

MUNIBE (Antropología-Arkeologia)	nº 53	143-150	SAN SEBASTIAN	2001	ISSN 1132-2217
---	-------	---------	---------------	------	----------------

Aceptado: 2000-08-20

Estimación del sexo a nivel molecular en restos esqueléticos humanos

Sex estimation at the molecular level in human skeletal remains

PALABRAS CLAVE: ADN antiguo, Gen de la amelogenina, Estimación del sexo, PCR.

KEY WORDS: ancient DNA, amelogenine gen, sex estimation, PCR.

N. IZAGIRRE*
N. de BIZARRA*
A. ALZUALDE*
C. de la RUA*

RESUMEN

La estimación del sexo de restos humanos de procedencia arqueológica se ha venido realizando mediante el análisis morfológico de los restos esqueléticos. Sin embargo este tipo de análisis resulta inapropiado para el caso de individuos infantiles o en el caso de restos fragmentados. En este trabajo proponemos un nuevo método alternativo de estimación del sexo mediante la aplicación de las técnicas moleculares al ADN antiguo. Proponemos la amplificación de un pequeño fragmento del gen de la amelogenina, presente tanto en el cromosoma X como en el Y, el cual presenta dimorfismo de longitud: en el cromosoma X una banda de 106 pares de bases de longitud y en el cromosoma Y una banda de 112 pares de bases de longitud. La aplicación de esta metodología a restos esqueléticos ha demostrado ser útil, permitiendo estimar el sexo de forma reproducible en restos de hasta 5.000 años de antigüedad.

SUMMARY

Estimation of sex in archaeological human remains has been traditionally carried out by means of morphological analysis of skeletal remains. The application of this kind of analysis is limited in the case of infantiles and fragmentary remains. In this work, we propose an alternative molecular method for the estimation of sex, based on the analysis of ancient DNA. The amplification of a small fragment of the amelogenine gen, present both in the X and Y chromosomes, that shows length dimorphism: its presence in the X chromosome renders an amplification product of 106 base pairs length and the Y chromosome copy produces a band of 112 base pairs. The application of this methodology to skeletal remains proved useful, allowing the sex estimation in samples as old as 5.000 years.

LABURPENA

Giza-aztarna arkeologikoen sexuaren estimazioa analisi morfologikoen bidez egin ohi izan da. Hala ere, analisi mota hau ez da egokiena haurren aztarnak edo aztarna zatikatuen sexua estimatzeko. Lan honetan, eskeletuen sexua estimatzeko beste metodo bat proposatzen dugu, zeinetan teknika molekularrak aintzinako ADNan analizatzeko erabiliko bait ditugu. Horretarako, X eta Y kromosometan luzeraren dimorfismoa agertzen duen amelogenina genearen zati txiki bat amplifkatuko dugu: X kromosoman 106 pare basetako luzera eta Y kromosoman 112 pare basetako luzera direlarik. Metodologia hau aztarna eskeletikoetan aplikatuz, 5.000 urtetako aztarnen sexua estimatzea ere posible dela frogatu dugularik.

I. INTRODUCCIÓN

La antropología física, dispone de recursos analíticos para la estimación del sexo en los restos esqueléticos adultos, basados en el análisis de caracteres morfológicos, principalmente del cráneo y la pelvis (ACSADY & NEMESKERI, 1970; ST. HOYME & ISCAN, 1989). La mayoría de los rasgos sexuales secundarios

se desarrollan a partir de la pubertad, por lo que la estimación del sexo en individuos infantiles y juveniles es prácticamente imposible; el mismo problema surge cuando los restos están fragmentados o no se dispone de los huesos más informativos.

La posibilidad de recuperar material genético de restos óseos y dentarios arqueológicos (HAGELBERG et al., 1989; HORAI et al., 1989), abre la posibilidad de estimar el sexo, incluso de individuos infantiles y juveniles o de restos fragmentarios, empleando para ello el ADN de los cromosomas X e Y (LASSEN et al., 1996; FAERMAN et al., 1995; STONE et al., 1996). En

* Universidad del País Vasco / Euskal Herriko Unibertsitatea. Facultad de Ciencias. Dpto. de Biología Animal y Genética. Apdo. 644. 48080 Bilbao.

estos elementos óseos, en los que no es factible la utilización de los métodos osteológicos clásicos (tamaño y morfología de los huesos), bien porque los huesos no se encuentran aún completamente desarrollados y/o el número de elementos óseos es insuficiente, podemos aplicar los métodos moleculares para estimar su sexo.

En el campo de la medicina forense se han desarrollado diversos métodos para la estimación del sexo utilizando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), técnica que permite la rápida amplificación de pequeñas cantidades de ADN, incluso de una única molécula, consiguiendo cantidades adecuadas para su análisis mediante técnicas rutinarias de electroforesis (AASEN & MEDRANO, 1990; AKANE *et al.*, 1992; CUI *et al.*, 1994; HANDYSIDE *et al.*, 1990). Sin embargo, las características particulares del ADN antiguo (ADNa), tales como su estado fragmentario (100 pares de bases de longitud), baja eficiencia en la recuperación del ADN y presencia de bases modificadas en la secuencia nucleotídica, hacen necesaria la adaptación y modificación de la técnica de análisis molecular (IZAGIRRE *et al.*, 1998).

Los primeros análisis para la estimación del sexo en restos arqueológicos mediante técnicas de biología molecular, se basaron en la amplificación de un pequeño fragmento de una secuencia repetitiva alfoide de 3,4 Kilobases (Kb), específica del cromosoma Y (HUMMEL & HERRMANN, 1991, 1994b). La ventaja de este sistema radica en que se analiza un fragmento altamente repetitivo del cromosoma Y, hecho que facilita la amplificación con éxito del ADN de restos antiguos. El inconveniente es que aunque la presencia del producto de amplificado indicaría que el resto esquelético analizado pertenece a un individuo masculino, sin embargo la ausencia de amplificación no indicaría necesariamente que el individuo fuera femenino, ya que existe una alta probabilidad de falsos negativos, causados por la baja cantidad y mala calidad del ADNa (COOPER, 1994; HAGELBERG & CLEGG, 1991; PÄÄBO *et al.*, 1988).

Los trabajos posteriores, se han basado en la amplificación de un fragmento del primer intron del gen de la amelogenina (AMG), que exhibe dimorfismo sexual de longitud, es decir este gen presenta tamaños diferentes según esté localizado en el cromosoma X o Y (NAKAHORI *et al.*, 1991). FAERMAN *et al.* (1995) utilizan tres *primers* para la amplificación de dos fragmentos del gen de la Amg. Uno de los *primers* es común a ambos alelos del gen de la Amg (X e Y) y los otros dos son específicos para cada uno de los alelos de los cromosomas X e Y respectivamente. El problema de esta metodología es que el tamaño de los fragmentos amplificados es relativamente

grande (330 pb de longitud en los individuos femeninos y 218 pb de longitud en los masculinos), y por tanto, el rendimiento de estos sistemas en restos arqueológicos es muy bajo.

STONE *et al.* (1996) también amplificaron un pequeño fragmento del exon 6 del gen de la AMG: las diferencias entre las copias de los cromosomas X e Y se ponen de manifiesto mediante la hibridación con sondas específicas. Sin embargo, la ausencia de señales de hibridación con la sonda del cromosoma Y, puede resultar problemática (STONE *et al.*, 1996).

Por último, LASSEN *et al.* (1996) proponen la amplificación del primer intron de la AMG, el cual exhibe un dimorfismo de longitud. Así, el fragmento en el cromosoma X presenta una delección de 6 pb que determina una longitud de 106 pb, mientras que el fragmento amplificado en el cromosoma Y es de 112 pb. El pequeño tamaño de los fragmentos amplificados (106/112 pb de longitud) es una ventaja cuando se trabaja con ADNa, por lo que actualmente éste es el sistema más empleado en el caso de restos arqueológicos.

En este trabajo hemos seleccionado un conjunto de muestras de sexo conocido, a fin de optimizar las técnicas moleculares en la estimación del sexo de los restos esqueléticos. Una vez comprobada la eficiencia de la técnica, hemos analizado un conjunto de muestras de interés antropológico, de distinta antigüedad, con el objetivo de obtener información molecular sobre el sexo de las mismas y contrastar estos resultados con los obtenidos en el análisis morfológico de los restos óseos.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

En este trabajo se han analizado 71 muestras de diversos yacimientos del País Vasco, pertenecientes a un amplio contexto temporal (Mesolítico, Neolítico, edad del Bronce, s. VII y s. XVIII). Se han analizado asimismo, algunas muestras de sexo conocido, pertenecientes a una colección antropológica de época reciente (CAER), de 50 años de antigüedad, compuesta por un conjunto de cráneos y mandíbulas procedentes de diversos conventos de clausura del País Vasco, lo que nos permitió conocer el nombre, lugar de nacimiento y sexo de los esqueletos, todos ellos pertenecientes a mujeres. En las otras muestras analizadas en este trabajo (yacimiento de Aldaieta y de Aizpea), el sexo se ha estimado primeramente mediante el análisis morfológico de los restos esqueléticos; en el resto de las muestras no se ha podido establecer ningún diagnóstico sexual, dado el estado fragmentario de los materiales antropológicos. En la

tabla 1 se indica, la localización y datación de los yacimientos analizados así como el número de muestras analizadas en cada caso.

Yacimiento	Datación	n
Aizpea (Nafarroa)	6.600±50	1
SJAPL (Araba)	5.070±150 - 5.020±140	22
Urratxa (Bizkaia)	3.405±70 - 3.475±80	5
Aldaieta (Araba)	s. VI-VII	17
Iglesias (Bizkaia)	s. XVIII	5
CAER	50 años antigüedad	21

Tabla 1. Muestras esqueléticas analizadas en el presente trabajo: datación y tamaño muestral

n, tamaño muestral analizado

SJAPL, San Juan ante Portam Latinam (Araba)

CAER, Colección Antropológica de Época Reciente

Extracción de ADN:

La extracción del ADN se ha realizado a partir de piezas dentarias intactas. Previamente a la extracción del ADN, las piezas dentarias se someten a un proceso de limpieza mediante ácidos para eliminar posibles ADN contaminantes adheridos a la superficie del diente (GINTHER et al., 1992). A continuación se corta la raíz y se incuba toda la noche a 37°C, con agitación, en un volumen suficiente como para cubrir toda la raíz con el buffer de lisis (0,5 M EDTA pH 8,0-8,5, 0,5% SDS; 50 mM Tris-HCl pH 8,0 y 0,01 mg/ml Proteinasa K). Posteriormente la mezcla se somete a un proceso estándar de extracción con fenol y otro con cloroformo. El ADN recuperado se concentra y purifica en los concentradores Centricon-30.

Amplificación vía PCR:

La identificación del sexo se ha realizado mediante la amplificación de un pequeño fragmento homólogo del intron 1 del gen de la AMG X-Y en los cromosomas X-Y. Se han realizado un promedio de 6 amplificados diferentes del mismo individuo. La amplificación se ha llevado a cabo mediante la técnica de Hot Start en un volumen final de 50 µl, que contiene: 10 mM Tris-HCl pH 8,3; 50 mM KCl; 2 mM MgCl₂; 175 µM dNTP; 0,1 mg/ml BSA; 1,25 unidades de Taq DNA polimerasa; 0,4 µM de cada primer (Aml1: 5'- CCC TGG GCT CTG TAA AGA ATA GTG-3' y Aml2: 5'- ATC AGA GCT TAA ACT GGG AAG CTG-3') y aproximadamente 10 µl del extracto de ADN diluido. La amplificación se ha realizado en un termociclador con las siguientes condiciones de temperatu-

ra: un paso inicial a 94°C (5 min), seguido de 60 ciclos a 94°C (15 seg), 45°C (5 seg) y 72°C (10 seg), finalmente un ciclo a 72°C (5 min).

El tamaño del amplificado se verifica analizando diez microlitros del amplificado, mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida del 12% y tinción con plata.

Precauciones:

Para cada conjunto de muestras extraídas se incluye: *un control de la extracción*, consistente en una reacción que se somete a todo el proceso de la extracción, pero a la que no se le añade tejido, y un *control negativo de la amplificación*, es decir, una reacción a la que se le añaden todos los reactivos para la amplificación, excepto el ADN.

En el campo del ADN antiguo, para obtener resultados fiables, es imprescindible realizar un análisis experimental serio y riguroso, que implica medidas tales como la utilización de laboratorios físicamente separados en las diferentes fases del trabajo. La extracción y preparación de las reacciones de amplificación, se han llevado a cabo en un laboratorio exclusivamente dedicado al trabajo con ADN antiguo, libre de ADN genómico actual. Además, las superficies de trabajo y los materiales, se lavan frecuentemente con hipoclorito sódico y se irradian con luz UV. Todo el material, tanto material plástico desechable como reactivos, se compran estériles y, además, se someten a irradiación con luz U.V. en el laboratorio.

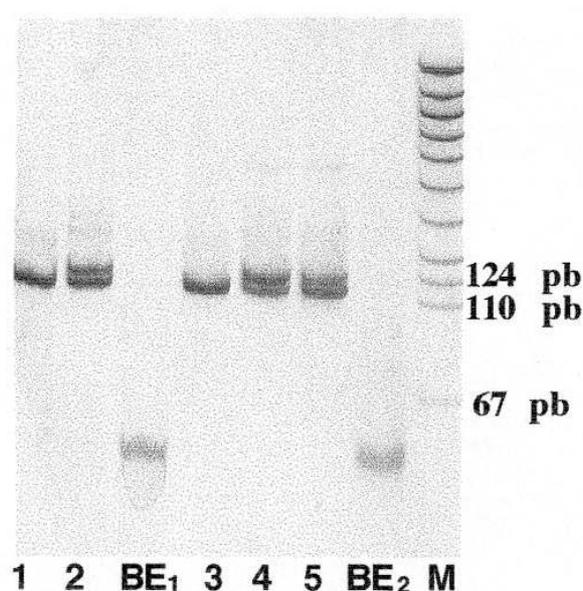


Fig. 1. PAGE de los amplificados del gen de la Amelogenina. BE₁ y BE₂: blancos de la extracción. Muestras 1 y 3, femeninas; 2, 4 y 5 masculinas. M: marcador de peso molecular

III. RESULTADOS Y DISCUSION

Con este trabajo deseamos en primer lugar, evaluar la aplicabilidad de las técnicas de análisis del ADN, para la estimación del sexo de restos esqueléticos. Para ello se han seleccionado un conjunto de muestras de sexo conocido de 50 años de antigüedad (CAER) (Tabla 1). La estimación del sexo a nivel molecular, se ha llevado a cabo siguiendo el método propuesto por LASSEN et al. (1996), consistente en la amplificación de un pequeño fragmento de 106 pb de longitud, del intron 1 en el gen de la AMG-X y de otro fragmento de 112 pb en el gen AMG-Y. Se ha seleccionado este sistema porque tiene un tamaño pequeño y el tipaje es rápido y fácil de interpretar. Así, este polimorfismo presenta dos bandas en los individuos masculinos (106/112 pares de bases de longitud) y una banda en los individuos femeninos (106 pares de bases de longitud).

Todas las muestras analizadas en este trabajo sobre la estimación del sexo, se han analizado asimismo en un estudio de la variabilidad del ADN mitocondrial (ADNmt) (IZAGIRRE & DE LA RUA 1999, 2000 y otros datos no publicados). La comparación de ambos análisis nos ha permitido observar que el rendimiento obtenido para el gen de la AMG X-Y es menor que para los polimorfismos del ADNmt, lo que es claramente atribuible al hecho de que el gen de la AMG X-Y es de copia única, mientras que el ADNmt presenta en principio miles de copias por célula.

Las muestras de la CAER, con una antigüedad inferior a los 100 años, presentan un rendimiento muy alto durante la amplificación (78%) (Tabla 2). En todos los amplificadores realizados, el tipaje molecular ha definido dichos restos como perteneciente a mujeres, lo que garantiza, *a priori*, la fiabilidad intrínseca de la técnica y asimismo de los resultados posteriores obtenidos en restos esqueléticos de mayor antigüedad y sexo desconocido.

Yacimiento	%
Aizpea (Nafarroa)	100
SJAPL (Araba)	44
Urratxa (Bizkaia)	75
Aldaieta (Araba)	21,6
Iglesias (Bizkaia)	73
CAER	78

Tabla 2. Eficiencia obtenida en la amplificación del ADN, en cada yacimiento

%, porcentaje de amplificadores positivos totales
 SJAPL, San Juan ante Portam Latinam (Araba)
 CAER, Colección Antropológica de Época Reciente

En la Tabla 2 se indica el rendimiento obtenido en la amplificación del ADN en cada uno de los yaci-

mientos analizados en este trabajo. El yacimiento de Aizpea, el de mayor antigüedad, presenta un único individuo mesolítico, que se ha amplificado con éxito. Los rendimientos más altos se han obtenido (aparte de en la CAER), en Urratxa (Edad del Bronce) y en las muestras de las iglesias (s. XVIII, alrededor del 75%). En el yacimiento neolítico de SJAPL y la necrópolis tardoantigua de Aldaieta, el rendimiento ha sido mucho menor (44% y 21,65%, respectivamente). Se destaca que, muestras con una antigüedad tan dispar como las pertenecientes a la CAER (50 años de antigüedad) y Urratxa (3.000 años de antigüedad), presentan una eficiencia similar. Por otro lado, SJAPL, con una antigüedad de aproximadamente 5.000 años, tiene un rendimiento mayor (44%) que Aldaieta (21,65%), con solo 1.500 años de antigüedad. Estos resultados coinciden con lo observado en los análisis de los polimorfismos del ADNmt, en los que las muestras de Aldaieta han ofrecido el rendimiento más bajo (datos no publicados).

Al igual que en otros trabajos (LINDHAL, 1993; HANDT et al., 1996; HAGELBERG & CLEGG, 1991; TURROSS, 1994), se constata que la antigüedad no es el único factor que contribuye a un menor rendimiento durante la amplificación del ADN. Si bien, según ciertos autores, existe un límite temporal estimado en unos 100.000 años, en el que independientemente de las condiciones de preservación de las muestras, el daño oxidativo degradaría completamente el ADN (LINDHAL, 1993), en nuestro caso, el yacimiento más antiguo no supera los 6.000 años de antigüedad. En esta escala temporal, el mayor o menor grado de preservación o degradación del ADN, depende de procesos hidrolíticos y oxidativos que ocurren una vez muerto el organismo y que provocan la rotura de las cadenas de ADN. Estos procesos presentan una doble dependencia, tanto de la antigüedad de las muestras como de las condiciones ambientales a las que han estado sometidas (DORAN et al., 1986; PÄÄBO, 1985). Así, los ambientes húmedos favorecen la depurinización del ADN (y consiguiente rotura de la molécula); mientras que temperaturas altas de entre 35-40°C y valores de pH cercanos a la neutralidad, minimizan la autólisis enzimática, favoreciendo la preservación del ADN. Todos estos factores han podido provocar que, muestras como las recuperadas en los yacimientos de Aizpea (6.000 años de antigüedad) y de SJAPL (5.000 años de antigüedad), presenten un rendimiento mayor que otras no tan antiguas, como por ejemplo, las de la necrópolis de Aldaieta (s. VI-VII).

Un aspecto importante de la amplificación por PCR, que hay que tener en cuenta para la interpretación de los resultados, es el fenómeno de la pérdida alélica, debido a una amplificación preferencial del alelo más corto. En otros trabajos también se ha de-

mostrado la pérdida de uno de los alelos debido al estado degradado del ADN (ZIERDT et al., 1996; VERNESI et al. (1999a, b). Mientras que la presencia única del alelo más largo (112 pb de longitud), no imposibilita la determinación del sexo, ya que es exclusivo del cromosoma Y, la presencia de únicamente el alelo más corto (106 pb) puede conducirnos erróneamente a considerar como mujer una muestra perteneciente a un hombre, pero que haya perdido el alelo más largo, debido a un fallo durante la amplificación.

Dada la posibilidad de que la degradación del ADN provoque la pérdida del alelo más largo, no podríamos establecer con certeza la asignación de una muestra al sexo femenino, ya que podría tratarse simplemente de un falso negativo. Por ello, hemos considerado que una posible forma, por ahora, de asignar con fiabilidad el sexo femenino molecularmente, en muestras antiguas, es mediante la confirmación del resultado mediante múltiples repeticiones del análisis en la misma muestra, en combinación con el análisis de dos muestras independientes del mismo individuo.

En la Tabla 3 se presentan los resultados obtenidos en las muestras analizadas en este trabajo. Primeramente, observamos tipajes concordantes en las 12 muestras analizadas por duplicado (Igl.1A-B; Igl.3A-B; CAER.4A-B; CAER.6A-B; CAER.7A-B; CAER.8A-B; CAER.10A-B; CAER.12A-B; CAER.13A-B; SJ.28A-b; SJ.29A-B; SJ.30A-B).

En el caso de la necrópolis de Aldaieta, el sexo de los esqueletos se había estimado previamente mediante el análisis de los caracteres antropológicos utilizados normalmente para la asignación del sexo a nivel morfológico (datos no publicados). Esta estimación morfológica se ha contrastado, en algunos casos, con datos arqueológicos, como los ajuares (AZKARATE, 2000). El análisis molecular de las muestras de Aldaieta ha proporcionado resultados relativa-

mente satisfactorios, ya que a pesar del bajo rendimiento obtenido (Tabla 2), en los casos en los que ha sido posible estimar el sexo a nivel molecular, el tipaje obtenido coincide con el inferido mediante las técnicas antropológicas clásicas. Una excepción ha sido la muestra Ald.27, que puede plantear una discusión interesante ya que morfológicamente se ha clasificado como mujer, y a nivel molecular presenta dos bandas (106/112 pb de longitud), que clasifican a este individuo como hombre. No obstante, hay que tener en cuenta que, primero, el estado de preservación de esta muestra es muy pobre, ya que tan sólo se ha logrado un único amplificado positivo de un total de 6 intentos; y en segundo lugar, que la estimación del sexo a nivel morfológico no tiene una fiabilidad del 100%, pudiendo tratarse de un hombre que presentara rasgos morfológicos dentro del rango de las mujeres. Esta cuestión podrá discutirse cuando estén más elaborados los datos proporcionados por la arqueología y la antropología.

En conclusión, los resultados obtenidos en este trabajo, indican que es posible la determinación del sexo en restos esqueléticos, mediante técnicas moleculares, aunque su rendimiento puede verse reducido en función del estado de preservación de las muestras. Estas técnicas nos abren la posibilidad de determinar el sexo, incluso de aquellos restos muy fragmentados o de individuos infantiles, y nos permiten recuperar la información de restos humanos, en ocasiones de gran relevancia antropológica, que de otro modo no podrían ser considerados.

Agradecimientos

Este trabajo se ha realizado gracias a la financiación recibida de sendos proyectos de la Universidad del País Vasco (UPV 154.310-EA008/98) y UPV 00154.310-EA-8/30/2000 del MCYT (BOS2000-048).

Tabla 3. Resultados de la amplificación del gen de la amelogenina en las muestras esqueléticas analizadas en este trabajo

Muestra	n° PCR	106*	106/112**	Estimación sexo (morfológica)	Estimación sexo (molecular)
URRATXA					
Urra-1	4	4	0		Femenino
Urra-2	4	3	1		Masculino
Urra-3	4	1	0		N.D.
Urra-4	4	0	0		N.D.
Urra-5	4	2	0		Femenino?
AIZPEA	4	4	0	Mujer	Femenino
IGLESIAS					
Igl-1A	6	4	0		Femenino
Igl-1B	6	0	0		N.D.
Igl-2	6	6	0		Femenino
Igl-3A	6	0	6		Masculino
Igl-3B	6	0	6		Masculino

Tabla 3 continuación

Muestra	nº PCR	106*	106/112**	Estimación sexo (morfológica)	Estimación sexo (molecular)
CAER					
4A	6	1	0	Mujer	Femenino?
4B	6	2	0	Mujer	Femenino?
5	4	3	0	Mujer	Femenino
6A	4	4	0	Mujer	Femenino
6B	4	4	0	Mujer	Femenino
7A	6	5	0	Mujer	Femenino
7B	6	3	0	Mujer	Femenino
8A	6	5	0	Mujer	Femenino
8B	6	6	0	Mujer	Femenino
9	6	4	0	Mujer	Femenino
10A	4	3	0	Mujer	Femenino
10B	4	3	0	Mujer	Femenino
11	4	3	0	Mujer	Femenino
12A	4	4	0	Mujer	Femenino
12B	4	4	0	Mujer	Femenino
13A	4	3	0	Mujer	Femenino
13B	4	2	0	Mujer	Femenino
14	4	4	0	Mujer	Femenino
15	4	4	0	Mujer	Femenino
16	4	3	0	Mujer	Femenino
17	4	3	0	Mujer	Femenino
SJAPL					
SJ-28A	4	2	2		Masculino
SJ-28B	4	0	4		Masculino
SJ-29A	4	0	0		N.D.
SJ-29B	4	2	2		Masculino
SJ-30A	4	0	4		Masculino
SJ-30B	4	0	4		Masculino
SJ-1	6	0	0		N.D.
SJ-2	6	4	0		Femenino
SJ-3	6	2	0		N.D.
SJ-4	6	5	0		Femenino
SJ-5	6	3	2		Masculino
SJ-6	6	2	0		N.D.
SJ-7	6	2	0		N.D.
SJ-8	6	2	0		N.D.
SJ-9	6	5	0		Femenino
SJ-10	6	0	0		N.D.
SJ-11	6	2	0		N.D.
SJ-12	6	0	0		N.D.
SJ-13	6	0	0		N.D.
SJ-14	6	0	0		N.D.
SJ-15	6	0	4		Masculino
SJ-16	6	0	0		N.D.
ALDAIETA					
Ald-20	6	4	0	Mujer	Femenino
Ald-22	6	0	0	Hombre	N.D.
Ald-23	6	1	0	Hombre	N.D.
Ald-25	6	2	1	Hombre	Masculino
Ald-26	6	1	0	Hombre	N.D.
Ald-27	6	0	1	Mujer	N.D.
Ald-28	6	2	0	Mujer	N.D.
Ald-29	6	0	0	Hombre	N.D.
Ald-31	6	2	0	Hombre	N.D.
Ald-32	6	1	0	Hombre	N.D.
Ald-33	6	1	0	Hombre	N.D.
Ald-34	6	0	0	Mujer	N.D.
Ald-35	6	0	0	Mujer	N.D.
Ald-37	6	1	2	Hombre	Masculino
Ald-38	6	0	0	Mujer	N.D.
Ald-39	6	0	0	Mujer	N.D.
Ald-40	6	2	0	Mujer	N.D.

nº PCR, nº de veces que se ha amplificado cada muestra

* , 106 (tamaño del ADN amplificado en pares de bases): nº de amplificados que han dado únicamente la banda de 106 pb

** , 106/112 (tamaño del ADN amplificado de 106 pb (correspondiente al cromosoma X) y de 112 pb (correspondiente al cromosoma Y)): nº de amplificados que han dado dos bandas, de 106 pb y de 112 pb.

IGLESIAS (Igl): restos humanos del siglo XVIII. CAER: colección antropológica de época reciente.

IV. BIBLIOGRAFIA

- AASEN, E. & MEDRANO, J.F.
1990 Amplification of the ZFY and ZFX genes for sex identification in humans, cattle, sheep and goats. *Biotechnology 8*: 1279-1281
- ACSÁDY, G. & NEMESKÉRY, J.
1970 *History of human life span and mortality*. Akadémiai Kiadó, Budapest.
- AKANE, A.; SEKI, S.; SHINONO, H.; NAKAMURA, H. & HASEGAWA, M.
1992 Sex determination of forensic samples by dual PCR amplification of an X-Y homologous gene. *Forensic Science International 52*: 143-148
- AZKARATE, A.
2000 La Necrópolis tardoantigua de Aldaieta. Volumen I. Memoria de la excavación e inventario de los hallazgos (Nuncares de Gamboa, Alava). *Memorias de yacimientos alaveses 6*, pp 536.
- COOPER A.
1994 *DNA from museum specimens*. In *Ancient DNA. Recovery and Analysis of Genetic Material from Paleontological, Archaeological, Museum, Medical, and Forensic Specimen*. HERRMANN B., HUMMEL S. (eds) New York: Springer-Verlag, pp. 149-165
- CUI, K.-H.; WARNES, G.M.; JEFFREY, R. & MATHEWS, C.D.
1994 Sex determination of preimplantation embryos by human testis-determining-gene amplification. *Lancet 343*: 79-82
- DORAN, G.H.; DICKEL, D.N.; BALLINGER, W.E.JR.; AGEE, O.F.; LAIPIS, P.J. & HAUSWIRTH, W.W.
1986 Anatomical, cellular and molecular analysis of 8,000-year old human brain tissue from the Windover archaeological site. *Nature 323*: 803-806
- FAERMAN, M.; FILON, D.; KAHILA, G.; GREENBLATT, C.L.; SMITH, P. & OPPENHEIM, A.
1995 Sex identification of archaeological human remains based on amplification of the X and Y amelogenin alleles. *Gene 167*: 327-332
- GINTHER, C.; ISSEL-TARVER, L. & KING, M.C.
1992 Identifying individuals by sequencing mitochondrial DNA from teeth. *Nature Genetics 2*: 135-138
- HAGELBERG, E. & CLEGG, J.B.
1991 Isolation and characterization of DNA from archaeological bone. *Proceeding of the Royal Society of London B 244*: 45-50
- HAGELBERG, E.; SYKES, B. & HEDGES, R.
1989 Ancient bone DNA amplified. *Nature 342*: 485
- HANDYSIDE, A.H.; KONTOGIANNI, E.H.; HARDY, K. & WINSTON, R.M.L.
1990 Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature 344*: 768-770
- HORAI, S.; HAYASAKA, K.; MURAYAMA, K.; WATE, N.; KOIKE, H. & NAKAI, N.
1989 DNA amplification from ancient human skeletal remains and their sequence analysis. *Proceedings of Japan Academy, Series B 65 (b) (10)*: 229-233
- HUMMEL, S. & HERRMANN, B.
1991 Y-chromosome-specific DNA amplified in ancient human bone. *Naturwissenschaften 78*: 266-267
- IZAGIRRE, N.; DURAN, L.M. & DE LA RÚA, C.
1998 Genética y Arqueología: análisis molecular de ADN procedente de restos esqueléticos. *Munibe (Antropología-Arqueología) 50*: 3-14
- IZAGIRRE, N & DE LA RÚA, C.
1999 An mtDNA analysis in ancient Basque populations: implications for haplogroup V as a marker for a major Paleolithic expansion from Southwestern Europe. *American Journal of Human Genetics 65*: 199-207
- 2000 Aportación de la biología molecular en el estudio antropológico de las poblaciones humanas del pasado: análisis del ADN mitocondrial. *Revista Española de Antropología Biológica 21*, 1-10.
- NAKAHORY, Y.; MITANI, K.; YAMADA, M. & NAKAGONE, Y.
1986 A human Y-chromosome specific repeated DNA family (DYZ1) consist of a tandem array of pentanucleotides. *Nucleic Acids Research 14*: 7569-7580
- NAHORI, Y.; TAKENAKA, O. & NAKAGOME, Y.
1991 A human X-Y homologous region encodes "amelogenin". *Genomics 9*: 264-269
- LASSEN, C.; HUMMEL, S. & HERRMANN, B.
1996 PCR based sex identification of ancient human bones by amplification of X- and Y-chromosomal sequences: a comparison. *Ancient Biomolecules 1*: 25-33
- LINDAHL, T.
1993 Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature 362*: 709-715
- PÄÄBO, S.; GIFFORD, J. & WILSON, A.C.
1988 Mitochondrial DNA sequences from a 7000-year old brain. *Nucleic Acids Research 16*: 9775-9787
- ST. HOYME, L.E. & ISCAN, M.Y.
1989 *Determination of sex and race: accuracy and assumptions*. In: ISCAN M.Y., KENNEDY K.A.R. (Eds) *Reconstruction of life from the skeleton*. Liss, New York, p. 53-93
- STONE, A.C.; MILNER, G.R.; PÄÄBO, S. & STONEKING, M.
1996 Sex determination of ancient human skeletons using DNA. *American Journal of Physical Anthropology. 99*: 231-238.
- TUROSS, N.
1994 The biochemistry of ancient DNA in bone. *Experientia 50*: 530-535

VERNESI, C.; CARAMELLI, D.; CARBONELL, I.; SALA, S.; UBALDI, M.; ROLLO, F. & CHIARELLI, B.

1999 Application of DNA sex tests to bone specimens from three Etruscan (VII-VI Century B.C.) archaeological sites. *Ancient Biomolecules 2*: 2985-305

VERNESI, C.; CARAMELLI, D.; CARBONELL, S. & CHIARELLI, B.

1999 Molecular sex determination of Etruscan bone samples (7th-3rd c. B.C.): a reliability study. *Homo 50*: 118-126

ZIERDT, H.; HUMMEL, S. & HERRMANN, B.

1996 Amplification of human short tandem repeats from medieval teeth and bone samples. *Human Biology 68*: 185-199.