así desde el Pleistoceno.

El descubrimiento de unos dientes en el yacimiento de Leceia (en Portugal) y su posterior estudio genético permitió confirmar que se trataba de una especie distinta a las dos que se encontraban anteriormente en el territorio, encuadrando el momento a partir de datación radiocarbónica en el Calcolítico peninsular. Estos resultados vinieron además a contradecir la fecha que se atribuía a la aparición de esta especie (*E. asinus*), vinculada a la llegada de los fenicios a principios del primer milenio (más de mil años antes de lo que este estudio demuestra).

También relacionado con los caballos está el siguiente estudio (Cai, y otros, 2009), en el que se pretende determinar la aparición de los primeros caballos domésticos en China. Las muestras fueron tomadas de restos antiguos de caballos de diferentes yacimientos cuyas cronologías iban del 4000 al 2000. Los resultados mostraron una gran variabilidad y número en los haplogrupos que estos caballos presentaban. Para ello se hizo uso de la línea materna, utilizando el ya mencionado ADNmt.

Un dato interesante es que el porcentaje en el que estos aparecen no es homogéneo, siendo predominantes en la actualidad los haplogrupos A y F, coincidiendo con los datos extraídos de las muestras más antiguas de esta investigación. Esto parece indicar que los primeros caballos en ser domesticados en China eran de estos haplogrupos, y este proceso se dio antes del año 4000, y a partir de entonces se fueron introduciendo nuevos haplogrupos en el territorio.

En el siguiente caso (Soubrier, y otros, 2016), el objetivo de los investigadores es la reconstrucción de uno de los pocos ejemplos de megafauna que se conserva desde finales del Pleistoceno, el bisonte europeo. Se centraron en definir como apareció dicha especie, de la que se conoce poco (en cuanto a su llegada) para periodos anteriores al inicio del Holoceno.

La conclusión a la que llegaron fue que el bisonte europeo que conocemos en la actualidad fue fruto de la unión de dos especies de bóvidos pleistocénicos (el bisonte de las estepas, *Bison priscus*, y el ancestro de las especies que componen actualmente el ganado, *Bos primigenius*) hace más de 120.000 años. Con esto se podría llevar a cabo una estimación de los movimientos de ambas especies (ya que en este periodo se produjo un cruce de ellas) y por tanto de los grupos humanos que se asociaran a ellas.

Continuando con los bóvidos, pasamos a un artículo en el que se buscaba recuperar ADN, pero esta vez en ejemplares procedentes de la India (Singh, Joglekar, & Koziol, 2011). Esto, como hemos visto en apartados anteriores, supone un significativo incremento de la probabilidad de no conseguir resultados positivos en la extracción del material genético debido a la destrucción a causa del calor ambiente.

Tal es la dificultad de recuperar material para realizar análisis genéticos en este tipo de regiones que este fue el primer caso en el que la recuperación fue exitosa (se recuperó parte del ADNmt de tres de las cinco muestras que se tomaron, datadas entre el 2000 a.C. y el 1000 d.C.), permitiendo aportar posibles datos sobre el proceso de domesticación del *Bos indicus*.

Un caso parecido es el del dingo (*Canis lupus dingo*), un tipo de perro propio de Australia cuyo origen es desconocido. Para resolver los problemas propios de los estudios previos que se habían realizado en torno a la búsqueda de dingos en el contexto arqueológico, los cuales no son tan apropiadamente identificados mediante los tradicionales métodos morfométricos.

En este artículo (Fillios & Taçon, 2016) se critica la ausencia de estudios moleculares de dingos arqueológicos, considerando necesario ese tipo de análisis, ya que a partir de los dingos modernos (que han pasado por un largo periodo de contacto con múltiples razas de perro llevadas en tiempos modernos a Australia) no se puede identificar correctamente una línea filogenética (ya que se diluye entre los haplogrupos traídos por todas las subespecies de perro que han arribado a las costas de Oceanía).

Esta reconstrucción, se puede hacer también mediante elementos indirectos, como podría ser la dieta. Una forma de aproximarnos a esta cuestión es a través del material fecal fósil, conocido como coprolito. Esto se demuestra en el estudio del paleoecologista J. R. Wood (Wood, Crown, Cole, & Wilmshurst, 2016), en el que combinando análisis microscópicos y de ADN consigue recrear la dieta del kuri, un tipo de perro característico de Nueva Zelanda que fue llevado allí por los primeros colonizadores hace casi un milenio.

El estudio vino a demostrar que la alimentación del kuri era bastante similar a la de dichos pobladores de la isla, lo cual habla de un tipo de comportamiento y vinculación muy concreto entre dicha especie y los seres humanos, además de aportar o reforzar la información que se tenía de los recursos de la región en esa época.

Evolución o desarrollo de las especies

La evolución o desarrollo de las especies es un tema que ha sido tangencialmente tratado en algunos de los ejemplos expuestos en los apartados anteriores (Cai, y otros, 2009) (Soubrier, y otros, 2016), sin embargo, ya que es una de las grandes posibilidades que ofrecen los estudios genéticos, es necesario dedicarle un tratamiento específico.

El estudio que se encarga tanto de describir los orígenes como el desarrollo y la relación que hay entre unas especies y otras es la filogenia, y dentro de los procesos que dan lugar a que estas variaciones se den, está, como ya hemos indicado, la acción antrópica. Por este y otros motivos es muy importante tener nociones de cómo han sido los cambios que han tenido las especies vinculadas a las comunidades humanas, ya que forman parte de estas.

En el siguiente estudio de la *University of California* y la *American University in Cairo* (Kurushima, Ikram, Knudsen, Bleiberg, & Grahn, 2012), los investigadores llevan a cabo un amplio estudio sobre los restos momificados de gatos encontrados en tumbas egipcias, algo que se ve en gran cantidad entre los años 664 y 332 a.C. (desde comienzos del Periodo Tardío hasta la llegada de Alejandro Magno).

Entre las respuestas a las que se dan posibles respuestas en este trabajo, está la del desarrollo de los gatos de Egipto, demostrándose que los gatos de los que se tomaron muestras para este análisis comparten material genético con los gatos contemporáneos que pueden encontrarse hoy en este país y en la región del Medio Oriente.

Además, lograron inferir que los gatos momificados no eran gatos salvajes, sino domésticos (algo que puede resultar difícil de diferenciar si se trata de individuos

preadultos de gatos salvajes y adultos de gatos domésticos), así como situar esa domesticación entre 7.500 y 2.000 años antes de que los gatos fueran momificados (algo que, al volverlo a pasar a la cronología del Antiguo Egipto, nos sitúa desde antes la época predinástica hasta las primeras dinastías).

Otro animal que lleva vinculado a la especie humana desde tiempos muy remotos es el perro, tanto es así, que debido a las múltiples actividades en las que este puede beneficiar a los grupos humanos, ha sido trasladado por todo el mundo junto con las migraciones de nuestra especie.

El artículo realizado por investigadores de la *University of California* (Brown, Darwent, & Sacks, 2013) ha demostrado, tomando como objeto de estudio las especies de cánidos de la zona norte de América (Alaska y Groenlandia), que en el caso de las muestras antiguas de todo el territorio estudiado, y las modernas de Groenlandia, comparten un haplotipo concreto (el A31). No obstante, en la época posterior a la llegada de los europeos, este haplotipo se pierde (salvo en Groenlandia), lo cual se explica por la llegada de nuevos perros pertenecientes a distintos haplogrupos.

Actividades económicas

Además de todos los usos que hemos citado hasta aquí, es evidente que existe un campo transversal en el que todo lo extraído hasta el momento puede aportar su grano de arena, como es la economía. Teniendo una buena comprensión de los animales que se encuentran próximos al hábitat humana o el desarrollo que se sabe que estos han tenido por su mayor o menor vinculación con nuestra especie, obtenemos una gran información sobre el aprovechamiento que los distintos grupos humanos han hecho de los recursos.

Al habernos centrado anteriormente bastante en cuestiones de domesticación y ganadería, aquí trataremos más en profundidad las posibilidades que tiene el estudio del material genético de ofrecer datos del comercio. El primero de los casos nos lleva a Groenlandia nuevamente, esta vez a un asentamiento de época medieval conocido por que sus características ofrecen unas condiciones de conservación excelentes para la materia orgánica, “*The Farm Beneath the Sand*”³² (Sinding, Garrett Vieira, & Hayeur Smith, 2017). El nombre y su enorme capacidad para preservar los materiales se deben a una acumulación de grandes cantidades de arena y permafrost³³.

³² Cuya traducción es: “la granja bajo la arena”.

³³ Son masas de agua que se conservan sin sufrir cambios de estado en forma sólida.

En este trabajo los investigadores consiguen, a partir de unos restos de textiles muy bien conservados, extraer material genético, del cual consiguen saber que la composición de esta pieza no solo contiene restos de varias especies, sino que algunas, como la liebre ártica, es una especie exótica en el contexto en el que nos encontramos.

El siguiente artículo busca dar respuesta al hallazgo, fuera de su hábitat natural, a dos especies de pavo que coexistieron en Mesoamérica durante el Periodo Preclásico Medio³⁴ (Martínez Lira & Corona M., 2016). En primer lugar los investigadores tenían que confirmar lo que los estudios morfológicos decían sobre que en dicho registro coexistían dos especies (*Meleagris gallopavo* y *Meleagris ocellata*). Una vez conseguido esto, se vio que ambas especies se encontraban fuera de su medio natural, algo que fue explicado como resultado del comercio de una región y otra con los recursos característicos de cada una.

Por último, cambiamos de periodo y lugar para tratar una investigación llevada a cabo en el yacimiento romano y bizantino de *Sagalassos*, en Turquía. Allí se encontraron restos arqueológicos de bagre³⁵ (Arndt, y otros, 2003), del cual se puede diferenciar a través del estudio de los haplotipos, el lugar de procedencia. La extracción y secuenciación del ADN fue exitosa, y de ella se logró deducir que el lugar de procedencia de esta especie de pez era el Bajo Nilo.

Esto implica que a través del comercio llegaba el pez gato del Nilo hasta la actual Turquía, que si bien no se encuentra geográficamente muy alejado, si ofrece información de las rutas mercantiles que conectaban puntos concretos del levante del mar Mediterráneo.

Otros usos

A modo de cierre del apartado de las posibilidades que ofrecen los estudios genéticos al campo de la zooarqueología, añadiremos algunos casos concretos de investigaciones que a pesar de no entrar estrictamente en ninguno de los temas que hemos tratado a lo largo del mismo, merecen una mención, además de que permiten tener una idea más clara de lo potente que es esta herramienta.

El primer ejemplo supone un uso novedoso de la técnica por el objeto de estudio, que son los pergaminos (Pangallo, Chovanova, & Makova, 2010). El análisis pretendía determinar la procedencia animal de los doce pergaminos que se seleccionaron, consiguiendo

³⁴ Entre el 1200 a.C. y el 400 a.C.

³⁵ También conocido como siluro o pez gato.

resultados positivos y descubriendo una amplia variedad en las especies que se utilizaban para su elaboración (desde bóvidos hasta ovejas).

Para finalizar, mencionamos un tema que también tocamos anteriormente, aunque dentro de la reconstrucción del contexto faunístico. Se trata de la paleonutrición, que como apuntábamos antes (en artículos como el de J. R. Wood (Wood, Crown, Cole, & Wilmshurst, 2016)), puede suponer una gran fuente de conocimiento sobre el comportamiento de determinados colectivos humanos, usando por ejemplo las heces encontradas en el registro arqueológico.

Conclusión

En definitiva, podemos decir que los objetivos que se exponían en la introducción de este trabajo han sido cumplidos, ya que en este se ha podido seleccionar y presentar un amplio número de casos y situaciones en las que los estudios de ADN aplicados a muestras de fauna han sido efectivos para responder a diversas preguntas en el campo de la arqueología y de la historia, mostrando la eficacia y proyección de futuro que tienen.

Para finalizar, consideramos de interés, para dar cohesión a este trabajo, realizar una síntesis de las principales aplicaciones que tienen los estudios de ADN. Esto es importante debido a que es una técnica sumamente versátil y que, como ya hemos visto, sigue aumentando el rango de casos en los que se usa, tanto de manera experimental como para responder directamente a preguntas concretas.

Como hemos visto a lo largo del trabajo, la variedad de objetos sobre los que se puede aplicar este tipo de análisis está únicamente limitada a que dicho objeto contenga restos orgánicos. De esta manera, considero más fácil clasificar los tipos de materiales en tres categorías. En primer lugar serían aquellos restos que se producen de manera natural los seres vivos. Los más usados serían los huesos y los dientes, pero existen otras muchas alternativas, como pelo, cáscaras de huevo, exoesqueletos de invertebrados o incluso tejidos blandos (como piel) que se hayan conservado o excrementos (coprolitos).

El segundo grupo estaría formado por productos que, siendo elaborados por el ser humano, usan materias primas de origen orgánico, y por lo tanto se puede saber la procedencia de estas. Aquí encontraríamos productos textiles, herramientas de hueso (S. Sinding, y otros, 2016) o tintas.

El último grupo estaría integrado por todos aquellos materiales que han estado expuestos o en contacto con restos orgánicos, permitiendo que este se conserve, como puede ser el sedimento o recipientes, como las ánforas (que pueden mantener restos que nos den información sobre lo que contenían) o instrumentos que han servido para tratar productos orgánicos, como el despiece de animales (Shanks, y otros, 2005).

A partir de todos estos restos se pueden hacer reconstrucciones muy precisas del medio en el que vivían y las actividades que realizaban las poblaciones antiguas a partir del registro arqueológico, siempre que cumplan con las condiciones necesarias de conservación.

Dicho esto, es importante aclarar que los elementos que hemos descrito al principio de este trabajo que causan la degradación del material genético, pese a ser aspectos muy a tener en cuenta, su presencia no implica la destrucción total del ADN. Con esto queremos decir que si bien es cierto que los cambios en las condiciones ambientales (como la temperatura o el pH) o los casos extremos de las mismas deterioran el ADN, incluso se puede recuperar información genética de muestras expuestas a estos ataques.

Bibliografía

1. Álvarez Cubero, M., Martínez González, L., Saiz, M., Álvarez, J., & Lorente, J. (2010). Nuevas aplicaciones en identificación genética. *Cuaderno de Medicina Forense*, 16(1-2), 5-18.
2. Arndt, A., Van Neer, W., Hellemans, B., Robben, J., Volckaert, F., & Waelkens, M. (2003). Roman trade relationships at Sagalassos (Turkey) elucidated by ancient DNA of fish remains. *Journal of Archaeological Science*, 1095-1105.
3. Bollongino, R., & Vigne, J. (2008). Temperature monitoring in archaeological animal bone samples in the Near East arid area, before, during and after excavation. *Journal of Archaeological Science* (35), 873-881.
4. Brown, S., Darwent, C., & Sacks, B. (2013). Ancient DNA evidence for genetic continuity in arctic dogs. *Journal of Archaeological Science*, 1279-1288.
5. Buckley, M., Fraser, S., Herman, J., Melton, N., Mulville, J., & Pálisdóttir, A. (2014). Species identification of archaeological marine mammals using collagen fingerprinting. *Journal of Archaeological Science*(41), 631-641.
6. Cai, D., Tang, Z., Han, L., Speller, C., Yang, D., Ma, X., . . . Zhou, H. (2009). Ancient DNA provides new insights into the origin of the Chinese domestic horse. *Journal of Archaeological Science*, 835-842.
7. Calderón Ordóñez, A. (2017). *Estudio sobre ADN antiguo en restos arqueológicos desde una perspectiva histórica. El caso de las Islas Canarias*. San Cristóbal de La Laguna: Universidad de La Laguna.
8. Cardoso, J., Vilstrup, J., Eisenmann, V., & Orlando, L. (2013). First evidence of *Equus asinus* L. in the Chalcolithic disputes the Phoenicians as the first to introduce donkeys into the Iberian Peninsula. *Journal of Archaeological Science*, 4483-4490.
9. Codes Valcarce, R., & Espino Nuño, F. J. (2003). *Diccionario Akal de Términos Biológicos*. Madrid: Akal.
10. Côté, N. M., & Bailly, M. (2017). Palaeoparasitology and palaeogenetics: review and perspectives for the study of ancient human parasites. *Special Issue Reviews*, 1-9.
11. Descriptores en Ciencias de la Salud. (15 de Junio de 2018). *biblioteca virtual en salud*. Obtenido de biblioteca virtual en salud: http://decs.bvs.br/cgi-bin/wxis1660.exe/decserver/?IsisScript=../cgi-bin/decserver/decserver.xis&task=exact_term&previous_page=homepage&interface_language=e&search_language=e&search_exp=ADN%20de%20Cinetoplasto
12. Dobos, A. (2012). Reseña de Palenutrition, Mark Q. Sutton, Kristin D. Sobolik, Jill K. Gardner. *Journal of Archaeological Science*, 1913-1914.
13. Eda, M., Baba, Y., Koike, H., & Higuchi, H. (2006). Do temporal size differences influence species identification of archaeological albatross remains when using modern reference samples? *Journal of Archaeological Science* (33), 349-359.

14. Fehren Schmitz, L., Kapp, J., Ziegler, K., Harkins, K., Aronsen, G., & Conlogue, G. (2016). An investigation into the effects of X-ray on the recovery of ancient DNA from skeletal remains. *Journal of Archaeological Science*(76), 1-8.
15. Fillios, M., & Taçon, P. (2016). Who let the dogs in? A review of the recent genetic evidence for the introduction of the dingo to Australia and implications for themovement of people. *Journal of Archaeological Science: Reports*, 782-792.
16. Foley, B., Hansson, M., Kourkoumelis, D., & Theodoulou, T. (2012). Aspects of ancient Greek trade re-evaluated with amphora DNA evidence. *Journal of Archaeological Science*(39), 389-398.
17. García-Díez, M., & Zapata, L. (2013). *Métodos y técnicas de análisis y estudio en arqueología prehistórica*. Bilbao: Servicio Editorial de la Universidad del País Vasco.
18. Germonpré, M., Sablin, M., Després, V., Hofreiter, M., Láznicková-Galetová, M., Stevens, R., & Stiller, M. (2013). Palaeolithic dogs and the early domestication of the wolf: a reply to the comments of Crockford and Kuzmin (2012). *Journal of Archaeological Science*, 786-792.
19. Golenberg, E., Bickel, A., & Weihs, P. (1996). Effect of highly fragmented DNA on PCR. *Nucleic Acids Research*, 5026-5033.
20. González Fortes, G., Grandal D'Anglade, A., Vidal Romaní, J., & Hofreiter, M. (2017). Análisis Genético del Individuo de Chan do Lindeiro: Caracterización de su Mitogenoma y Situación de la Muestra en el Contexto Paleogenético Europeo. *Cadernos Lab. Xeolóxico de Laxe*, 111-128.
21. Götherström, A., Fischer, C., Linden, S., & Liden, K. (1995). X-raying ancient bone a destructive method in connection with DNA analysis. *Journal of Archeological Science*, 26-28.
22. Goyache, F., Ramírez, Ó., Capote, J., & Amills, M. (2016). *Una perspectiva genética sobre los orígenes del ganado canario*. Madrid: Mercurio Editorial.
23. Greal, A., Douglass, K., Haile, J., Bruwer, C., Gough, C., & Bunce, M. (2016). Tropical ancient DNA from bulk archaeological fish bone reveals the subsistence practices of a historic coastal community in southwest Madagascar. *Journal of Archaeological Science* (75), 82-88.
24. Greenlee, D., & Dunnell, R. (2010). Identification of fragmentary bone from the Pacific. *Journal of Archaeological Science*(37), 957-970.
25. Haile, J., Larson, G., Owens, K., Dobney, K., & Shapiro, B. (2010). Ancient DNA typing of archaeological pig remains corroborates historical records. *Journal of Archaeological Science*, 174-177.
26. Herrasti, L., Ríos, L., Pérez de la Iglesia, L., Baeta, M., Núñez, C., Martínez de Pancorbo, M., . . . Etxeberria, F. (2015). Exhumación, identificación y causa de muerte en 1936 de los restos humanos recuperados en la sima El Raso de Urbasa (Navarra). *Munibe Antropologia-Arkeologia*(66), 327-346.

27. Hortolá, P. (2005). Análisis genético y evolución humana. Métodos y técnicas. En *Homínidos. Las primeras ocupaciones del continente* (págs. 49-52). Barcelona: Ariel.
28. Kurushima, J., Ikram, S., Knudsen, J., Bleiberg, E., & Grahn, R. (2012). Cats of the pharaohs: genetic comparison of Egyptian cat mummies to their feline contemporaries. *Journal of Archaeological Science*, 3217-3223.
29. Leonard, J., Shanks, O., Hofreiter, M., Kreuz, E., Hodges, L., Ream, W., . . . Fleischer, R. (2007). Animal DNA in PCR reagents plagues ancient DNA research. *Journal of Archaeological Science*(34), 1361-1366.
30. Likovsky, J., Urbanova, M., Hájek, M., Cerný, V., & Cech, P. (2006). Two cases of leprosy from Zatec (Bohemia), dated to the turn of the 12th century and confirmed by DNA analysis for *Mycobacterium leprae*. *Journal of Archaeological Science*, 1276-1283.
31. Loreille, O., Roumat, E., Verneau, O., Bouchet, F., & Hänni, C. (2001). Ancient DNA from *Ascaris*: extraction amplification and sequences from eggs collected in coprolites. *International Journal for Parasitology*, 1101-1106.
32. Madden, M. S.-A. (2001). Hybridization screening of very short PCR products for paleoepidemiological studies of Chagas' disease. *Biotechniques*, 102-109.
33. Martínez Lira, P., & Corona M., E. (2016). Possible co-existence of two species of genus *Meleagris* at Monte Albán, Oaxaca. *Journal of Archaeological Science: Reports*(10), 632–639.
34. Merino Sabando, M. (2012). Genética de poblaciones. *Eikasía. Revista de Filosofía*(42), 105-114.
35. Moss, M., Judd, K., & Kemp, B. (2014). Can salmonids (*Oncorhynchus* spp.) be identified to species using vertebral morphometrics? A test using ancient DNA from Coffman Cove, Alaska. *Journal of Archaeological Science*, 879-889.
36. Murray, D., Haile, J., Dortch, J., White, N., Haouchar, D., Bellgard, M., . . . Bunce, M. (2013). Scrapheap Challenge: A novel bulk-bone metabarcoding method to investigate ancient DNA in faunal assemblages. *Scientific Reports*, 1-8.
37. Oskam, C., Jacomb, C., Allentoft, M., Walter, R., Scofield, R., Haile, J., . . . Bunce, M. (2011). Molecular and morphological analyses of avian eggshell excavated from a late thirteenth century earth oven. *Journal of Archaeological Science*, 2589-2595.
38. Pangallo, D., Chovanova, K., & Makova, A. (2010). Identification of animal skin of historical parchments by polymerase chain reaction (PCR)-based methods. *Journal of Archaeological Science*, 1202-1206.
39. Pierce, B. (2006). *Genética. Un enfoque conceptual*. Madrid: Editorial Médica Panamericana.
40. Pitt, J., Gillingham, P., Maltby, M., & Stewart, J. (2016). New perspectives on the ecology of early domestic fowl: An interdisciplinary approach. *Journal of Archaeological Science*, 1-10.

41. Prieto Solla, L. (2002). *Estudio de polimorfismos de ADN en restos humanos y muestras forenses críticas: valoración de estrategias y resultados*. Madrid: Universidad Complutense de Madrid.
42. Raup, D., & Stanley, S. (1978). *Principios de paleontología* (Primera ed.). Barcelona: Ariel.
43. Reinhard, K., Chaves, S., Jones, J., & Iñiguez, A. (2008). Evaluating chloroplast DNA in prehistoric Texas coprolites: medicinal, dietary, or ambient ancient DNA? *Journal of Archaeological Science*(35), 1748-1755.
44. Rodríguez Arnaiz, R., Castañeda Sortibrán, A. N., & Ordáz Téllez, M. G. (2004). *Conceptos básicos de genética*. Facultad de Ciencias: UNAM.
45. S. Sinding, M., P. Gilbert, M., Grønnow, B., Gulløv, H., Toft, P., & Foote, A. (2012). Minimally destructive DNA extraction from archaeological artefacts made from whale baleen. *Journal of Archaeological Science*(39), 3750-3753.
46. S. Sinding, M., Tervo, O., Grønnow, B., Gulløv, H., Toft, P., Bachmann, L., . . . Foote, A. (2016). Sex determination of baleen whale artefacts: Implications for ancient DNA use in zooarchaeology. *Journal of Archaeological Science: Reports*(10), 345–349.
47. Saiz, M., Álvarez Cubero, M. J., Martínez González, L. J., Álvarez, J. C., & Lorente, J. A. (2012). El ADN antiguo una herramienta para descifrar la historia. *Cuadernos de Prehistoria y Arqueología de la Universidad de Granada*(22), 11-47.
48. Seco Morais, J., Oom, M., Quesada, F., & Matheson, C. (2007). Ancient Iberian horses: a method to recover DNA from archaeological samples buried under sub-optimal conditions for preservation. *Journal of Archaeological Science*(34), 1713-1719.
49. Shanks, O., Hodges, L., Tilley, L., Kornfeld, M., Larson, M., & Ream, W. (2005). DNA from ancient stone tools and bones excavated at Bugas-Holding, Wyoming. *Journal of Archaeological Science*(32), 27-38.
50. Shin, D. H., Oh, C. S., Lee, H. J., Chai, J., Hong, D.-W., Lee, S. D., & Seo, M. (2013). Ancient DNA analysis on *Clonorchis sinensis* eggs remained in samples from medieval Korean mummy. *Journal of Archaeological Science*, 211-216.
51. Sinding, M.-H., Garrett Vieira, F., & Hayeur Smith, M. (2017). Unmatched DNA preservation prove arctic hare and sheep wool in Norse Greenlandic textile from “The Farm Beneath the Sand”. *Journal of Archaeological Science: Reports*, 603-608.
52. Singh, N., Joglekar, P., & Koziol, K. (2011). First ancient bovine DNA evidence from India: difficult but not impossible. *Journal of Archaeological Science*, 2200-2206.
53. Slon, V., Hopfe, C., Weiß, C., Mafessoni, F., de la Rasilla, M., Lalueza-Fox, C., . . . Meyer, M. (2017). Neandertal and Denisovan DNA from Pleistocene sediments. *Science*(356), 605-608.

54. Soubrier, J., Gower, G., Chen, K., Richards, S., Llamas, B., Mitchell, K., . . . Cooper, A. (2016). Early cave art and ancient DNA record the origin of European bison. *natura communications*, 1-7.
55. Speller, C., & Yang, D. (2016). Identifying the sex of archaeological turkey remains using ancient DNA techniques. *Journal of Archaeological Science: Reports*, 520–525.
56. Svensson, E., Götherström, A., & Vretemark, M. (2008). A DNA test for sex identification in cattle confirms osteometric results. *Journal of Archaeological Science* (35), 942-946.
57. Vuissoz, A., Worobey, M., Odegaard, N., Bunce, M., Machado, C., Lynnerup, N., . . . P. Gilbert, M. (2007). The survival of PCR-amplifiable DNA in cow leather. *Journal of Archaeological Science*(34), 823-829.
58. Wood, J., Crown, A., Cole, T., & Wilmshurst, J. (2016). Microscopic and ancient DNA profiling of Polynesian dog (kurī) coprolites from northern New Zealand. *Journal of Archaeological Science: Reports*, 496-505.
59. Yang, D., & Watt, K. (2005). Contamination controls when preparing archaeological remains for ancient DNA analysis. *Journal of Archaeological Science*(32), 331–336.