

El ADN antiguo y sus aplicaciones¹

Se ha demostrado que el ácido desoxirribonucleico (ADN)** rescatado a partir de tejidos antiguos es una molécula útil para el estudio del cambio genético de los organismos a través del tiempo. Actualmente, existe controversia con la filiación de los mamuts y los elefantes africano y asiático, por lo que la caracterización del ADN rescatado del tejido óseo fosilizado de los mamuts, puede contribuir al conocimiento de la historia evolutiva de la familia Elephantidae.

El estudio de la variabilidad genética de los organismos es importante para la determinación del parentesco y su clasificación filogenética en grupos afines. De igual forma, los conocimientos adquiridos con el estudio de los fósiles son útiles para inferir cómo estaban relacionados los organismos que vivieron en el pasado y cómo dieron origen a sus descendientes del presente. Sin embargo, para el estudio de las especies extintas, no siempre es posible contar con un registro fósil continuo con los caracteres estructurales que puedan ser empleadas para establecer las afinidades filogenéticas apropiadas, por lo que el análisis molecular del ADN de tejidos antiguos (ADNA) y contemporáneos es una alternativa para la determinación de los diferentes grupos afines (Higuchi *et. al.*, 1984).

Estructura del ADN

El ADN está constituido por dos cadenas complementarias de unidades de nucleótidos. Cada nucleótido está formado por un grupo fosfato, un azúcar de cinco átomos de carbono (desoxirribosa) y una base nitrogenada que puede ser adenina (A), timina (T), guanina (G) o citosina (C). Los enlaces se estable-

* Instituto de Fisiología Celular, Departamento de Genética Molecular, UNAM.

Agradezco al INAH por el material biológico proporcionado para la realización del presente trabajo; a PADEC (UNAM) por el proyecto núm. 005356; a DGAPA (UNAM) por la beca para mis estudios de posgrado en bioquímica en la Facultad de Química; a la doctora R. Vargas Sanders y al doctor D. González Halphen por su apoyo de siempre.

** Las siglas en inglés corresponden a DNA, en este trabajo utilizaremos las siglas en español ADN.

¹ Este artículo al igual que los publicados en *Arqueología* 22, son producto del seminario "Relaciones hombre-fauna" del Laboratorio de Paleozoología de la Subdirección de Laboratorios y Apoyo Académico del INAH.

cen entre el grupo fosfato de uno de los nucleótidos y el azúcar del siguiente, hasta formar una larga cadena de ellos. La secuencia de las bases en cada una de las cadenas es complementaria de la otra. Las adeninas están siempre opuestas a las timinas y las guaninas a las citosinas. Cada cadena presenta un extremo cinco prima (5') y un segundo tres (3'). Las cadenas son antiparalelas, puesto que ambas están orientadas en forma opuesta.

La caracterización de las moléculas de ADN, al igual que las actuales, se realiza comparando la secuencia de bases de los genes de interés con los de otros organismos relacionados. Los resultados que se obtienen son la fuente de información para la determinación del grado de afinidad de una molécula a otra y por lo tanto, del parentesco de un organismo a otro.

Primeros estudios con el ADN

En 1984, Higuchi y colaboradores clonaron en *Escherichia coli* (una bacteria comúnmente utilizada en biología molecular) un fragmento de 229 pares de bases del gen del citocromo oxidasa I del ADN mitocondrial de *Equus quagga*, un animal extinto hace 140 años. Este ADN difiere en 12 pares de bases con respecto a la secuencia correspondiente al gen de la cebra de montaña, mientras que con la cebra de la planicie no se encontraron diferencias entre ellas. Concluyeron que *quagga* no representa a una especie diferente, sino a una variante de la cebra de la planicie.

Por otra parte, cuando Pääbo en 1985 trabajó con momias del antiguo Egipto de 2 mil 310 a 2 mil 550 años de antigüedad, clonó en *E. coli* dos copias de ADN de la familia Alu, que son repeticiones de ADN característicos del genoma humano.

Características del ADN

Los trabajos anteriores revelaron que el ADN es capaz de preservarse por largos periodos después de la muerte de un individuo. Sin em-

bargo, las dificultades que se presentan al trabajar con este material son mayores con respecto al ADN extraído de tejidos frescos. La naturaleza del ADN nos explica esta última observación. Típicamente el ADN es de tamaño reducido, menor a 500 pares de bases, en contraste con las cadenas de más de 20 mil pares de bases que se extraen en forma rutinaria de los tejidos frescos. La reducción en el tamaño del ADN se debe a las reacciones de hidrólisis en los residuos de azúcar, en las bases nitrogenadas y en los enlaces éster fosfato. Así también, los residuos de azúcar y las bases nitrogenadas son blancos de los radicales libres de oxígeno (Lindahl, 1993), por lo que las moléculas de ADN pueden presentar bases modificadas por daño oxidativo, presentar sitiosapurínicos y apirimidínicos y enlaces cruzados intercadena (Pääbo, 1989). Cuando el ADN está dañado de esta forma, la bacteria es incapaz de generar copias de él, y aun cuando algunas logran replicarse, con frecuencia se introducen errores que dificultan su identificación mediante segmentos de alta especificidad del ADN de interés (Pääbo *et al.*, 1989).

El ADN polimerasa o PCR

La probabilidad de amplificar un segmento de ADN intacto aumentó dramáticamente con el desarrollo de la reacción en cadena del ADN polimerasa o PCR (Saiki *et al.*, 1985). Esta técnica, de extraordinaria sensibilidad, es capaz de generar millones de copias de un segmento de ADN a partir de una de ellas. El segmento se especifica mediante el diseño y síntesis química de dos segmentos cortos de ADN, entre 20 a 30 pares de bases. Cada uno de ellos reconoce uno de los extremos cinco prima de ambas cadenas antiparalelas del ADN que se desea amplificar. La amplificación ocurre mediante una serie de reacciones de naturaleza cíclica, obteniéndose en cada uno de los ciclos el doble en cantidad de ADN.

Con la PCR se logró por primera vez obtener resultados reproducibles en experimentos independientes, realizados con muestras distintas

del mismo espécimen, el cual es un requisito indispensable de la veracidad de un resultado. Así también, la secuencia directa de los productos de PCR ha revelado artefactos de clonación, inducidos probablemente por las moléculas antiguas dañadas al ser replicadas por las *E. coli* recombinantes (Pääbo y Wilson, 1988).

Los límites de la PCR con el ADN

Típicamente los productos de PCR que se obtienen con el ADN son menores a 400 pares de bases; productos mayores pueden representar ADN contaminantes de origen moderno (Handt *et al.*, 1994). Nuevamente este hecho se puede atribuir al daño físico y químico que puede tener el ADN. Por otra parte, la presencia de sustancias no identificadas, a excepción del ácido fúlvico (Tuross, 1994), pueden inhibir al ADN polimerasa. Un tercer problema que se presenta con regularidad es la contaminación de las preparaciones del ADN con moléculas actuales de origen animal, bacteriano o fúngico (Handt *et al.*, 1994).

Controles para evitar y detectar ADN contaminante

El riesgo de la contaminación humana se puede evitar cuando se manipula el material en forma mínima (Richards y Sykes, 1995). Desafortunadamente, éste no es el caso para el material que se encuentra en los museos. El caso ideal de muestreo es coleccionar al espécimen en el sitio de excavación, tomando las muestras con guantes desechables y evitando cubrirlas con sustancias consolidantes. Durante la extracción del ADN se debe eliminar la superficie del material coleccionado, ya que ésta representa la región más probable de contaminación por el suelo y por la manipulación.

Los controles de extracción (sin material biológico) realizados a la par con los extractos de tejido antiguo, así como los controles de amplificación sin ADN, son necesarios para detectar de manera oportuna contaminantes introducidos por el manejo, equipo, material y reactivos.

Igualmente, las extracciones independientes con muestras diferentes del mismo espécimen deben rendir secuencias idénticas. Por último, las secuencias deben ser analizadas bajo un criterio filogenético, determinando de esta manera el grado de afinidad con las secuencias de organismos relacionados.

Preservación del ADN en el material biológico

El tiempo que una molécula de ADN es capaz de retener su información en forma intacta es incierto, pues depende de los factores ambientales que circundan al material biológico en el suelo. La interacción conjunta de alguno de estos factores, como el pH neutro y la anaerobiosis, pueden ser esenciales para la preservación del ADN en ambientes extremos (Pääbo *et al.*, 1988a). Los ambientes con temperatura por debajo de los cero grados centígrados (Hagelberg *et al.*, 1994; Höös *et al.*, 1994), así como la desecación de los tejidos de forma natural o artificial (Pääbo, 1985), han mostrado ser condiciones apropiadas para la preservación del ADN por periodos relativamente largos (40 mil años o más). En este contexto, diversos trabajos han proclamado la caracterización de moléculas de ADN extraído de material biológico de varios millones de años de antigüedad, como son huesos fosilizados de dinosaurio (Woodward *et al.*, 1994), hojas fosilizadas de plantas (Golenberg *et al.*, 1990) e insectos atrapados en ámbar (DeSalle *et al.*, 1992). Sin embargo, los resultados han creado controversia por la falta de reproducibilidad de los resultados (Austin *et al.*, 1997; Lindahl, 1993b; Pääbo y Wilson, 1991; Sidow *et al.*, 1991); es por eso que se ha sugerido que el ADN es incapaz de preservarse por periodos extremadamente largos.

¿Cómo estimar si un tejido antiguo contiene ADN endógeno capaz de ser amplificado?

La observación de la estructura microscópica de los diversos tejidos analizados ha sido una práctica útil para estimar si una muestra bioló-

gica antigua puede o no contener ADN endógeno (Hagelberg, 1991; Pääbo, 1985). Mediante esta observación, también se puede descubrir la presencia de microorganismos (hongos o bacterias) que representan contaminantes potenciales de ADN.

Poinar *et al.* (1996) observaron que la racemización de los aminoácidos puede ser utilizada como indicador para estimar la presencia de ADN endógeno en los tejidos antiguos. Los aminoácidos son las unidades moleculares que constituyen a las proteínas. De acuerdo con su estructura tridimensional, cada aminoácido, con excepción de la glicina, presenta dos formas en el espacio, denominadas enantiómeros D y L. De ellos, exclusivamente el enantiómero L se usa en la biosíntesis de las proteínas. Cuando un organismo muere, las proteínas empiezan a degradarse y los L-aminoácidos cambian lentamente a D-aminoácidos, proceso conocido como racemización. Eventualmente, cada aminoácido forma una mezcla de igual cantidad de enantiómeros D y L. De los veinte aminoácidos que normalmente constituyen a las proteínas, el ácido aspártico es el que sufre el proceso de racemización en forma más rápida bajo las condiciones fisicoquímicas ambientales (pH y temperatura) en que ocurre la degradación del ADN. Se observó que la racemización del ácido aspártico, independientemente de la antigüedad de los tejidos, guarda una relación inversa con respecto al tamaño de las secuencias caracterizadas de ADN. En los casos en que no fue posible rescatar secuencias endógenas de ADN como en el *Tyrannosaurus rex* de 65 millones de años de antigüedad, donde se ha demostrado que el ADN rescatado de los huesos fosilizados es de origen humano (Collura y Stewart, 1995), la relación D/L del ácido aspártico tuvo un valor mayor a 0.08.

Aplicaciones del ADN

El estudio del ADN ha tenido diversas aplicaciones en la investigación, como en la arqueología, en el estudio de las migraciones humanas (Hagelberg, 1993; Horai *et al.*, 1991); en la

antropología, en la dilucidación del origen del hombre (Krings *et al.*, 1997); en la ciencia forense, en la identificación de personas asesinadas (Hagelberg, 1991); en la paleontología, en la taxonomía de organismos extintos (Higuchi *et al.*, 1984). En esta última área, los ejemplos son muy numerosos; únicamente haremos referencia al que está en relación con el ADN rescatado de tejido óseo de mamuts. Estos animales se extinguieron hace aproximadamente 10 mil años (Vartanyan *et al.*, 1993); se han clasificado en la familia Elephantidae en el orden Proboscidae. De ellos, sólo sobreviven dos especies, *Elephas maximus* o elefante asiático y *Loxodonta africana* o elefante africano. La presencia de los mamuts en América se ha estimado en 1.8 millones de años, concentrándose principalmente en Alaska, Canadá, Estados Unidos de Norte América, México, El Salvador y Guayana Francesa (Agenbroad, 1985).

Anatómicamente, los mamuts estaban relacionados con el elefante asiático (Shoshani *et al.*, 1985). Los estudios moleculares realizados a nivel de afinidad inmunológica con la proteína albúmina de mamut y elefante sugirieron que los mamuts se encuentran a una distancia genética equidistante entre los elefantes asiático y africano (Lowenstein, 1981).

Johnson *et al.* (1985) observaron que el tamaño de los fragmentos de ADN extraído del músculo congelado de *Mammuthus primigenius* de 10 mil a 50 mil años de antigüedad oscilaba entre los 200 a 3 mil pares de bases. Los experimentos de hibridación demostraron que sólo del 2% al 5% del ADN de mamut era homólogo con el ADN de *E. maximus*. Más tarde, a partir de ADN purificado del tejido muscular de varios especímenes de mamut siberiano, con edades estimadas entre 9 mil a 50 mil años, Hoos *et al.* (1994) obtuvieron un producto de PCR de 93 pares de base del gen del ADN ribosomal 16S de la mitocondria. El mismo producto se obtuvo en cuatro de un total de cinco individuos. El análisis de las secuencias mostró una diferencia entre ellos de cero a cinco pares de bases. La misma región analizada en los elefantes

africano y asiático, mostró una diferencia de dos pares de bases. Los datos sugieren que probablemente los mamuts fueron muy diversos y que pudieron haber estado separados en subespecies en transición o aislados por barreras geográficas.

En forma independiente, el grupo de Hagelberg (1994) y Derenko (1997) obtuvieron secuencias de 280 y 331 pares de bases de una misma región del gen del citocromo b de especímenes de *M. primigenius* descubiertos en áreas geográficas distintas de Siberia, con edades aproximadas a los 40 mil años de antigüedad. El análisis filogenético de las secuencias mostró inconsistencia para la resolución de la afinidad genética entre los mamuts y ambas especies de elefante. Por otra parte, Yang *et al.* (1996) utilizaron en su análisis filogenético como grupo externo una secuencia de 225 pares de bases del gen del citocromo b de *Mammuth americanum*; sus resultados sugirieron un origen monofilético para *M. primigenius* y *E. maximus*.

Con el fin de aportar mayor información acerca de la afinidad genética de los mamuts con los elefantes, el doctor D. González Halphen del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, en colaboración con la doctora R. Vargas Sanders del Instituto de Investigaciones Antropológicas de la misma universidad, ha impulsado el estudio del ADN recuperado a partir de tejido óseo de mamuts descubiertos en distintas áreas del valle de México. Las edades estimadas de estos especímenes son de 10 mil a 20 mil años. El material biológico ha sido proporcionado por el INAH mediante el arqueólogo L. A. López Wario de la Subdirección de Salvamento Arqueológico y del ingeniero Joaquín García-Bárcena de la Subdirección de Servicios Académicos.

Para caracterizar el ADN, nuestro estudio se ha centrado en el ADN mitocondrial. Esta molécula, es uno de los marcadores moleculares más utilizados para tipificar el ADN recuperado de tejidos antiguos (Derenko *et al.*, 1997; Hagelberg *et al.*, 1994; Hagelberg y Clegg, 1993; Hauf *et al.*, 1995; Higuchi *et al.*, 1984; Kocher *et al.*,

1989; Hoss *et al.*, 1994; Pääbo *et al.*, 1988; Yang *et al.*, 1996). En los mamíferos, el ADN mitocondrial es una molécula circular de 15 a 17 mil pares de bases (Lightowlers *et al.*, 1997; Shadel y Clayton, 1997). Se ha estimado que en cada célula existen de 10^3 a 10^4 moléculas de ADN mitocondrial, por lo que la probabilidad de amplificar segmentos de ella, a partir de moléculas antiguas mediante la PCR, es muy grande. En el ADN mitocondrial se encuentran codificadas 13 proteínas involucradas en el metabolismo aerobio de los organismos. Una de ellas es el citocromo b. Se ha observado que el ADN mitocondrial de los mamíferos tiene una tasa de mutación mayor que el ADN nuclear, por lo que puede ofrecer una amplia diversidad intraespecífica (Can *et al.*, 1987). En los mamíferos se adquiere por herencia materna con niveles no detectables de recombinación (Shadel y Clayton, 1997), estando su organización de genes en forma relativamente conservada (Hoelzel, 1993). Esto permite al ADN mitocondrial ser un excelente marcador filogenético de las poblaciones afines (Can *et al.*, 1987; Vigilant *et al.*, 1991).

La extracción del ADN se ha realizado en forma independiente con muestras óseas de especímenes diferentes. El ADN se analizó por electroforesis; ésta utiliza un campo eléctrico para separar los fragmentos de ADN de acuerdo con su tamaño, conforme migran en un gel de agarosa. El ADN que se obtuvo en cada una de las extracciones presentó un tamaño menor a los 500 pares de bases, observándose también una banda tenue mayor a los mil pares de bases. Estas observaciones son consistentes con respecto a las características del ADN discutidas en una sección anterior. Las reacciones de PCR se realizaron con sondas específicas diseñadas con base en la secuencia del gen del citocromo b de *L. africana* (Irwin *et al.*, 1991) y con los descritos por Hauf *et al.* (1995). Con ellos se pueden amplificar segmentos de ADN del citocromo b de 100 a 300 pares de bases. Para evitar contaminación con ADN introducido por la manipulación y por los reactivos, cada una de las extracciones y amplificaciones se realizaron con controles sin ADN. Hasta ahora, probable-

mente por el daño físico y químico que puedan presentar las moléculas de ADN, nuestros resultados no han sido consistentes de un experimento a otro.

Éstos se realizaron con preparaciones de ADN obtenidas en forma independiente con tejido óseo del mismo y/o diferente espécimen. Algunas de las secuencias de ADN analizadas han mostrado ser contaminantes de origen humano y de ratón. Sin embargo, no se ha detectado contaminación con ADN de microorganismos del suelo o del ambiente del área de trabajo. Los resultados sugieren realizar estrategias alternativas de extracción para manipular en forma mínima el material biológico y evitar, de esta forma, las probables fuentes de contaminación y, con ello, obtener resultados más favorables a nuestro objetivo. También nos encontramos analizando el material genético rescatado de los fósiles con cromatografía líquida de alta precisión, con el fin de estimar el grado de alteración de las bases nucleotídicas de este material.

- Agenbroad, D.
1985. "The distribution and chronology of mammoth in the New World", en *Acta Zoologica Fennica*, 170, pp. 221-224.
- Cann, R. L., M. Stoneking y A. C. Wilson
1987. "Mitochondrial DNA and human evolution", en *Nature*, 325, pp. 31-36.
- Collura, R. V., y C. B. Stewart
1995. "Insertions and duplications of mtDNA in the nuclear genomes of Old World monkeys and hominoids", en *Nature*, 378, pp. 485-489.
- Derenko, M., B. Malyarchuk y G. F. Shields
1997. "Mitochondrial cytochrome b sequence from a 33,000 year-old woolly mammoth (*Mammuthus primigenius*)", en *Ancient Biomolecules*, 1, pp. 149-153.
- DeSalle, R., J. Gatesy, W. Wheeler y D. Grimaldi
1992. "DNA sequences from a fossil termite in Oligo-Miocene amber and their phylogenetic implications", en *Science*, 257, pp. 1933-1936.
- Golenberg, E. M., D. E. Giannasi y M. T. Clegg
1990. "Chloroplast DNA from a Miocene *Magnolia* species", en *Nature*, 344, pp. 656-658.
- Hagelberg, E., I.C. Gray y A. J. Jeffreys
1991. "Identification of the skeletal remains of a murder victim by DNA analysis", en *Nature*, 352, pp. 427-429.
- Hagelberg, E. y J. B. Clegg
1993. "Genetic polymorphisms in prehistoric Pacific islanders determined by analysis of ancient bone DNA", en *Proceeding of the Royal Society of London*, B, 252, pp. 163-170.
- Hagelberg, E., M. G. Thomas, C. E. Cook Jr., A. V. Sher, G. F. Baryshnikov y A. M. Lister
1994. "DNA from ancient mammoth bones", en *Nature*, 370, pp. 333-334.
- Hagelberg, E., L. S. Bell, T. Allen, A. Boyde, S. J. Jones y J. B. Clegg

1991. "Analysis of ancient bone DNA: techniques and applications", en *Philosophical Transactions of Royal Society of London*, B., 333, pp. 399-407.
- Handt, O., M. Hoss, M. Krings y S. Pääbo
1994. "Ancient DNA: methodological challenges", en *Experientia*, 50, pp. 524-529.
- Hauf, J., A. Baur, N. Chalwatzis, F. K. Zimmermann, U. Joger y P. A. Lazarev
1995. "Selective amplification of a mammoth mitochondrial cytochrome b fragment using an elephant-specific primer", en *Current Genetics*, 27, pp. 486-487.
- Higuchi, R., B. Bowman, M. Friberger, O.A. Ryder y A. C. Wilson
1984. "DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family", en *Nature*, 312, pp. 282-284.
- Hoelzel, A. R.
1993. "Evolution by DNA turnover in the control region of vertebrate mitochondrial DNA", en *Current Opinion in Genetics and Development*, 3, pp. 891-895.
- Horai, S., R. Kondo, K. Murayama, S. Hayashi, H. Koike, y N. Nakai
1991. "Phylogenetic affiliation of ancient and contemporary humans inferred from mitochondrial DNA", en *Philosophical Transactions of Royal Society of London*, B, 333, pp. 409-417.
- Höös, M., S. Pääbo y N. K. Vereshchagin
1994. "Mammoth DNA sequences", en *Nature*, 370, pp. 333-334.
- Irwin, D. M., T. D. Kocher, y A. C. Wilson
1991. "Evolution of the cytochrome b gene of mammals", en *Journal of Molecular Evolution*, 32, pp. 128-144.
- Krings, M., A. Stone, R. W. Schmitz, H. Krainitzki, M. Stoneking, y S. Pääbo
1997. "Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans", en *Cell*, 90, pp. 19-30.
- Johnson, P. H., C. B. Olson y M. Goodman
1985. "Prospects for the molecular biological reconstruction of the woolly mammoth's evolutionary history: isolation and characterization of deoxyribonucleic acid from the tissue of *Mammuthus primigenius*", en *Acta Zoologica Fennica*, 170, pp. 225-231.
- Kocher, T. D., W. K. Thomas, A. Meyer, S. V. Edwards, S. Pääbo, F. X. Villablanca y A. C. Wilson
1989. "Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals", en *Proceedings of the Natural Academy Sciences*, 86, EUA, pp. 6196-6200.
- Lightowers, R. N., P. F. Chinnery, D. M. Turnbull y N. Howell
1997. "Mammalian mitochondrial genetics: heredity, heteroplasmy and disease", en *TIG*, 13, pp. 450-455.
- Lindahl, T.
1993a. "Instability and decay of the primary structure of DNA", en *Nature*, 362, pp. 709-715.
1993b. "Recovery of antediluvian DNA", en *Nature*, 365, p. 700.
- Lowenstein, J. M., V. M. Sarich y B. J. Richardson
1981. "Albumin systematics of the extinct mammoth and Tasmanian wolf", en *Nature*, 291, p. 409.
- Pääbo, S.
1985. "Molecular cloning of ancient Egyptian mummy DNA", en *Nature*, 314, pp. 644-645.
1989. "Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification", en *Proceedings of the Natural Academy Sciences*, 86, EUA, pp. 1939-1943.
- Pääbo, S., R. G. Higuchi y A.C. Wilson
1989. "Ancient DNA and the polymerase chain reaction", en *Journal of Biological Chemistry*, 264, pp. 9709-9712.

- Pääbo, S., J. A. Gifford y A. C. Wilson
1988. "Mitochondrial DNA sequences from a 7000-year old brain", en *Nucleic Acids Research*, 16, pp. 9775-9787.
- Pääbo, S. y A.C. Wilson
1991. "Miocene DNA sequences-a dream come true?", en *Current Biology*, 1, pp. 45-46.
- 1988. "Polymerase chain reaction reveals cloning artefacts", en *Nature*, 334, pp. 387-388.
- Poinar, H. N., M. Hoss, J. L. Bada y S. Pääbo
1996. "Amino acid racemization and the preservation of ancient DNA", en *Science*, 272, pp. 864-866.
- Richards, M. B. y B. C. Sykes
1995. "Authenticating DNA extracted from ancient skeletal remains", en *Journal Archaeological Science*, 22, pp. 291-299.
- Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich y N. Arnheim
1985. "Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia", en *Science*, 230, pp. 1350-1354.
- Shadel, S. G. y D. A. Clayton
1997. "Mitochondria DNA maintenance in vertebrates", en *Annual Review Biochemistry*, 66, pp. 409-435.
- Shoshani, J., D. A. Wals, M. Goodman, J. M. Lowenstein y W. Prychodcko
1985. "Protein and anatomical evidence of the phylogenetic position of *Mammuthus primigenius* within the Elephantinae", en *Acta Zoologica Fennica*, 170, pp. 237-240.
- Sidow, A., A. C. Wilson y S. Pääbo
1991. "Bacterial DNA in *Clarkia* fossils", en *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, B, 333, pp. 429-433.
- Tuross, N.
1994. "The biochemistry of DNA in bone", en *Experientia*, 50, pp. 530-535.
- Vartanyan, S.L., V. E. Garutt y A. V. Sher
1993. "Holocene dwarf mammoths from Wrangel Island in the Siberian Arctic", en *Nature*, 362, pp. 337-340.
- Vigilant, L., M. Stoneking, H. Harpending, K. Hawkes y A. C. Wilson
1991. "African populations and the evolution of human mitochondrial DNA", en *Science*, 253, pp. 1503-1507.
- Woodward, S. R., N. J. Weyand y M. Bunnell
1994. "DNA sequence from cretaceous period bone fragments", en *Science*, 266, pp. 1229-1232.
- Yang, H., E. M. Golenberg y J. Shoshani
1996. "Phylogenetic resolution within the Elephantidae using fossil DNA sequence from the American mastodon (*Mammuth americanum*) as an outgroup", en *Proceedings of the Natural Academy Sciences*, 93, EUA, pp. 1190-1194.