

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
DPTO. GENÉTICA, ANTROPOLOGÍA FÍSICA Y
FISIOLOGÍA ANIMAL

TESIS **D**OCTORAL

VARIACIÓN TEMPORAL DEL ADN_{mt} EN
POBLACIONES DE LA CORNISA CANTÁBRICA.
Contribución del ADN antiguo

MONTSERRAT **H**ERVELLA **A**FONSO

Directoras:

Dra. CONCEPCIÓN DE LA RÚA

Dra. NESKUTS IZAGIRRE

AGRADECIMIENTOS

Resulta un grato deber poner de manifiesto en estas líneas la colaboración recibida durante la elaboración de este trabajo. La Catedrática Conchi de la Rúa y la Doctora Neskuts Izagirre de la UPV/EHU han constituido un pilar básico en este estudio y en mi carrera profesional, me han enseñado el mundo de la ciencia y de la investigación, depositando en mi su confianza y dandome la oportunidad de realizar este estudio. El entusiasmo, la dedicación, el esfuerzo, la ayuda y el ánimo depositado en mí ha influido de forma muy positiva para que este trabajo salga a la luz, por ello plasmo en estas líneas mi reconocimiento y agradecimiento por su gran labor. Quiero extender mi agradecimiento al Doctor Santos Alonso, por su inestimable ayuda, por tener siempre una respuesta a mis dudas, por sus consejos, sugerencias y aportaciones.

El profesor Vicente Cabrera y su grupo de investigación, en especial Rosa Irene Fregel, de la Universidad de La Laguna Tenerife, nos han ayudado realizando la replicación de las muestras de este trabajo en su laboratorio, asimismo en todo momento nos han mostrado su ayuda con sus sugerencias y aportaciones a este estudio.

Esta investigación no hubiese sido posible sin la cesión del material antropológico de los diferentes yacimientos prehistóricos estudiados, por ello, agradezco a Jesús Sesma, Jesús García-Gazolaz y al Gobierno de Navarra la información y acceso a las muestras de los yacimientos de Paternanbidea y Los Cascajos. A Jesús Altuna y Koro Mariezkurrena del Centro de Patrimonio Arqueológico y Paleontológico de Guipúzcoa, por las facilidades para acceder a las muestras de los yacimientos prehistóricos de Guipúzcoa (Erralla, Marizulo y Urtiaga). A Ana Cava e Ignacio Barandiarán por las muestras del yacimiento de Aizpea (Navarra). Al Museo Arqueológico de Álava por el acceso a las muestras del yacimiento de Fuente Hoz y al Museo de Prehistoria y Arqueología de Cantabria, por las muestras de La cueva de La Chora y La Pasiega. A Alfonso Alday por sus comentarios sobre aspectos arqueológicos de las sociedades neolíticas.

Por último, este estudio se ha realizado gracias a la subvención del Gobierno Vasco a grupos consolidados (GIC07/43), al Ministerio de Ciencia y Tecnología, por la financiación del proyecto de investigación “Herencia Biológica de la Neolitización: análisis genético de poblaciones del Neolítico antiguo del Valle de Ebro” (CGL2004-03300) y por la concesión de una beca de postgrado para la Formación de Personal Investigador (BES-2005-6925), de la cual he disfrutado entre los años 2005 y 2009.

A Beni
A mi familia

ÍNDICE

| | Pag |
|---|-----------|
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| I.1. ADN ANTIGUO | 3 |
| I.1.1. CAUSAS Y EFECTOS DE LA DEGRADACIÓN DEL ADN _a | 7 |
| I.1.2. LA CONTAMINACIÓN DEL ADN _a | 11 |
| I.2. ADN MITOCONDRIAL | 14 |
| I.2.1. CARACTERÍSTICAS DEL ADN _{mt} | 16 |
| I.2.2. VARIABILIDAD DEL ADN _{mt} | 19 |
| I.3. LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE LA POBLACIÓN EUROPEA ACTUAL | 23 |
| I.3.1. COLONIZACIÓN DE EUROPA POR HSAM | 23 |
| I.3.2. REEXPANSIÓN EN EUROPA TRAS LA ÚLTIMA GLACIACIÓN | 31 |
| I.3.3. LA DIFUSIÓN DEL NEOLÍTICO | 32 |
| I.3.3. MOVIMIENTOS POBLACIONALES POST-NEOLÍTICOS | 53 |
| I.4. LA VARIACIÓN GENÉTICA DE LA POBLACIÓN DEL PAÍS VASCO | 54 |
| II. OBJETIVOS | 59 |
| III. MATERIAL | 63 |
| III.1. PERIODO MAGDALENIENSE | 65 |
| III.1.1. CUEVA DE LA CHORA (PUENTE VIESGO, CANTABRIA) | 66 |
| III.1.2. CUEVA DE LA PASIEGA (SAN PANTALEÓN DE ARAS, CANTABRIA) | 66 |
| III.1.3. YACIMIENTO DE ERRALLA (CESTONA, GUIPÚZCOA) | 67 |

| | |
|---|------------|
| III.2. MESOLÍTICO: | |
| YACIMIENTO DE AIZPEA (ARIBE, NAVARRA) | 67 |
| III.3. NEOLÍTICO | 68 |
| III.3.2 YACIMIENTO DE LOS CASCAJOS (LOS ARCOS, NAVARRA) | 69 |
| III.3.1 YACIMIENTO DE PATERNANBIDEA (IBERO, NAVARRA) | 73 |
| III.3.3 LA CUEVA DE MARIZULO (URNIETA, GUIPÚZCOA) | 75 |
| III.3.4 LA CUEVA DE FUENTE HOZ (ANÚCITA, ÁLAVA) | 77 |
| III.4. EDAD DEL BRONCE: URTIAGA (DEBA, GUIPÚZCOA) | 78 |
| IV. METODOLOGÍA | 83 |
| IV.1. ANÁLISIS MOLECULAR DE MUESTRAS PREHISTÓRICAS | 85 |
| IV.1.1. SELECCIÓN DE LAS MUESTRAS | 85 |
| IV.1.2. LIMPIEZA Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS | 87 |
| IV.1.2.1. <i>Procesamiento de las piezas dentarias: limpieza y serrado</i> | 88 |
| IV.1.2.2. <i>Procesamiento del tejido óseo: limpieza y pulverización</i> | 89 |
| IV.1.3. EXTRACCIÓN DEL ADN | 91 |
| IV.1.4. CUANTIFICACIÓN DEL ADN: PCR CUANTITATIVA | 94 |
| IV.1.5. ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD DEL ADN _{mt} | 99 |
| IV.1.5.1. <i>Secuenciación del HVS-I</i> | 99 |
| IV.1.5.2. <i>Secuenciación del HVS-II</i> | 103 |
| IV.1.5.3. <i>Clonación de muestras problemáticas</i> | 104 |
| IV.1.5.4. <i>Análisis de la variabilidad del genoma mitocondrial mediante RFLPs</i> | 109 |

| | |
|---|------------|
| IV.1.6. AUTENTIFICACIÓN DE LOS RESULTADOS DE ADN ANTIGUO | 113 |
| IV.1.6.1. Precauciones en el análisis de ADN antiguo | 114 |
| IV.1.6.2. Criterios de autentificación | 115 |
| IV.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS | 120 |
| V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 129 |
| V.1 EL YACIMIENTO NEOLÍTICO DE LOS CASCAJOS (LOS ARCOS, NAVARRA) | 131 |
| V.1.1 INTRODUCCIÓN | 133 |
| V.1.2 MATERIAL Y METODOS | 141 |
| V.1.3 RESULTADOS | 143 |
| V.1.3.1 Distribución según sexo y edad | 143 |
| V.1.3.2 Distribución de la variabilidad del ADNmt | 144 |
| V.1.3.3 Análisis multivariante de la diversidad genética y cultural | 156 |
| V.1.4 DISCUSIÓN | 166 |
| V.2 EL YACIMIENTO NEOLÍTICO DE PATERNANBIDEA (IBERO, NAVARRA) | 181 |
| V.2.1 INTRODUCCIÓN | 183 |
| V.2.2 MATERIAL Y METODOS | 192 |
| V.2.3 RESULTADOS | 194 |
| V.2.4. DISCUSIÓN | 198 |
| V.3. VARIABILIDAD GENÉTICA DE YACIMIENTOS PREHISTÓRICOS DE LA CORNISA CANTÁBRICA | 203 |
| V.3.1 INTRODUCCIÓN | 205 |

| | |
|--|------------|
| V.3.2 MATERIAL Y METODOS | 213 |
| V.3.3 RESULTADOS | 215 |
| V.3.3.1 <i>Análisis de la variabilidad del ADNmt de muestras prehistóricas</i> | 215 |
| V.3.3.2 <i>Análisis de la variabilidad de haplogrupos mitocondriales de poblaciones actuales y prehistóricas</i> | 228 |
| V.3.4 DISCUSIÓN | 248 |
| VI. RESUMEN Y CONCLUSIONES | 273 |
| VII. BIBLIOGRAFIA | 297 |
| ANEXO I | |

I. INTRODUCCIÓN

I.1. ADN ANTIGUO

A principios de la década de los 80, se publicaron los primeros trabajos donde se recuperaba e incluso se analizaba el ADN de restos de organismos extintos (ADN antiguo, ADN_a) (HIGUCHI *et al.*, 1984, PÄÄBO, 1985). Posteriores estudios demostraron la presencia de ADN en los restos de diversos organismos de gran antigüedad, como el caso de fósiles de dinosaurios, insectos preservados en ámbar, fósiles de hojas de magnolia, restos óseos o restos dentarios (HAGELBERG *et al.*, 1989; HÄNNI *et al.*, 1990; GOLENBERG *et al.*, 1990; CANO *et al.*, 1993; WOOWARD *et al.*, 1994). Al optimismo de estos trabajos que tuvieron un enorme impacto en la comunidad científica, le siguió una etapa de escepticismo (PÄÄBO y WILSON 1991; ZISCHLER *et al.*, 1995), debido a la dificultad de reproducir algunos trabajos como el del ADN de cloroplastos de plantas fósiles del Mioceno (GOLENBERG *et al.*, 1990), el ADN de insectos preservados en ámbar (CANO *et al.*, 1993) o el ADN mitocondrial (ADN_{mt}) de dinosaurios del Cretácico (WOOWARD *et al.*, 1994).

La información que se obtiene del ADN_a es muy útil, ya que permite resolver cuestiones relacionadas con distintos campos de la ciencia (Figura I.1):

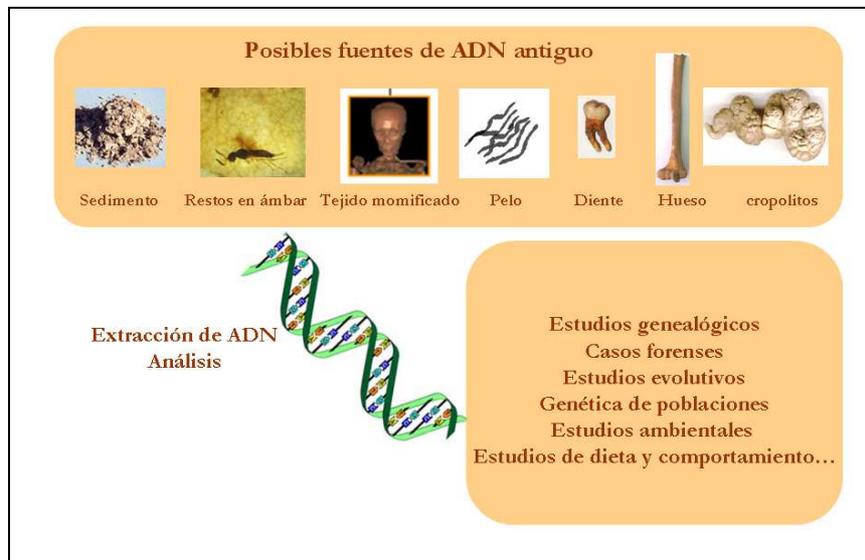
- La reconstrucción de la historia evolutiva y demográfica de las poblaciones antiguas mediante su caracterización genética (ALZUALDE *et al.*, 2005, 2006, 2007; HAAK *et al.*, 2005; SAMPIETRO *et al.*, 2005, 2007; MACA-MEYER *et al.*, 2005; CASAS *et al.*, 2006; FREGEL *et al.*, 2009a, 2009b; BRAMANTI *et al.*, 2009; MALMSTRÖM *et al.*, 2009; GHIROTTI *et al.*, 2010).

- La reconstrucción de las filogenias entre las especies extintas y sus parientes actuales más cercanos, como por ejemplo el caso de los neandertales y *Homo sapiens* anatómicamente moderno (HSAM) (KRINGS *et al.*, 1997; 2000; OVCHINNIKOV *et al.*, 2000; HÖSS *et al.*, 2000; SCHMITZ *et al.*, 2002; SERRE *et al.*, 2004; LALUEZA-FOX *et al.*, 2005; 2006; 2007; CARAMELLI *et al.*, 2006; ORLANDO *et al.*, 2006; DALTON, 2006; DELSON y HARVATI, 2006; FINLAYSON *et al.*, 2006; KRAUSE *et al.*, 2006; FORHAN *et al.*, 2008; GREEN *et al.*, 2006; NOONAN *et al.*, 2006).
- Estudios de la dieta y el comportamiento de las especies extintas (HÖSS *et al.*, 1992; HOFREITER *et al.*, 2000).
- Estudios ambientales basados en la extracción de ADN de organismos macroscópicamente indetectables en el sedimento (HOFREITER *et al.*, 2000).
- Identificación de patógenos en los restos óseos recuperados, como pueden ser *Mycobacterium tuberculosis* (ARRIAZA *et al.*, 1995), *Mycobacterium leprea* (MONTIEL *et al.*, 2003). *Yersinia pestis* (DRANCOURT *et al.*, 1998)
- Estimación del sexo y las relaciones familiares entre distintos individuos de un mismo yacimiento (ALZUALDE *et al.*, 2007; FERNÁNDEZ *et al.*, 2008).
- Análisis de la flora y la fauna, así como el origen de su domesticación (VIGNE *et al.*, 2009; LIRA *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2010).

En el primer estudio basado en ADN_a (HIGUCHI *et al.*, 1984), se recuperó el ADN de *Equus quagga*, un équido del Sur de África

extinguido hace aproximadamente unos 140 años. Se compararon los resultados obtenidos del *Equus quagga*, con otros équidos próximos filogenéticamente (cebra, vaca y caballo), observándose una relación más estrecha entre esta especie y las cebras. Un año después de la publicación de este estudio, PÄÄBO (1985) logró recuperar ADN de restos humanos momificados, de mayor antigüedad 2.500 años.

Figura I.1. ADN antiguo. Material de partida y aplicaciones



El desarrollo de la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa; *Polymerase Chain Reaction*) (MULLIS *et al.*, 1986; 1987), supuso una enorme ventaja frente a otras metodologías que se venían utilizando hasta entonces (como por ejemplo la clonación), debido a su capacidad de obtener millones de copias a partir de incluso una única molécula de ADN. Así, gracias a la técnica de la PCR, fue posible analizar el ADN recuperado de tejido óseo y dentario (HAGELBERG y CLEGG, 1991; HÄNNI *et. al.*, 1990),

mucho más numerosos en museos y colecciones arqueológicas, lo que permitió llevar a cabo estudios a nivel poblacional.

Sin embargo, esta ventaja que presenta la PCR es, asimismo, su principal inconveniente, ya que es posible amplificar cualquier molécula de ADN actual que contamine las muestras antiguas, aunque estén en una proporción inferior. En un corto periodo de tiempo se hizo evidente el alto riesgo de contaminación de las muestras antiguas, debido sobre todo a la mala preservación del ADN, favoreciendo la amplificación de cualquier posible ADN contaminante presente en el extracto de ADN.

A medida que se publicaban los trabajos de ADN, también surgían dudas a cerca de la fiabilidad de los resultados. PÄÄBO (1989) y PÄÄBO *et al.* (1989) describieron las principales características del ADN y señaló las principales dificultades a la hora de trabajar con este tipo de material genético: la poca cantidad de moléculas de ADN, la fragmentación del ADN y las secuencias dañadas debido a la presencia de modificaciones moleculares e inhibidores de la PCR (PÄÄBO, 1989; PÄÄBO *et al.*, 1989; LINDAHL, 1993). Debido a ello, propuso una serie de precauciones y criterios de autenticación para minimizar y detectar la posible contaminación del ADN, criterios que se han ido ampliando durante las últimas décadas (PÄÄBO, 1989; PÄÄBO *et al.*, 1989; 2004; HANDT *et al.*, 1994; COOPER, 1994; COOPER y POINAR, 2000; POINAR *et al.*, 1996; HOFREITER *et al.*, 2001; MONTIEL *et al.*, 2001; BANDELT, 2005; GILBERT *et al.*, 2003; GILBERT, 2005; GILBERT *et al.*, 2005; GILBERT y WILLERSLEV, 2006; WILLERSLEV *et al.*, 2004, WILLERSLEV y COOPER, 2005; FREGEL *et al.*, 2009b).

1.1.1. Causas y efectos de la degradación del ADN

Cuando un organismo muere, comienza el proceso de degradación de sus biomoléculas, entre ellas el ADN, debido a la liberación de enzimas autolíticas de los lisosomas, entre las cuales se incluyen las endonucleasas y las exonucleasas. A continuación, las bacterias y hongos continúan con el proceso de descomposición y finalmente, los procesos de hidrólisis y de oxidación completan la degradación del material genético (HÖSS *et al.*, 1994, 1996; HANDT *et al.*, 1994).

a) Hidrólisis

La hidrólisis provoca la ruptura directa de los enlaces fosfodiéster (unión entre desoxirribosas) y los enlaces N-glicosílicos (unión de las desoxirribosas con las bases nitrogenadas). La ruptura de los enlaces fosfodiéster, provoca la fragmentación del ADN, razón por la que es difícil encontrar fragmentos >150 pares de bases (pb) de longitud en la mayoría de los extractos de ADN.

Por otro lado, la ruptura del enlace N-glicosílico da lugar a una posición sin base, proceso denominado “*despurinización*” cuando las bases son púricas y “*despiriminización*” cuando las bases son pirimidínicas. A consecuencia de ello, el ADN queda debilitado produciéndose la ruptura de éste en esa posición. Además la *Taq* polimerasa es incapaz de seguir leyendo a partir de ese nucleótido *despurinizado* o *despiriminizado* (HOFREITER *et al.*, 2001a, 2001b; WILLERSLEV *et al.*, 2005; WILLERSLEV y COOPER, 2005; GILBERT *et al.*, 2003, 2005; GILBERT y WILLERSLEV, 2006; HEBSGAARD *et al.*, 2005) (Figura I.2a).

La desaminación hidrolítica es otro mecanismo de degradación del ADN, que provoca un proceso de mutagénesis espontánea al cambiar una citosina (C) por un uracilo (U) y una timina (T) por una 5-metilcitosina. Asimismo, aunque con una tasa menor, también ocurre el cambio de una adenina (A) por una hipoxantina, un análogo de la guanina (G), y de la guanina (G) por la xantina, un análogo de la adenina (A) (HOFREITER *et al.*, 2000a, 2001b; WILLERSLEV *et al.*, 2005; WILLERSLEV y COOPER, 2005; GILBERT *et al.*, 2003, 2005; GILBERT y WILLERSLEV, 2006; HEBGAARD *et al.*, 2005) (Figura I.2a).

b) Oxidación

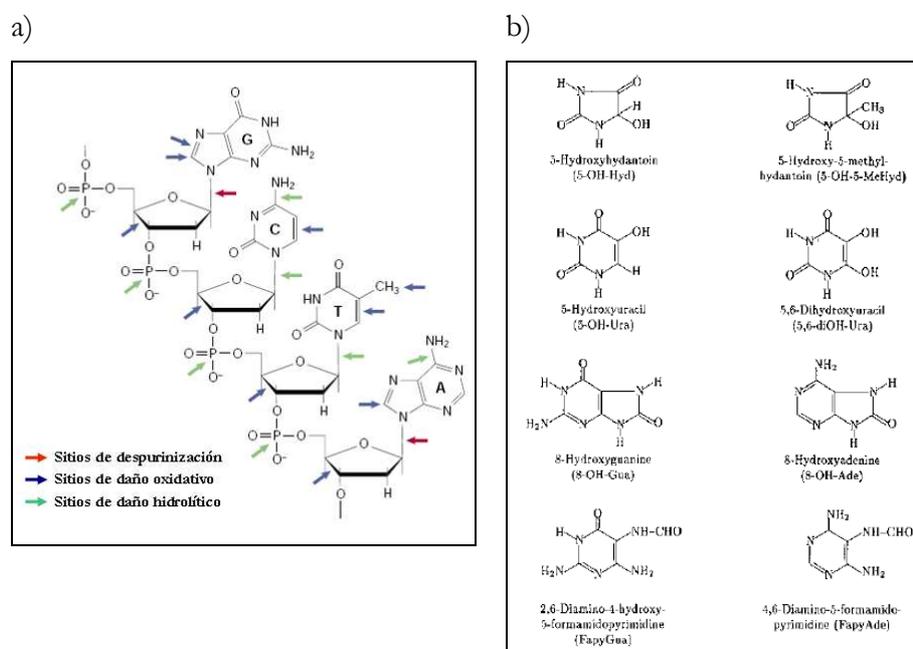
Los radicales libres (superóxido $[O_2^+]$, peróxido de hidrógeno $[H_2O_2]$ e hidroxilo $[OH]$), provocan la oxidación del ADN. A consecuencia de esta oxidación, se producen modificaciones en los azúcares, transformaciones pirimidínicas, posiciones abásicas y puentes cruzados, que inducen el bloqueo de la *Taq* polimerasa durante la fase de extensión de la reacción de amplificación (HÖSS *et al.*, 1994, 1996).

La mayoría de los cambios oxidativos, consisten en la transformación de las bases pirimidínicas (Citosina (C) y Timina (T)) en 5-hidroxi-5-metilhidantoína, así como la transformación de las bases púricas (Guanina (G) y Adenina (A)) en 8-hidroxi-8-oxiguanosina (HÖSS *et al.*, 1994; 1996) (Figura I.2b).

Las transformaciones en las bases pirimidínicas inhiben la acción de la *Taq* polimerasa y en el caso de las transformaciones en las bases púricas, provocan la incorporación de un nucleótido incorrecto en la fase de extensión de la PCR. (HOFREITER *et al.*, 2000a, 2001b; WILLERSLEV *et al.*,

2005; WILLERSLEV y COOPER, 2005; GILBERT *et al.*, 2003, 2005; GILBERT y WILLERSLEV, 2006; HEBSGAARD *et al.*, 2005). Todas estas lesiones que degradan el ADN, provocadas por la oxidación e hidrólisis, pueden ser detectadas y estimadas mediante análisis estadísticos e inferencia bayesiana (SPENCER y HOWE, 2004; HO *et al.*, 2007).

Figura I.2. Daño oxidativo e hidrolítico del ADN. a) Lugares de acción de los procesos de hidrólisis y oxidación. b) Transformación de las bases púricas y pirimidínicas tras el proceso de oxidación. (Figuras modificadas de HOPREITER *et al.*, 2001a y HÖSS *et al.*, 1996)



c) Condiciones de enterramiento

Existen otros factores, que se mencionan a continuación, que influyen en la preservación del ADN de restos antiguos y que actúan de forma conjunta.

-Temperatura

La temperatura es un factor que condiciona la preservación del ADN. Las bajas temperaturas ayudan a que el material genético se conserve de forma óptima, ya que las reacciones bioquímicas que degradan el ADN se ralentizan (LINDAHL, 1993; BURGER *et al.*, 1999). Por el contrario, a altas temperaturas, obtendremos una mala preservación del ADN. HÖSS *et al.* (1996), determinaron que la reducción de la temperatura a 20°C, disminuía entre 10-25 veces la tasa de las reacciones de degradación. Sin embargo, también se ha observado que las elevadas temperaturas a las que se ven sometidos algunos inhumados (momias), favorecen la deshidratación parcial del ADN, impidiendo que una parte de los procesos de hidrólisis tengan lugar. Además, si a esto le sumamos la ausencia de oxígeno que pueda reaccionar con el ADN, se favorece la conservación del ADN (LINDAHL, 1993).

-Humedad

La humedad ejerce un efecto negativo en la conservación del ADN, ya que permite la filtración de sustancias del sedimento a los restos antiguos, lo cual puede provocar la inhibición de la PCR. Asimismo, la humedad, favorece las reacciones de hidrólisis y de oxidación, cuyas consecuencias ya han sido mencionadas (BURGER *et al.* 1999).

-El pH

Si el pH del sedimento en el que se encuentran enterrados los restos, es neutro o ligeramente alcalino, se favorece la preservación del ADN (LINDAHL, 1993). Las altas concentraciones de sal, cuarzo y ácido húmico, favorecen su unión al ADN, de modo que el ADN quedaría

protegido frente a la acción de las enzimas líticas que lo degradarían; aunque por otro lado, estas sustancias también son elementos que actuarían como inhibidores de la *Taq* polimerasa.

Por lo tanto, bajo ciertas condiciones de enterramiento, se puede afirmar que la degradación del material genético puede llegar a retrasarse. Aquellas condiciones en las que la concentración salina es cercana a la fisiológica, la temperatura oscila alrededor de los 15 °C, y el pH es cercano a la neutralidad, es concebible analizar el ADN recuperado de restos de hasta 100.000 años (LINDHAL, 1993; HOFREITER *et al.*, 2001a).

Por otro lado, el proceso de degradación del ADN puede continuar durante la excavación y almacenamiento de los fósiles (BURGER *et al.*, 1999; PRUVOST *et al.*, 2005). El lavado del material arqueológico, por ejemplo, genera una disminución del pH y del contenido salino. Si a esto le sumamos un almacenamiento durante años a temperatura ambiente, provoca que las muestras conservadas en museos tengan una menor eficiencia de amplificación que el material recién excavado.

1.1.2. La contaminación del ADN

El primero en apuntar el riesgo de la contaminación con ADN exógeno fue PÄÄBO (PÄÄBO, 1989; PÄÄBO *et al.*, 1989). La gran sensibilidad de la PCR hace que, en ausencia o en bajas cantidades de ADN molde endógeno, pueda producirse la amplificación preferencial de ADN intacto, de otra fuente distinta (ADN exógeno). Un ejemplo, son los primeros trabajos en los que se recuperó ADN de organismos con una gran antigüedad (CANO *et al.*, 1993; WOODWARD *et al.*, 1994), siendo este

ADN el resultante de secuencias humanas y/o microbianas que contaminaban las muestras antiguas (ZISCHLER *et al.*, 1995). Pero, ¿cuando se puede producir la contaminación del ADN_a?

El ADN_a se puede contaminar con *ADN exógeno procedente de otros organismos próximos*. Durante el tiempo que el resto permanece enterrado puede producirse la contaminación por el ADN de microorganismos, hongos y fauna putrefacta. La contaminación con ADN de organismos de una especie diferente a la que se pretende estudiar, no tiene por qué representar un gran problema. Si la región a caracterizar está lo suficientemente diferenciada a nivel de especie, gracias al diseño de cebadores específicos y unas condiciones restrictivas de la PCR, se amplificará el ADN endógeno.

En el caso de enterramientos colectivos, los restos pueden contaminarse con el ADN de los organismos enterrados próximos. Sin embargo, dada la baja cantidad de ADN recuperada de los restos antiguos, no parece una fuente de contaminación probable. Además, los restos son sometidos a un proceso abrasivo de limpieza de la superficie externa para eliminar cualquier ADN que se encuentre contaminando la superficie del material.

Sin embargo, la principal fuente de contaminación en los estudios de ADN_a es el *ADN exógeno procedente de humanos actuales*. Este ADN puede contaminar los restos antes, durante y después de su análisis (MÄLMSTRON *et al.*, 2005; BANDELT, 2005; GILBERT y WILLERSLEV, 2006; SAMPIETRO *et al.*, 2005; WILLERSLEV *et al.*, 2007)

El ADN contaminante de origen humano, puede introducirse directamente en la muestra mientras ésta es manipulada por los arqueólogos, el personal del museo o los propios investigadores; por ejemplo, a través de la descamación de la piel o de los aerosoles producidos durante la respiración. Por este motivo el ADN de todo el personal que haya manipulado los restos será analizado para comprobar la posible contaminación de los restos por parte de estas personas (BANDELT, 2005; GILBERT *et al*, 2005).

Asimismo, cuando se trabaja con ADN humano, es adecuado llevar a cabo el análisis de algún resto faunístico asociado a los restos humanos y amplificarlo con los cebadores específicos de humanos. La falta de amplificación de secuencias humanas en los restos faunísticos, indicaría que el proceso de descontaminación de las muestras ha eliminado el posible ADN humano actual contaminante.

Otro vehículo de contaminación puede ser el material y reactivos empleados durante el análisis genético de los restos. Esta contaminación, se puede detectar fácilmente incluyendo los controles correspondientes, a la extracción y a la amplificación (HANDT *et al*, 1994). Estos controles permitirán que detectemos la posible contaminación que habría podido ocurrir durante las etapas de extracción y de la amplificación.

Una fuente importante de contaminación son los amplicones provenientes de los experimentos previos realizados en el laboratorio. La apertura de los tubos que contienen productos de PCR, provocan la contaminación del ambiente del laboratorio.

Este tipo de contaminación se evita utilizando laboratorios independientes, uno para la extracción y preparación de la PCR de ADN_a y otro físicamente aislado del anterior, para analizar los productos de PCR (HOFREITER *et al.*, 2001a, 2001b; GILBERT *et al.*, 2005; BANDELT, 2005).

A pesar de la incorporación de todos estos controles y precauciones, la única manera de asegurarnos que los resultados obtenidos no son fruto de la contaminación, es la extracción de varias muestras del mismo individuo para determinar que se ha obtenido el mismo resultado en todas las réplicas (PÄÄBO, 1989; PÄÄBO *et al.*, 1989; 2004; HOFREITER *et al.*, 2001; BANDELT, 2005; GILBERT *et al.*, 2005).

I.2. ADN MITOCONDRIAL

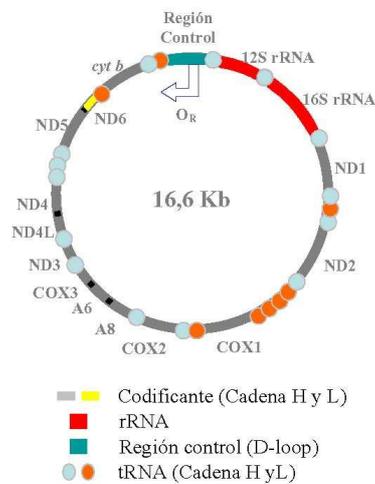
El análisis de los polimorfismos clásicos, en la década de los cincuenta, puso de manifiesto la existencia de variabilidad genética entre y dentro de las poblaciones humanas. Actualmente, el análisis de la variabilidad genética de las poblaciones se lleva a cabo analizando los marcadores moleculares tanto del ADN mitocondrial (ADNmt), como del ADN nuclear. A continuación, se presentan las características y la utilidad del ADNmt, dada su relevancia en los estudios de ADN_a.

El genoma mitocondrial es una pequeña molécula circular (16.569 pb) que se encuentra localizada en el citoplasma celular, en el interior de las mitocondrias y supone el 0,0005% del genoma humano (Figura I.3a). Su secuencia en humanos se conoce desde el año 1981 (ANDERSON *et al.*, 1981).

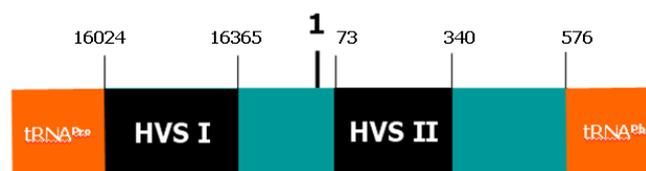
Cerca del 90% del genoma mitocondrial es codificante y contiene la información de 37 genes: 2 ARN ribosómicos, 22 ARN de transferencia y 13 proteínas. De estas 13 proteínas: 7 participan en el complejo I (NADH deshidrogenasa), 3 son componentes del complejo IV (citocromo *c* oxidasa), 2 son subunidades del complejo V (ATP sintetasa) y por último el citocromo *b* que es una subunidad del complejo III. El genoma mitocondrial se completa con una pequeña región no codificante de unas 1.100 pb de longitud, denominada región control, segmento hipervariable (HVS) o *D-loop*, donde se encuentra el origen de replicación del genoma mitocondrial (O_R) (Figura I.3).

Figura I.3. ADN mitocondrial humano. a) Esquema del genoma mitocondrial. b) Región control.

a)



b)



Dentro de la región control del ADNmt se encuentran dos segmentos denominados segmento hipervariable I (HVS-I), que comprende las posiciones nucleotídicas 16.024-16.365 y el segmento hipervariable II (HVS-II), que comprende las posiciones nucleotídicas 73-340. El primero tiene mayor variabilidad, por ello es más utilizado en los estudios poblacionales (Figura I.3b).

1.2.1. Características del ADNmt

Las siguientes características del ADNmt, hacen que sea un marcador especialmente útil para los estudios de evolución humana.

- ***Poliplasmía.***

El ADNmt presenta un elevado número de copias por célula eucariota. Una mitocondria puede contener entre 2-10 moléculas de ADNmt, por lo tanto el número de copias por célula eucariota, oscila entre 1.000-10.000 (MALYARCHUK *et al.*, 2002), facilitando así, su supervivencia y recuperación, lo cual es una enorme ventaja cuando se trabaja con ADN_a.

- ***Elevada tasa de mutación***

El ADNmt presenta una elevada tasa de mutación, de 5-10 veces superior al estimado para el ADN nuclear (BROWN, 1980; INGMAN *et al.*, 2000; PAKENDORF *et al.*, 2005). Esto es debido a la ausencia de histonas que lo protejan, como en el caso del ADN nuclear, se encuentra continuamente expuesto a los radicales libres generados en el metabolismo oxidativo de las mitocondrias. Por otro lado, el genoma mitocondrial tampoco presenta un sistema eficaz de reparación.

El ADNmt sólo se encuentra unido a unas proteínas (*bridging proteins*) conformando una estructura denominada *nucleoide*, siendo esta estructura la única barrera de protección que presenta el genoma mitocondrial.

Todos estos factores hacen que la molécula de ADNmt sea adecuada para el estudio de la reconstrucción de la historia evolutiva reciente de las poblaciones humanas (SIGURDARDOTTIR *et al.*, 2000).

- *Herencia materna*

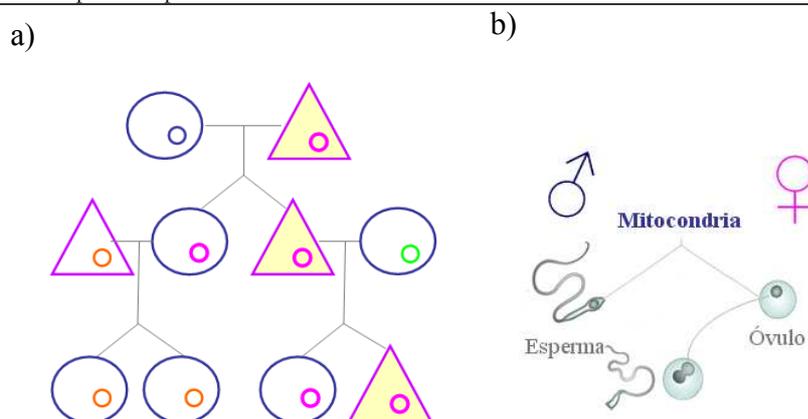
El ADNmt se transmite únicamente por vía materna, esto significa que aunque hombres y mujeres lo presentan, sólo las mujeres lo pueden transmitir a su descendencia (Figura I.4a). Esto es debido a que durante la fecundación del óvulo, las mitocondrias presentes en la cola de los espermatozoides, no penetran en el óvulo. Las mitocondrias presentes en el citoplasma del cigoto proceden únicamente del óvulo (Figura I.4b). Por este motivo el tamaño poblacional efectivo es un cuarto de los *loci* autosómicos, debido a ello el ADNmt se ve sometido en mayor medida por los efectos fundacionales y la deriva genética.

- *Ausencia de recombinación*

El ADNmt no se recombina, los cambios de una generación son resultado únicamente de las mutaciones, pudiendo interpretar de forma directa la variabilidad que presenta. Sin embargo, se ha cuestionado de forma puntual u ocasional, el hecho de la posible recombinación de esta molécula en estudios familiares. EYRE-WALKER *et al.* (1999) sugieren que la elevada tasa de homoplasia existente en el ADNmt, es debida a la existencia de recombinación en el ADNmt, pero este estudio y otros

puntuales han sido rechazados o rectificadas (ELSON *et al.*, 2001; HAGELBERG *et al.*, 2003). Actualmente la evidencia de recombinación en el ADNmt no ha sido demostrada, siendo un tema en continuo debate.

Figura I.4. Herencia matrilineal. a) Genealogía del ADNmt. Triángulo rosa, representa a una mujer; círculo azul, representa a un hombre. b) Fecundación del ovulo por el espermatozoide.



- *Heteroplasmia*

El concepto de heteroplasmia en el genoma mitocondrial se define como la presencia de distintas secuencias de ADNmt en la misma mitocondria, célula o individuo; siendo el concepto de homoplasia la presencia de la misma secuencia de ADNmt en la misma mitocondria, célula o individuo. La heteroplasmia puede producirse a causada del daño oxidativo o durante la replicación del ADN. Originalmente, la existencia de heteroplasmia se limitó a las regiones neutras del ADNmt (la región control), pero aparecían con una frecuencia muy baja (MONNAT y REAY, 1986; COMAS *et al.*, 1995; PARSONS e IRWIN, 2000; TANG y HUANG, 2010). Actualmente se ha considerado que la heteroplasmia actúa con una tasa mayor (TULLY y LEVIN, 2000; CALLOWAY *et al.*, 2000).

- *Inserciones de fragmentos del ADNmt en el genoma nuclear (NUMTDNA)*

Los *NUMTDNA* consisten en la transposición de algunos fragmentos de ADNmt en el genoma nuclear, donde pueden evolucionar a un ritmo más lento que en el genoma mitocondrial y han sido descritos en distintos organismos, incluyendo la especie humana (COLLURA y STEWART, 1995). Estos *NUMTDNA* representan un potencial de falsos positivos, a la hora de analizar el ADNmt. La identificación de estas *NUMTDNA* es posible gracias al diseño de cebadores específicos de la región analizada.

Todas estas características aconsejan a interpretar con cautela los resultados obtenidos a partir del ADNmt, ya que debido a su naturaleza no recombinante se comporta como un único *locus* y al heredarse de forma exclusiva por vía materna, sólo se reconstruye la historia demográfica de las mujeres.

1.2.2. Variabilidad del ADNmt

La variabilidad observada en las secuencias mitocondriales se puede clasificar en diferentes conjuntos denominados *haplogrupos*, que son una agrupación de *haplotipos* que se diferencian por presentar una serie de mutaciones estables y específicas. Estos haplogrupos tienen una distribución geográfica en la especie humana, que coincide con los grandes continentes, lo que permite llevar a cabo análisis filogeográficos. Un aspecto importante del análisis filogenético y genealógico de la variabilidad del ADNmt, es la estimación de las edades de coalescencia

de los linajes mitocondriales y sus tiempos de dispersión, mediante la utilización del reloj molecular.

En los últimos años, la obtención de secuencias completas del genoma mitocondrial ha aumentado la resolución del árbol filogenético mitocondrial mundial y ha mejorado el potencial de los análisis filogeográficos (MACAULAY y RICHARDS, 2008).

La tasa de mutación del genoma mitocondrial humano utilizado comúnmente para la región codificante es de 1.26×10^{-8} por nucleótido por año (MISHMAR *et al.*, 2003). Esta tasa de mutación asume una relación lineal entre la tasa de acumulación de sustituciones y el tiempo, independiente de la acción de la selección natural. Además, esta tasa ignora una parte importante de la información de las regiones no codificantes, que representan un tercio de la variación.

En un estudio reciente (SOARES *et al.*, 2009), mediante la utilización de 2.000 genomas mitocondriales completos, se ha evaluado la variación de la tasa de mutación del ADNmt, introduciendo el efecto de la selección purificadora en las diferentes regiones del genoma. Con estas estimaciones se puede describir a una escala mundial, cuales son las variantes mitocondriales específicas de las distintas regiones geográficas de la población humana.

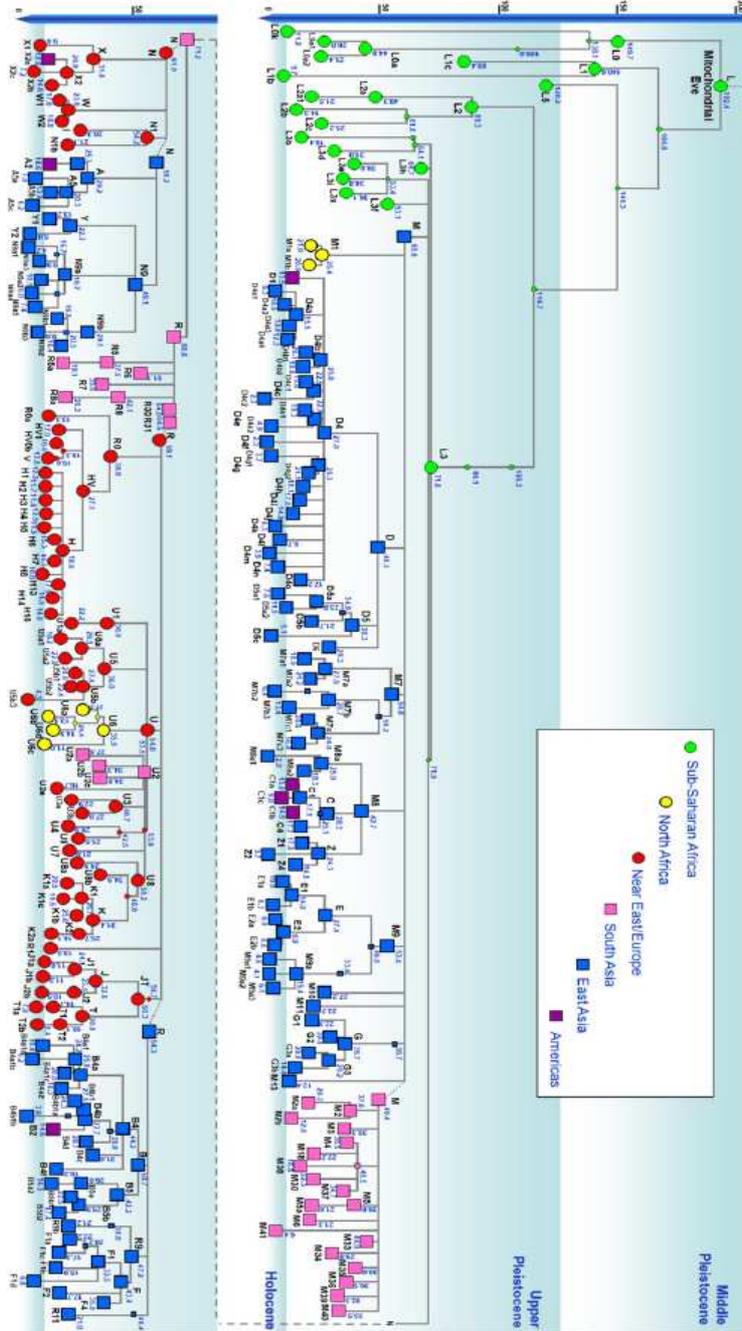
Los análisis del ADNmt de la población actual, muestran que en la población africana actual, aparecen tres linajes: los haplogrupos L1, L2 y L3. El haplogrupo L1 es el más antiguo (130 kya) y contiene la raíz de la

filogenia mundial del ADNmt (FOSTER, 2004). Algunos linajes de este clado son exclusivos de ciertas regiones africanas. Así, el linaje L1b, aparece en África occidental, L1d y L1k entre grupos bosquimanos de África del Sur, el clado L1c se localiza en el oeste y centro de África y los clados L1e y L1f en ciertas poblaciones del Este de África (WATSON *et al.* 1997) (Figura I.5).

Los haplogrupos que presentan una mayor distribución en África son el L2 y L3. Estos haplogrupos se originaron en África hace 80 y 60 kya, respectivamente, expandiéndose posteriormente por todo el continente desplazando, a su vez, a los L1 preexistentes (WATSON *et al.* 1997) (Figura I.5).

Fuera de África los linajes mitocondriales se engloban en dos grandes super-clusters: el M y el N, descendientes ambos del haplogrupo L3. Según diversos autores, estos datos sugerirían que el grupo que se habría expandido desde África hacia Eurasia, habría estado compuesto esencialmente por portadores del linaje L3, el cual se habría diferenciado posteriormente, bien dentro del continente africano o bien fuera del mismo, en los haplogrupos M y N (JOHNSON *et al.*, 1983; CANN *et al.*, 1987; HORAI y HAYASAKA, 1990; HORAI, 1995; HORAI *et al.*, 1995; VIGILANT *et al.*, 1991; INGMAN *et al.*, 2002; RELETFORD, 2001; MACAULAY y RICHARDS, 2008; SOARES *et al.*, 2010).

Figura I.5. Árbol filogenético de los diferentes haplogrupos mundiales (SOARES *et al.*, 2009)



I.3. LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE LA POBLACIÓN EUROPEA

Existen diversas hipótesis sobre el origen de la variabilidad genética de los humanos actuales, todas ellas otorgan a las expansiones demográficas ocurridas durante la prehistoria un papel primordial en la constitución genética de las poblaciones actuales, cuyo efecto final ha dado lugar a la homogenización genética de las poblaciones.

Entre los eventos demográficos que han podido contribuir a la variabilidad genética de la población europea actual, se encuentran principalmente: 1)- la llegada de HSAM a Europa, a inicios del Paleolítico Superior (hace 50-40.000 años), 2)- la recolonización de Europa después del último máximo glacial (hace unos 15 kya), 3)- la difusión del Neolítico (hace 10-6 kya) y 4)- otros movimientos poblacionales post-Neolíticos. El impacto de todos estos eventos sobre la composición genética de las poblaciones europeas actuales ha sido evaluado a través del análisis de diversos marcadores genéticos, tanto clásicos como del ADN.

I.3.1. Colonización de Europa por Homo sapiens anatómicamente moderno

Actualmente, existen dos teorías acerca del origen de los humanos anatómicamente modernos (HSAM), la teoría del *Out of Africa* y la teoría multirregional. La teoría del ***Out of Africa*** propone, que el origen de los humanos modernos ocurrió en África hace aproximadamente entre 150-200 kya, desde donde salieron y colonizaron en fechas posteriores

Eurasia (Europa, hace ~40 kya, y Asia, hace ~60 kya), reemplazando a las formas locales que existían en esos lugares.

Por otro lado, la teoría **multirregional** propone que el origen de los humanos modernos se remonta a hace 2 m.a. cuando *Homo erectus* salió de África y colonizó Eurasia. Estas formas sufrirían una evolución *in situ* de forma independiente, tanto en Asia, África, como Europa. A consecuencia de los 2 m.a. transcurridos hasta la actualidad y las diferentes condiciones ambientales específicas de cada región, las diferentes poblaciones de *Homo erectus*, habrían ido acumulando las diferencias poblacionales que actualmente observamos entre europeos, asiáticos y africanos. Mientras que un flujo génico permanente entre las distintas regiones geográficas habría mantenido la especificidad de la especie de *Homo sapiens*.

El rápido desarrollo de la genética molecular y la emergencia de herramientas informáticas, ha facilitado la reconstrucción de la historia evolutiva de nuestra especie. Uno de los primeros estudios basados en los datos de ADNmt (datos que solo permiten reconstruir la historia evolutiva de las mujeres), fue el realizado por CANN *et al.* (1987), donde concluyeron que el origen de la variabilidad mitocondrial se remonta a África ~200 kya, denominando a esta teoría, la teoría de la “Eva mitocondrial”.

Posteriormente, se publicaron otros estudios que confirmarían esta hipótesis (JOHNSON *et al.*, 1983; HORAI y HAYASAKA, 1990; HORAI, 1995; VIGILANT *et al.*, 1991; RELETFORD, 2001; INGMAN *et al.*, 2002).

Estos estudios, indican que el origen de la variabilidad genética actual es muy reciente, siendo este dato incompatible con la teoría multirregional, la cual propone que el origen de la variabilidad actual se encuentra en África hace 2 m.a. Pero estos datos no son una prueba directa para apoyar la teoría del *Out of Africa*, tratándose solo de un dato compatible con esta teoría y de un único marcador para la reconstrucción de la historia evolutiva humana. El análisis de diferentes marcadores del ADN, podría conducir a distintas conclusiones o hipótesis (RELETHFORD, 2001; TEMPLETON, 2007).

El análisis de los árboles construidos a partir del cromosoma Y y un número de regiones autosómicas nucleares (TAKAHATA *et al.*, 2001), muestran que el antecesor común más reciente se encuentra en África, ya que la raíz de estos árboles se sitúa en poblaciones de este continente.

Estudios más recientes utilizan la comparación de múltiples *loci*, siendo el trabajo más representativo el realizado por TEMPLETON, (2005), en el que se examinan 25 regiones del ADN: ADNmt, cromosoma Y, 11 marcadores del cromosoma X y 12 marcadores autosómicos. Estos marcadores muestran que no hubo una única salida y expansión desde África, sino que fueron tres: una hace 1,9 m.a. (I. C: 0.99-3.10), otra hace 650 kya (I. C: 390.000-970.000), y la última, hace 130 kya (I.C: 9.600-169.000)

Estas tres expansiones desde África se han correlacionado con las evidencias fósiles (RELETHFORD, 2008): La primera expansión coincidiría con la salida y dispersión de *Homo erectus* fuera de África; la segunda

coincide con el rápido incremento de la capacidad craneana ocurrido dentro del género *Homo*, que tuvo lugar hace 700 kya, con la aparición de *H. heidelbergensis*; y finalmente, la última expansión y la más reciente, coincide con el origen y dispersión de los humanos anatómicamente modernos. Estas tres expansiones apoyarían la teoría multirregional. Sin embargo, este estudio fue criticado puesto que los intervalos de confianza (I.C.) de cada una de las expansiones eran muy amplios, por lo que no se consideraban fiables para apoyar esta teoría (RELETFORD, 2008).

Esta última expansión coincide con la teoría del *Out of Africa*. Sin embargo, TEMPLETON, (2005), argumenta que la existencia de signos de expansiones anteriores a la del *Out of Africa*, rechazarían esta teoría. El reemplazamiento total que supuso la expansión de los humanos modernos según la teoría del *Out of Africa*, tendría que haber borrado la huella de expansiones poblacionales anteriores.

No toda la comunidad científica acepta estos planteamientos, es posible que cupieran otros modelos dentro de los patrones de variabilidad genética actual (RELETFORD, 2008). Los datos de muestras actuales no son una evidencia directa de la variabilidad genética del pasado, sino solo una inferencia.

Si se analizan los datos de la variabilidad genética obtenidos en diferentes trabajos, la población que presenta los valores más elevados es la subsahariana, observación que se obtiene a partir de datos del ADNmt (CANN *et al.*, 1987), microsátélites nucleares (RELETFORD *et al.*, 1999),

inserciones *Alu* (WATKINNS *et al.*, 2001) y marcadores del cromosoma 16 (ALONSO y ARMOUR 2001). Si asumimos que los cambios se van acumulando a lo largo del tiempo, cabría esperar que según la teoría del *Out of Africa*, las poblaciones africanas, más antiguas, hubieran acumulado mayor cantidad de diferencias, aumentando así su diversidad genética. Posteriormente estas poblaciones africanas se habrían dispersado, dando lugar a las poblaciones euroasiáticas, menos diversas.

Sin embargo, otra posible explicación de la elevada diversidad de las poblaciones africanas frente a las no africanas, sería debido a factores demográficos, tales como diferencias regionales en el tamaño poblacional. Se espera que la diversidad sea proporcional al tamaño efectivo de la población. Así, en una población de pequeño tamaño efectivo, el efecto de la deriva genética sería mayor, y por tanto, los niveles de diversidad más bajos, en comparación con poblaciones de mayor tamaño efectivo, donde se observaría una mayor diversidad, caso de la población africana.

Otra cuestión a valorar antes de aceptar una de las dos hipótesis existentes acerca del origen de la variabilidad genética actual, es si los neandertales deben ser considerados una subespecie de *Homo sapiens* o si por el contrario se trata de una especie diferente. La cuestión clave es si los neandertales y humanos modernos se cruzaron. Aunque la respuesta a estas cuestiones, ha sido durante mucho tiempo objeto de estudio a partir del registro fósil, en la última década se ha producido un rápido incremento de conocimientos genéticos de los Neandertales, que nos permiten abordar esta cuestión desde el punto de vista de la genética.

El trabajo pionero de KRINGS *et al.* (1997) fue el primero en abordar esta cuestión directamente, a partir del análisis del ADN recuperado de restos de neandertales. A este estudio se le sumaron otros posteriores, conseguido hasta el presente, la información genética de la misma región del ADNmt en 11 fósiles de neandertal (GREEN *et al.*, 2006). Estas secuencias resultan ser muy similares entre ellas, obteniéndose una baja diversidad genética (KRINGS *et al.*, 2000), aunque en el futuro, el análisis de un mayor número de neandertales, podrían dar lugar a cambios importantes en los valores de diversidad (CARAMELLI *et al.*, 2006; ORLANDO *et al.*, 2006).

La comparación de las secuencias de ADNmt de los neandertales y los humanos modernos, nos indica que el número de diferencias entre ambas especies es mayor que la observada entre los humanos modernos, lo que se ha interpretado en contra de la posible hibridación entre ambas especies (KRINGS *et al.*, 1997). Por otro lado, estos datos nos han proporcionado unos tiempos de divergencia entre ambas especies de ~5.000 kya (RELETHFORD, 2008).

Sin embargo, la principal prueba en contra de una posible hibridación entre neandertales y nuestra especie, es que ninguna de las secuencias mitocondriales obtenidas en los neandertales analizados, se han encontrado en los humanos actuales (CARAMELLI *et al.*, 2003; SERRE *et al.*, 2004).

Esta notable diferencia genética entre estas dos especies puede ser explicada de dos maneras: en primer lugar, como consecuencia de la extinción de los neandertales, sin que contribuyeran a nuestro *pool* génico; o bien por la pérdida a lo largo del tiempo debido a la deriva genética de las secuencias específicas de los neandertales (RELETFORD, 2008).

El desarrollo tecnológico de los últimos años ha permitido obtener secuencias del ADN nuclear del neandertal. Se han aplicado dos metodologías diferentes, la *metagenómica* y la *pirosecuenciación*, a un fósil de neandertal de la cueva de Vindija (Croacia), que se remonta a 38 kya.

Con la metodología de la metagenómica se han secuenciado 62.500 pb (NOONAN *et al.*, 2006) y con la pirosecuenciación, más de un millón de pb (GREEN *et al.*, 2006). Estos estudios han confirmado la diferencia genética observada en los estudios anteriores, entre los neandertales y los humanos actuales, y asimismo han datado la separación del linaje de neandertales y el nuestro, hace ~500-700 kya. La comparación de los alelos de humanos y neandertales (utilizando estimaciones de máxima verosimilitud), no ha mostrado signos de mezcla entre las dos formas (NOONAN *et al.*, 2006). Sin embargo, teniendo en cuenta los amplios intervalos de confianza (0-20%), no se puede descartar un pequeño porcentaje de mezcla entre los neandertales y humanos modernos.

El trabajo de GREEN *et al.* (2006) ha utilizado un enfoque analítico diferente para estimar el grado de mezcla entre las dos formas, consistente en la comparación de las secuencias del ADN de neandertal,

Europeos actuales y chimpancés, estos últimos representarían el estado ancestral. Los alelos derivados encontrados entre los humanos y el neandertal representarían a los alelos del antepasado común más reciente entre humanos y neandertales. El neandertal presenta alelos derivados en más del 30% de los SNPs, una cifra que es demasiado grande para ser compatible con un modelo sencillo de reemplazamiento de los neandertales por HSAM, por lo que estos autores aceptaban cierto grado de hibridación entre humanos modernos y neandertales.

WALL y KIM (2007), analizaron más detalladamente las diferencias observadas entre los estudios de GREEN *et al.* (2006) y NOONAN *et al.* (2006), llegando a la conclusión de que estas diferencias podrían ser debidas a contaminación o errores debidos a la degradación del ADN en el primer estudio. Por tanto, a la hora de interpretar los resultados del estudio de GREEN *et al.* (2006), no se puede descartar la contaminación de estas muestras con ADN exógeno de humanos actuales.

El avance en las técnicas de extracción y amplificación de ADN, ha permitido obtener información de fragmentos del ADNmt, el genoma mitocondrial completo y de un porcentaje del genoma nuclear de un conjunto de neandertales de diferente procedencia (KRINGS *et al.*, 1997; 2000; OVCHINNIKOV *et al.*, 1998; 2000; SCHMITZ *et al.*, 2002; SERRE *et al.*, 2004; LALUEZA-FOX *et al.*, 2005, 2006, 2007; KRAUSE *et al.*, 2007; CARAMELLI *et al.*, 2006; ORLANDO *et al.*, 2006; DALTON, 2006; DELSON y HARVATI, 2006; FINLAYSON *et al.*, 2006; GREEN *et al.*, 2006; HÖSS *et al.*, 2000; NOONAN *et al.*, 2006). Todos estos estudios están permitiendo

obtener una visión más detallada del proceso evolutivo que dio lugar al origen de nuestra especie.

1.3.2. Reexpansión en Europa tras la última glaciación

Durante el último máximo glacial (*Last Glacial Maximum; LGM*) hace 25-19.5 kya, las poblaciones humanas se refugiaron en zonas aisladas en el suroeste de Europa, los Balcanes, el Levante y el este de Europa (GAMBLE *et al.*, 2004, 2005). Varias líneas de investigación han indicado que la variabilidad genética actual, proviene en gran medida de la reexpansión a partir de estos refugios glaciales, hacia el centro y sur de Europa después del *LGM*, hace 15 kya (Figura I.6). Un gran número de linajes mitocondriales descritos en la población actual, presentan edades de coalescencia correspondientes con este periodo prehistórico; éste es el caso de los haplogrupos V, H5 H1, H3, y U5b1b (TORRONI *et al.*, 1998, 2001, 2006; TAMBEST *et al.*, 2004; ACHILLI *et al.*, 2004, 2005; ÁLVAREZ-IGLESIAS *et al.*, 2007; SAJANTILA *et al.*, 1996).

El haplogrupo H es el más frecuente en Europa, con un porcentaje de aproximadamente un 45%, y un origen probable en el Próximo Oriente hace 18 kya (TORRONI *et al.*, 1998, 2001, 2006). Sin embargo, en un estudio reciente se estima su origen hace ~15 kya (SOARES *et al.*, 2009), lo que sugiere que su origen fue posterior al *LGM*.

Asimismo, los haplogrupo V, H1, H3, H5 y U5b3, presentan unas edades de coalescencia que coinciden con el inicio de la época post-glacial: H5 y U5b3 presentan edades entre 13-14 kya y V, H1 y H3 de 11-11.5 kya (SOARES *et al.*, 2009).

Teniendo en cuenta las fechas de coalescencia de estos linajes, estos haplogrupos se podrían considerar los marcadores de la reexpansión de los grupos poblacionales de Europa, desde los refugios glaciales después del *LGM*.

Los datos obtenidos del cromosoma Y, también nos indican la existencia de haplogrupos que presentan un origen en los refugios glaciales del sur de Europa, siendo I1 y I1b1 originarios de los refugios Franco-Cantábrico e I2a1 del refugio de los Balcanes (ROOTSI *et al.*, 2004; MARJANOVIC *et al.*, 2005).

Todos estos estudios indican que una alta proporción de la variabilidad actual, tanto del ADNmt como la del cromosoma Y, proviene del Mesolítico, época en la que en Europa se observa una transición entre la última glaciación y una época cálida. (TORRONI 2006; RICHARDS *et al.*, 2000; SEMINO *et al.*, 2000; RICHARDS, 2003).

1.3.3. La difusión del Neolítico

El término “Neolítico” fue propuesto por primera vez, por LUBBOCK en 1856, refiriéndose exclusivamente al cambio tecnológico consistente en la aparición de la piedra pulimentada, que vendría a sustituir a la piedra tallada asociada al Paleolítico. Esta primera definición de Neolítico en base a los hallazgos arqueológicos, se ha visto completada por otro conjunto de transformaciones de aparición más o menos simultánea: cambios *económicos*, con la transformación de una economía de subsistencia (cazadora-recolectora) en una economía de producción (agrícola y ganadera), resultado del desarrollo de la domesticación de

plantas y animales, con el consiguiente desarrollo de la agricultura y la ganadería. Cambios *sociales*, como la aparición de poblados a consecuencia de la sedentarización asociada al desarrollo de la agricultura y la ganadería; y cambios *materiales*, como la aparición de la cerámica.

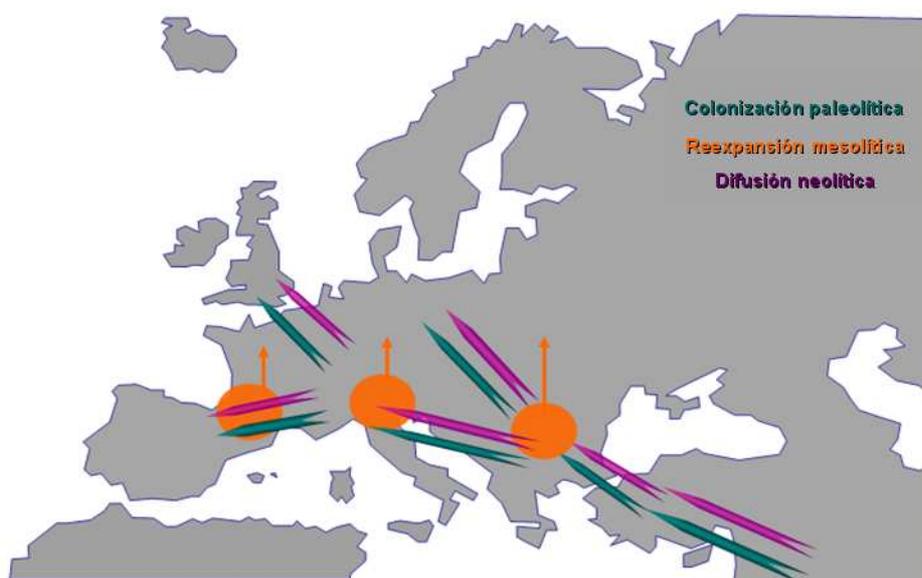
El Neolítico es definido como un período prehistórico de grandes transformaciones de carácter tecnológico, social, cultural y económico, claves para el desarrollo de las sociedades humanas modernas. Por eso, se otorga el término de **neolitización** al conjunto de procesos que operaron en la transición del modo de vida cazador-recolector al productor (agricultura y ganadería).

Existe un gran debate sobre como se produjo la transición de estos modos de vida, que actualmente sigue sin resolverse. La naturaleza de estos mecanismos y su adopción como método de subsistencia, continúan todavía sin aclararse, siendo objeto de un continuo debate. Sin embargo, existe un consenso sobre el origen de las innovaciones asociadas al Neolítico, ocurrió hace aproximadamente 10 kya en ciertas regiones del Próximo Oriente, como son los territorios actuales de Siria e Israel, desde donde se expandió al resto de Europa (Figura 1.6).

El fenómeno de la neolitización en Europa, fue establecido mediante las dataciones radiocarbónicas de los depósitos de cerámica y las evidencias de domesticación de los yacimientos neolíticos más tempranos. La proyección de estas fechas sobre un mapa muestra, un gradiente sureste-noroeste que sugiere que la transición al modo de vida neolítico en

Europa habría tardado en completarse ~2.500 años (CLARK *et al.*, 1965; AMMERMAN y CAVALLI-SFORZA, 1984) (Figura 1.8a).

Figura I.6 Principales eventos demográficos documentados arqueológicamente. Flechas verdes: colonización paleolítica. Círculos naranjas: refugios glaciales. Flechas naranjas: reexpansión mesolítica. Flechas moradas: difusión démica asociada al Neolítico.

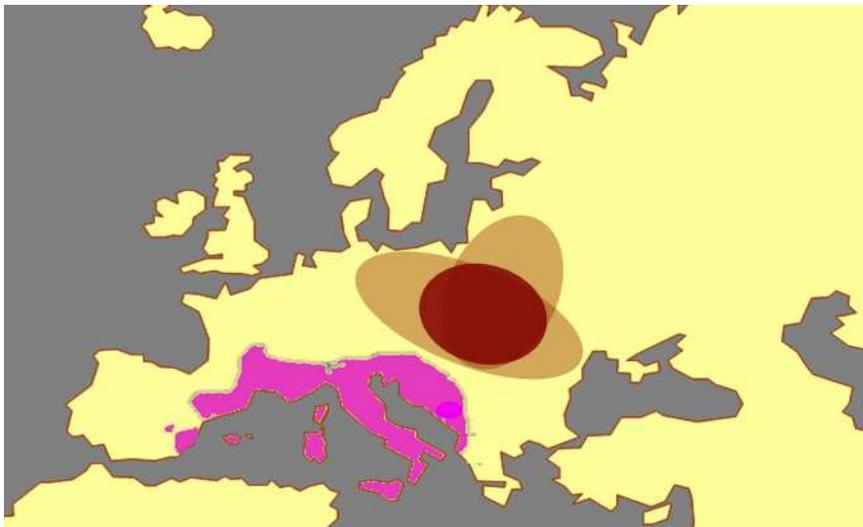


Se han postulado dos rutas de expansión de la neolitización desde el Próximo Oriente, asociados a tres grandes complejos cerámicos (Figura I.7):

1. Asociada a la *cerámica cardial*, a través de la costa mediterránea hacia Italia, Francia y finalmente la Península Ibérica.
2. Asociada al *complejo cerámico lineal* (LBK), hacia el centro y norte de Europa, quedando en la zona de los Balcanes y Anatolia. la cultura de la *cerámica pintada* (GRONENBORN *et al.*, 2007).

Ciertos hallazgos contradicen la difusión conjunta de los elementos que forman parte del fenómeno de la *neolitización*, ya que existen evidencias de domesticación de especies animales y vegetales anteriores a las fechas proporcionadas por las dataciones radiocarbónicas, citadas anteriormente (PRICE, 2000).

Figura I.7. Principales focos de dispersión de la neolitización asociada a los complejos cerámicos: LBK (marrón) y cardial (rosa).



Como ya se ha mencionado, existe un consenso sobre cual fue el foco de origen de los agricultores neolíticos, pero no ocurre lo mismo sobre el proceso de dispersión de la neolitización. Se han propuesto dos modelos para explicar el proceso de dispersión del neolítico: uno es el modelo de *difusión démica* y el otro el modelo de *aculturación*.

El modelo de *difusión démica*, propone que la transición neolítica en Europa se produjo como consecuencia de una sustitución poblacional de

los grupos de cazadores-recolectores, por parte de una comunidad agrícola en expansión procedente del Próximo Oriente (AMMERMAN y CAVALLI-SFORZA, 1984). Por otro lado, el modelo de *aculturación*, propone que la transición neolítica tuvo lugar mediante la adopción de este sistema productivo por parte de los grupos indígenas locales, sin reemplazamiento poblacional (DENNELL, 1985).

Entre ambas hipótesis se postula un modelo intermedio consistente en un cierto grado de mezcla entre los inmigrantes con una economía productora y los grupos locales cazadores-recolectores, respaldada por diferentes mecanismos como la difusión démica (AMMERMAN y CAVALLI-SFORZA, 1984), dominancia de un grupo (RENFREW *et al.*, 1987) o la colonización pionera (ZILHAO, 2001; RENFREW *et al.*, 2000).

La aceptación de uno u otro modelo tiene diferentes implicaciones sobre el origen de la composición genética de las poblaciones europeas actuales. De haberse dado el modelo de la *difusión démica*, la variabilidad genética de las poblaciones actuales procedería esencialmente del Próximo Oriente y no se remontaría más allá del origen neolítico (~10 kya). Se esperaría por lo tanto encontrar una gran similitud genética entre las poblaciones Europeas y las del Próximo Oriente (Figura 1.6).

Por el contrario, de haberse dado el modelo de *aculturación*, la expansión del Neolítico no habría modificado la composición genética de la población europea, que tendría su origen más atrás en el tiempo, en las expansiones del Paleolítico (Figura 1.6) o antes si se tiene en consideración la *Hipótesis Multiregional*. En ambos casos, la diferencia

entre las poblaciones de Europa y el Próximo Oriente dependería del grado de diferenciación genética acumulada de forma individual.

Estas dos hipótesis son las más extremas y entre ellas se han definido otros modelos para predecir la dispersión del neolítico en Europa. RICHARDS (2003), basándose en las hipótesis propuestas por ZVELEBIL (2000), publicó siete modelos para la dispersión de la neolitización en Europa, teniendo en cuenta para ello los datos genéticos existentes en la bibliografía y asumiendo que las poblaciones del Próximo Oriente y las de Europa eran genéticamente diferentes antes del neolítico. Con estos modelos RICHARDS (2003), replantea que la dispersión del Neolítico no sólo se puede explicar mediante las dos hipótesis extremas. Los siete modelos que explican el fenómeno de la neolitización, junto con sus implicaciones genéticas, se indican a continuación:

1. **Migracionista.** Este modelo postula la existencia de un movimiento unidireccional de los agricultores del Próximo Oriente hacia Europa, en el que existió un reemplazamiento genético de los cazadores-recolectores indígenas. Por lo tanto, la población de Europa y la del Próximo Oriente no presentarían diferencias genéticas, aunque éstas puedan existir debido a eventos demográficos post-neolíticos.
2. **Difusión démica.** Como ya se ha mencionado, este modelo se basa en la mezcla de los agricultores neolíticos con los cazadores-recolectores, sin la existencia de un reemplazamiento total, lo que conllevaría la formación de gradientes para algunos linajes.

AMMERMAN y CAVALLI-SFORZA (1984) se basaron en este modelo para elaborar el *modelo de ola de avance*.

3. **Elite dominante.** A inicios del neolítico una élite social de agricultores y/o ganaderos penetraría en una zona e impondría su cultura a nivel local. En este caso, los grupos recién llegados no dejarían muchas evidencias genéticas en la zona colonizada.
4. **Infiltración de pequeños grupos especializados.** Un pequeño número de individuos agricultores y/o ganaderos, se introducirían en nuevas áreas, donde dejarían huellas de algunos linajes de la población original, sin dar origen a clinas. Se trataría de una expansión en forma aleatoria en donde se irían introduciendo estos grupos especializados.
5. **Leapfrog.** Este modelo se basa en la colonización de áreas geográficamente limitadas, por parte de grupos de agricultores y/o ganaderos de tamaño reducido, óptimas para su forma de vida, quedando así rodeados por los grupos indígenas. En este modelo, se podrían hallar las huellas genéticas de la población original a la que pertenecen estos pequeños grupos colonizadores.
6. **Movilidad de fronteras.** El intercambio genético tendrían lugar en las zonas fronterizas creadas entre los grupos de agricultores neolíticos y los grupos de cazadores-recolectores indígenas.
7. **Contacto regional o aculturación.** El contacto cultural entre los cazadores-recolectores indígenas y los agricultores neolíticos, daría lugar únicamente a un intercambio cultural.

Los estudios de la composición genética de las poblaciones actuales de Europa y del Próximo Oriente, han tratado de determinar el impacto de las expansiones neolíticas sobre el *pool génico* europeo. Existe cierto consenso general a la hora de rechazar las dos hipótesis extremas, difusión poblacional con reemplazamiento o cultural.

El debate generado en torno a estos estudios afecta al grado relativo de contribución genética de la población autóctona e inmigrante en el *pool génico* europeo actual. El estudio de las frecuencias de ciertos marcadores clásicos en las poblaciones europeas, reveló la existencia de diferentes gradientes o clinas interpretadas como expansiones poblacionales del pasado, siendo la expansión del Neolítico desde el Próximo Oriente la más evidente (MENOZZI *et al.*, 1978; CAVALLI-SFORZA y PIAZZA, 1993; PIAZZA *et al.*, 1995; SEMINO *et al.*, 1996).

El primero de estos estudios (MENOZZI *et al.* 1978) se realizó a partir de las frecuencias alélicas obtenidas del análisis de 10 *loci* diferentes: dos del Sistema de Histocompatibilidad HLA (HLA-A y HLA-B) y el resto, de diversos grupos sanguíneos (ABO, Rh, MN, Lewis, Duffy), enzimas y proteínas plasmáticas (Fosfatasa ácida, Fosfoglucomutasa, Haptoglobina).

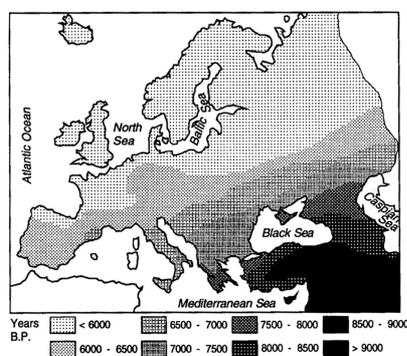
Se llevó a cabo un análisis de componentes principales, que sirvió de base para trazar los mapas sintéticos correspondientes a cada componente. El mapa correspondiente al primer componente principal (30% de la varianza total), mostraba un gradiente Sudeste-Noroeste, desde el Próximo Oriente, que se solapaba con el mapa de la expansión

de la agricultura en Europa, reconstruido a partir de los datos de radiocarbono (AMMERMAN y CAVALLI-SFORZA, 1984) (Figura I.8a).

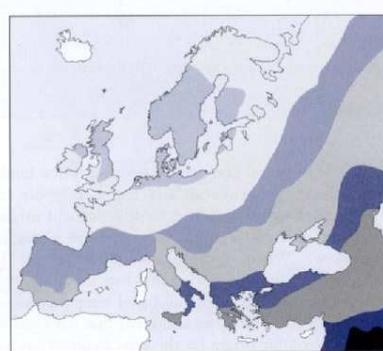
Estos resultados dieron lugar al modelo de difusión démica asociada a la expansión del Neolítico en Europa (modelo 2). Posteriormente los mismos autores ampliaron este estudio al análisis de 95 genes, confirmando y completando los resultados obtenidos anteriormente (CAVALLI-SFORZA *et al.* 1994) (Figura I.8b). Asimismo los estudios realizados por PIAZZA *et al.* (1995) y SOKAL *et al.* (1991), también apoyaron estos resultados.

Figura I.8. Análisis de componentes principales. a) Mapa sintético de Europa y oeste de Asia obtenido a partir del primer componente principal obtenido de marcadores clásicos de CAVALLI-SFORZA 1994. b) Mapa de distribución de las dataciones radio métricas de los yacimientos neolíticos de Europa y el Próximo Oriente. (Figuras tomadas de JOBLING *et al.*, 2004)

a)



b)



Los patrones de diversidad mitocondrial europea actual, no sustentan las conclusiones generadas por los estudios de marcadores clásicos y sugieren un origen predominantemente Paleolítico para la diversidad de las poblaciones europeas actuales.

El estudio pionero fué realizado por RICHARDS *et al.* (1996), donde analizaron la variabilidad del ADNmt de los europeos actuales e iniciaron un debate entre los defensores de un modelo de difusión démica y los del modelo de aculturación.

El análisis de la variabilidad de la HVS-I del ADNmt de 821 individuos pertenecientes a 14 poblaciones europeas diferentes, permitió clasificar la variabilidad mitocondrial en cinco haplogrupos mitocondriales principales, siendo la estima del TMRCA (*Time for the Most Recent Common Ancestor*) de cada uno de estos haplogrupos anterior a la difusión del Neolítico, menos en dos subhaplogrupos distribuidos en el oeste (J1b1, 12,5 kya) y centro (J1a, 6 kya) de Europa.

Estos patrones de diversidad mitocondrial europea actual, se oponen a las conclusiones de los marcadores clásicos, proponiéndose un origen predominantemente Paleolítico de la diversidad mitocondrial europea, con una contribución Neolítica minoritaria (12%), restringida a las variantes dentro del subcluster J. A partir de este estudio se generó un modelo para explicar la expansión del Neolítico en Europa, en el cual predomina la aculturación y un escaso aporte neolítico debido a la difusión démica.

En un estudio posterior, del mismo grupo de investigación, se incrementó el tamaño muestral de las poblaciones analizadas, tanto europeas (RICHARDS *et al.*, 1998), como del Próximo Oriente (MACAULAY *et al.*, 1999; RICHARDS *et al.*, 2000). De este modo, se obtuvo

una disección más detallada de los diferentes haplogrupos mitocondriales europeos (RICHARDS *et al.*, 1998).

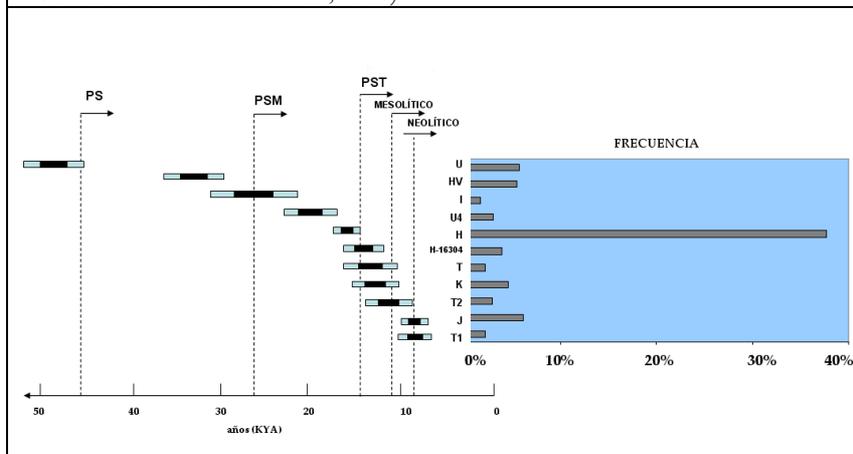
Asimismo, se introdujo una nueva aproximación metodológica, el *análisis fundador* de los linajes mitocondriales. Este análisis se basa en la detección de aquellas variantes mitocondriales originarias del Próximo Oriente que habrían migrado a Europa, para posteriormente estimar el tiempo en el que tuvo lugar dicha migración (RICHARDS *et al.*, 2000).

Gracias a este análisis, se pudieron identificar las variantes asociadas a cada una de las expansiones poblacionales, que supuestamente han modelado el *pool génico* de las poblaciones europeas actuales. Estos resultados corroboraron la principal hipótesis del trabajo de RICHARDS *et al.* (1996), según la cual la mayor parte de la variabilidad mitocondrial europea actual tiene su origen en el Paleolítico, en la colonización del continente ocurrida desde el Próximo Oriente por parte de HSAM.

Según RICHARDS *et al.* (2000), HSMA habría introducido el haplogrupo U en Europa a inicios del Paleolítico Superior. Los haplotipos que definen los haplogrupos HV, U1 y, posiblemente también, U2 y U4, habrían llegado más tarde, durante el Paleolítico Superior Medio. A finales del Paleolítico Superior, se habrían introducido en Europa desde el Próximo Oriente algunos sub-clusters del haplogrupo H (H-CRS, H-16304 y H-16362,16482). Únicamente aquellas variantes situadas en la base de los haplogrupos J, T1, U3 y algunos sub-clusters de los haplogrupos H y W, podrían haber sido introducidos en Europa durante las expansiones del Neolítico (Figura I.9).

Según estos estudios, el porcentaje de variabilidad genética actual asociada a las expansiones neolíticas no sería superior al 23%, con valores entre 9-12% en las poblaciones mediterráneas y sensiblemente superiores en centro Europa (15-22%). Posteriormente, el grupo de TORRONI, tras analizar la frecuencia y distribución actual de ciertos haplogrupos europeos, como el V y los subgrupos H1 y H3, concluyó que estos clusters, presentes ya en Europa a finales del Paleolítico Superior, sufrieron nuevas expansiones desde la franja cantábrica hacia el norte tras la última glaciación, hace ~11 kya (TORRONI *et al.*, 1998; 2001; ACHILLI *et al.*, 2004).

Figura I.9. Edad y frecuencias estimadas para los principales haplogrupos mitocondriales europeos. PS: Paleolítico Superior; PSM Paleolítico Superior Medio y PST Paleolítico Superior Tardío. (Figura modificada de RICHARDS *et al.*, 2000).



Los defensores de la hipótesis de la difusión del Neolítico, cuestionan la validez de la región control del ADNmt como marcador para la reconstrucción del pasado de las poblaciones humanas, ya que ésta se refiere únicamente a la historia demográfica de las mujeres (CAVALLI-SFORZA y MINCH, 1997). Estos últimos autores, sin embargo, han

reconocido en posteriores trabajos que la contribución de los inmigrantes neolíticos al *pool mitocondrial* europeo fue de un 26% (SEMINO *et al.*, 2000), valor muy similar al deducido a partir de los estudios de ADNmt.

Actualmente, con la revisión y mejora del reloj molecular, se han variado las cronologías de algunos haplogrupos mitocondriales (Tabla I.1) (SOARES *et al.*, 2009). Estas nuevas cronologías, junto con los datos arqueológicos y genéticos (ADNmt y cromosoma Y), han permitido proponer cuatro fuentes de origen de la variabilidad genética europea actual (SOARES *et al.*, 2010):

1. La colonización en el Paleolítico Superior por parte de HSAM
2. La recolonización de Europa después del *LGM*
3. La dispersión de la economía productora asociada al neolítico
4. Las migraciones o intercambios económicos a partir de la Edad del Cobre

Con esta nueva calibración, la mayoría de los clados mantendrían unas edades similares a las estimadas mediante otros estadísticos. El haplogrupo U5 sigue siendo el haplogrupo más antiguo de Europa y se asocia a la colonización de Europa por parte de HSAM, en el Paleolítico superior (SOARES *et al.*, 2010).

En el caso del haplogrupo H, su edad de coalescencia es menor a la estimada con otros estadísticos, mostrándose como un posible marcador de la expansión desde los refugios glaciales europeos después del *LGM*. Asimismo, los linajes H1, H3, y V, también se asocian a esta reexpansión (SOARES *et al.*, 2010).

Tabla I.1 Edad de los principales haplogrupos europeos según distintos relojes moleculares, estimadas con un intervalo de confianza del 95% de. P, estimador de la diversidad; ML, máxima verosimilitud. ^a, Secuencia completa del ADNmt (SOARES *et al.*, 2009); ^b, cambios sinónimos (SOARES *et al.*, 2009); ^c, transiciones sinónimas (KIVISILD *et al.*, 2006; PEREGO *et al.*, 2009); ^d, la región codificante (MISHNAR *et al.*, 2003; PEREGO *et al.*, 2009). Modificada de SOARES *et al.* (2010).

| HG | ML ^a | q ^a | q ^b | q ^c | q ^d |
|--------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| U | 55,8 (48,5 - 63,3) | 50,7 (40,9 - 60,9) | 52,7 (37,8 - 67,6) | 50,4 (36,0 - 64,9) | 54,4 (41,9 - 66,9) |
| U8 | 51,3 (44,0 - 58,8) | 49,1 (30,4 - 68,8) | 52,9 (22,2 - 83,5) | 50,5 (44,0 - 58,8) | 55,3 (31,2 - 79,5) |
| K | 31,6 (24,2 - 39,2) | 25,1 (16,9 - 36,3) | 22,0 (15,4 - 28,6) | 20,5 (14,1 - 26,9) | 28,3 (17,0 - 39,6) |
| K2a | 8,8 (5,4 - 12,3) | 6,8 (3,7 - 9,9) | 7,5 (3,1 - 11,8) | 7,2 (3,0 - 11,4) | 6,2 (3,5 - 8,9) |
| U5 | 36,9 (27,5 - 46,6) | 31,3 (21,4 - 41,5) | 31,7 (13,0 - 50,4) | 30,3 (12,2 - 48,5) | 29,7 (17,9 - 41,4) |
| U5b1 | 20,4 (14,9 - 26,1) | 17,4 (9,9 - 25,2) | 25,6 (6,3 - 44,9) | 24,6 (5,9 - 43,3) | 19,6 (8,2 - 31,0) |
| U5b1b1 | 8,3 (4,4 - 12,3) | 9 (4,8 - 13,3) | 6,1 (0,7 - 11,5) | 5,9 (0,7 - 11,4) | 7,3 (3,6 - 11,1) |
| U5b3 | 13,0 (9,7 - 16,3) | 13,2 (8,2 - 18,2) | 9,0 (5,5 - 12,3) | 8,1 (4,9 - 11,3) | 10,2 (6,2 - 14,2) |
| U4 | 20,8 (15,8 - 26,0) | 17,8 (12,3 - 23,4) | 12,7 (7,9 - 17,5) | 12,2 (7,6 - 16,8) | 20,4 (13,1 - 27,8) |
| I | 24,7 (19,0 - 30,5) | 25,1 (16,9 - 33,6) | 22,0 (15,4 - 28,6) | 20,5 (14,2 - 26,9) | 28,3 (17,0 - 39,6) |
| H | 17,5 (15,6 - 19,4) | 15,7 (13,3 - 18,0) | 16,2 (12,9 - 19,5) | 15,2 (12,1 - 18,4) | 18,8 (14,6 - 21,6) |
| H1 | 11,1 (9,3 - 12,8) | 10,8 (8,8 - 12,8) | 9,5 (7,2 - 11,7) | 8,8 (6,7 - 11,0) | 11,0 (9,1 - 12,9) |
| H3 | 11,5 (8,9 - 12,9) | 10,8 (8,5 - 13,2) | 9,5 (6,3 - 12,6) | 8,8 (5,8 - 11,7) | 11,1 (8,4 - 13,8) |
| H5 | 13,9 (10,7 - 17,1) | 12,4 (7,3 - 17,3) | 15,1 (3,0 - 27,2) | 14,6 (2,9 - 26,4) | 16,1 (7,7 - 24,6) |
| V | 11 (8,5 - 13,5) | 10,2 (7,9 - 12,5) | 10,7 (7,6 - 13,8) | 10,1 (7,1 - 13,1) | 13,2 (9,7 - 16,7) |
| J2a1a | 7,7 (1,7 - 13,9) | 7,9 (2,7 - 13,3) | 5,3 (0 - 13,4) | 5,1 (0 - 13,0) | 9,8 (1,8 - 16,6) |

La expansión del Neolítico vendría representada por los haplogrupos J y K2a, en los que si se ha obtenido una redefinición de la edad de coalescencia. Según la nueva redefinición de las edades de coalescencia del haplogrupo J y K2a, ésta coincidirían con la dispersión de los grupos de agricultores neolíticos, que se fueron dispersando por Europa desde el Próximo Oriente (SOARES *et al.*, 2010).

En cuanto a los datos provenientes de la región no recombinante del cromosoma Y (NRY), se observa un gradiente sureste-noroeste muy similar al que muestran algunos marcadores clásicos. Ésto ha sido interpretado como la huella genética de la expansión neolítica (SEMINO *et al.*, 1996, 2000; ROSSER *et al.*, 2000).

En el estudio de SEMINO *et al.* (1996), la delección 12f2, perteneciente al haplogrupo J del cromosoma Y (según ROSSER *et al.*, 2000), se ha identificado como un marcador de la dispersión del Neolítico en Europa. SEMINO *et al.* (2000) analizaron de forma detallada la filogenia del cromosoma Y, estudiando 22 marcadores binarios que permitieron identificar 6 haplogrupos diferentes. Entre éstos, el F, E3b, G y J2 mostraban un gradiente de frecuencias compatible con la expansión del Neolítico. La frecuencia de estos linajes en la población actual, fue utilizada para realizar una estima de la contribución de los agricultores neolíticos al *pool* génico europeo, siendo éste de un 22%.

Además de identificar las variantes actuales que presentan su origen en el Neolítico, los tres estudios citados determinan también aquellos haplotipos pertenecientes al sustrato Paleolítico, como es el caso del haplotipo 15 (o haplogrupo R, según ROSSER *et al.*, 2000). SEMINO *et al.* (2000) relacionaron los haplogrupos R e I con las culturas Auriñaciense (35-40 kya) y Gravetiense (22 kya) del Paleolítico Superior, respectivamente.

La distribución geográfica de las frecuencias de otras variantes, con máximos en el centro-norte Europa (E, R1a) y en el este del Báltico

(N3), ha sido interpretada como evidencia de las reexpansiones post-glaciales desde los refugios de la Península Ibérica y los Balcanes.

Recientemente, BALARESQUE *et al.* (2010) han publicado un análisis de la variabilidad del cromosoma Y en 2.574 muestras europeas, en el que observan que el haplogrupo más frecuente en Europa es el R1b1b2, presentando una frecuencia en gradiente desde el este al oeste de Europa. Asimismo, la estima de la edad de coalescencia en base a marcadores microsatélites del cromosoma Y, arroja unas fechas en torno a 7-6 kya.

La representación de la filogenia del haplogrupo R1b1b2 presenta forma estrellada, lo que indica un único foco de origen y dispersión, siendo la población de Turquía la que se presenta en el nodo central. Por lo tanto, BALARESQUE *et al.* (2010), proponen que el haplogrupo R1b1b2 se originó en Turquía, hace 7-6 kya, desde donde se dispersó al resto de Europa portado por los hombres agricultores. Este estudio, se contrapone con los análisis de SEMINO *et al.* (2000) y ROSSER *et al.* (2000), quienes proponen que este haplogrupo podría ser un marcador de la reexpansión mesolítica desde los refugios glaciales de la región Franco-Cantábrica, los Balcanes y los Alpes.

Las estimas sobre los porcentajes de contribución de la variabilidad genética proveniente tanto del Neolítico como del Paleolítico al *pool génico* europeo, han proporcionado resultados contradictorios. Tras el reanálisis de los datos de SEMINO *et al.* (2000), CHIKHI *et al.* (2002) cuantificaron la contribución neolítica en Europa entre un 50-60%, valor superior al

estimado hasta el momento [un 22% según SEMINO *et al.* (2000) y RICHARDS *et al.* (2000)].

En los trabajos de SEMINO *et al.* (2000) y RICHARDS *et al.* (2000), la medida de la aportación neolítica se basa en la cuantificación de las variantes cuya distribución de frecuencias sigue un patrón compatible con la dispersión del Neolítico en Europa (un único foco de origen en el Próximo Oriente y un gradiente este-oeste en Europa). En el trabajo de CHIKHI *et al.* (2002) la composición genética de las poblaciones neolíticas y paleolíticas se estima a partir de sus poblaciones descendientes: Turquía, Líbano y Siria para las poblaciones neolíticas y País Vasco o Cerdeña en el caso de las poblaciones paleolíticas.

En el trabajo de CURRAT y EXCOFFIER (2005) se simula el patrón de diversidad esperado en los SNPs a partir de la expansión neolítica, teniendo en cuenta diferentes grados de mezcla con la población paleolítica. De estas simulaciones se concluye que incluso una contribución pequeña de genes del Paleolítico habría sido suficiente para garantizar su persistencia hasta la actualidad y enmascarar la huella genética de la difusión de los primeros agricultores desde el Próximo Oriente.

Independientemente de los resultados obtenidos, todos los estudios anteriormente mencionados parten de un conjunto de asunciones que pueden ser cuestionadas:

- El Próximo Oriente sería el lugar de origen de la mayoría de las expansiones prehistóricas, incluidas la del Paleolítico y la del Neolítico.
- Las poblaciones europeas y del Próximo Oriente eran genéticamente diferentes en el momento en el que se produjeron los diferentes eventos migratorios.
- Se considera que la variabilidad genética actual de las poblaciones de Europa y del Próximo Oriente es representativa en el momento en el que se produjeron las migraciones paleolíticas o neolíticas.
- Se asume la edad de un linaje, como la representación de la edad de una población.

El ADN recuperado de restos óseos y dentarios de los individuos recuperados de yacimientos prehistóricos nos muestra directamente los resultados acerca de la variabilidad genética existente en el pasado. De este modo, es posible contrastar las hipótesis planteadas a partir de los datos actuales.

Recientemente se han publicado diversos estudios acerca de la composición genética mitocondrial a partir de los restos recuperados tanto en yacimientos de agricultores neolíticos como de cazadores-recolectores del Paleolítico Superior, que permiten evaluar las diferentes hipótesis sobre la expansión de la agricultura durante el Neolítico.

El primer estudio de ADNmt publicado, fue un análisis de la variabilidad ADNmt en los primeros agricultores neolíticos (7.5-7 kya) de Europa central (HAAK *et al.*, 2005), donde se cuestiona la aportación de los primeros agricultores neolíticos de Europa Central en el *pool* génico de los europeos actuales. Estos primeros agricultores neolíticos europeos muestran una frecuencia elevada del haplogrupo N1a (25%), cuya frecuencia es extremadamente baja en la población europea actual (0,02%). Asimismo, rechazan la posibilidad de que este haplogrupo haya diluido su frecuencia en Europa por efecto de la deriva genética que pudo haber acontecido en los últimos 7.500 años.

Así, sus resultados indican una insignificante contribución genética de estos primeros agricultores neolíticos al *pool génico* de los europeos actuales. En el caso de que hubieran existido cruzamientos con los cazadores-recolectores, éste habría tenido lugar entre los hombres agricultores y mujeres cazadoras-recolectoras.

Sin embargo, BALTER, (2005) y AMMERMAN *et al.* (2006) han criticado el trabajo de HAAK *et al.* (2005), ya que según estos autores, la difusión del neolítico se pudo haber transmitido de diferentes formas en las distintas regiones de Europa. Por tanto, el fenómeno de neolitización propuesto por HAAK *et al.* (2005), no tiene por qué generalizarse a toda Europa.

Asimismo, critican que las conclusiones propuestas se basan en un único marcador genético, el ADNmt, que además hace referencia únicamente a las primeras mujeres con una economía productora (AMMERMAN *et al.*, 2006).

Estos datos se deberían completar con los provenientes del ADNmt de individuos mesolíticos, para comprobar el entrecruzamiento de hombres agricultores con mujeres cazadoras-recolectoras y con la información obtenida de otros marcadores genéticos e incluso de datos craneométricos.

Por último, AMMERMAN *et al.* (2006) critican el tamaño muestral analizado y el hecho de que no todas las muestras analizadas corresponderían a los primeros agricultores neolíticos, ya que existe una disparidad cronológica entre los yacimientos analizados.

En un estudio posterior, realizado por SAMPIETRO *et al.* (2007) basado en el análisis genético del ADNmt en once individuos de un yacimiento de 5.5 kya de Cataluña (“*Cami de Can Grau*”; Granollers) se muestran unos resultados diferentes a los publicados por HAAK *et al.* (2005). Ninguno de los individuos recuperados en este yacimiento pertenecen al haplogrupo N1a, mientras que se confirma la existencia de linajes mitocondriales característicos de las poblaciones actuales de la Península Ibérica y de la zona mediterránea de Europa. Por lo tanto estos autores proponen un modelo dual para explicar el proceso de dispersión de la agricultura durante el Neolítico, por un lado se trataría de una difusión démica en la zona mediterránea de Europa y por otro lado de aculturación en la zona central de Europa (SAMPIETRO *et al.*, 2007).

Recientemente, BRAMANTI *et al.* (2009) han analizado una muestra de 22 individuos cazadores-recolectores y los han comparado con los neolíticos de HAAK *et al.* (2005), y una muestra de europeos actuales de la misma

región geográfica, el centro de Europa. Las tres muestras poblacionales (cazadores-recolectores, agricultores y europeos actuales), presentan diferencias estadísticamente significativas, las cuales, según un análisis de simulaciones coalescentes, realizado por los autores, no se pueden explicar por una continuidad genética desde los cazadores-recolectores, pasando por los primeros agricultores hasta la actualidad.

Según BRAMANTI *et al.* (2009), la transición cultural neolítica acontecida en la zona central de Europa, habría ido acompañada de un influjo de gentes sustancial de las regiones adyacentes, al menos durante la fase inicial del Neolítico, pero no se habrían mezclado significativamente con las mujeres cazadores-recolectores locales.

Además, en este estudio proponen, que dado que en la población actual existen representantes de los haplogrupos encontrados en estas dos muestras prehistóricas, pero con una frecuencia muy baja, no puede explicarse que la variabilidad actual sea el reflejo de una mezcla de los cazadores-recolectores y los primeros agricultores neolíticos, sino que sería debido a eventos demográficos post-neolíticos, de los que no se han encontrado pruebas de su existencia en el registro arqueológico.

El último estudio realizado en muestras de cazadores-recolectores hasta el momento, corresponde al análisis de una muestra de 19 individuos cazadores-recolectores de Escandinavia de hace 4 kya, que subsistieron en paralelo con los primeros grupos neolíticos en esta región geográfica (MALMSTRÖM *et al.*, 2009), donde obtienen las mismas conclusiones propuestas por BRAMANTI *et al.* (2009). En este estudio investigan la

posible ascendencia de los escandinavos actuales de esta muestra de cazadores recolectores.

Los resultados muestran que la muestra analizada presenta elevadas frecuencias de los haplogrupos U5 (35%) y U4 (47,4%) y ausencia de haplotipos pertenecientes al haplogrupo N1a, manteniendo la hipótesis de la existencia de una discontinuidad genética entre las poblaciones cazadoras-recolectoras y las neolíticas y actuales en esta zona. MALMSTRÖM *et al.* (2009) han propuesto un evento de reemplazamiento poblacional, tanto en el periodo Neolítico como post-Neolítico.

1.3.4. Movimientos poblacionales Post-Neolíticos

Los estudios genéticos actuales basados en el análisis de diferentes marcadores moleculares, sitúan el origen de la variabilidad genética europea actual o bien en las expansiones del Paleolítico, o bien en la difusión de los agricultores a inicios del Neolítico, en ambos casos desde el Próximo Oriente. Sin embargo, muchas otras expansiones pudieron haber dejado su huella en el *pool* génico europeo. Algunas de ellas, podrían haber sido expansiones pre-neolíticas, que no se encuentran documentadas en el registro arqueológico y otras, expansiones posteriores al neolítico, que sí se encuentran documentadas.

Entre las expansiones post-neolíticas se encontrarían, por ejemplo, la dispersión del *megalitismo* durante el Calcolítico (6-5 kya) y la expansión de la cultura *campaniforme* en la Península Ibérica, Reino Unido, Francia y Centro Europa.

Finalmente, otros acontecimientos demográficos que pudieron haber afectado al *pool génico* actual son: 1) la dispersión del *pastoreo nómada* que dominó toda la estepa del este de Europa hace 5 kya y que posteriormente se extendió hacia el sur de Europa, India, la península de Anatolia y Mesopotamia, hace 3.5 kya, 2) movimientos poblacionales asociados a varias difusiones culturales como la *edad de los metales* o la *tradición de los campos de urnas* (3.2 kya) y 3) otros acontecimientos demográficos, como pueden ser algunas *colonizaciones históricas*, en las que caben destacar las colonias griegas, las *guerras púnicas*, que introdujeron contingentes norteafricanos en Iberia, la *romanización*, las *invasiones germánicas*, a las cuales les sucedieron la *expansión del Islam* y las *Cruzadas*.

I.4. LA VARIACIÓN GENÉTICA DE LA POBLACIÓN DEL PAÍS VASCO

Los estudios del sistema ABO llevados a cabo por BOYD y BOYD (1937), fueron los primeros datos genéticos que se obtuvieron en la población vasca. Desde entonces, se han publicado numerosos estudios, donde se han podido observar diferencias entre la población vasca actual y otras poblaciones europeas, basados todos ellos tanto en *marcadores genéticos clásicos* (AGUIRRE *et al.*, 1991; BERTRANPETIT y CAVALLI-SFORZA, 1991; MANZANO *et al.*, 1996b; CALAFELL y BERTRABPETIT 1994a, 1994b), como en el *ADNmt* (BERTRANPETIT *et al.*, 1995; CORTE-REAL *et al.*, 1996; SALAS *et al.*, 1998; RICHARDS *et al.*, 1996, 2000; TORRONI *et al.*, 2000; LARRUGA *et al.*, 2001; GONZALEZ *et al.*, 2006), *polimorfismos del cromosoma Y* (QUINTANA-MURCI *et al.*, 1999b; SEMINO *et al.*, 2000; ROSSER *et al.*, 2000; LÓPEZ PARRA *et al.*, 2009) y *marcadores autosómicos* (ALONSO y ARMOUR, 1998; IRIONDO *et al.*, 2003).

Por las características de esta diferenciación genética, la población vasca ha sido considerada como el grupo humano europeo que sufrió menor impacto demográfico neolítico, por lo tanto, sería la población que mejor habría conservado el componente paleolítico original (CAVALLI-SFORZA Y PIAZZA, 1993).

Sin embargo, algunos estudios basados en inmunoglobulinas (ESTEBAN *et al.*, 1998; GIRALDO *et al.*, 2001), STRs autosómicos y microsátélites del cromosoma Y (CALDERON *et al.*, 2000, 2003; PEÑA *et al.*, 2002; BARBERO 2000), otros marcadores del cromosoma-Y, el ADNmt y SNPs de todo el genoma (BOSCH *et al.*, 2001; FLORES *et al.*, 2004; ALONSO *et al.*, 2005; ALFONSO-SÁNCHEZ *et al.*, 2008; ADAMS *et al.*, 2008; GARAGNANNI *et al.*, 2009; LAAYOUNI *et al.*, 2010), no presentan diferencias entre las poblaciones vascas analizadas y el resto de poblaciones vecinas.

Por otro lado, la existencia en la población vasca de una frecuencia relativamente elevada de linajes raros o una baja frecuencia para linajes frecuentes en Europa, sugiere que la deriva genética ha acentuado las peculiaridades genéticas de la población vasca actual (RICHARDS *et al.*, 2000; ROSSER *et al.*, 2000).

Un ejemplo para ilustrar esta afirmación, es la correlación propuesta por RICHARDS *et al.* (2000) para la expansión del haplogrupo mitocondrial J en Europa y la colonización europea por grupos de agricultores neolíticos. Según estos autores, si el País Vasco estuvo sometido a un mayor aislamiento genético y una menor influencia de la difusión demográfica

asociada al Neolítico, cabría esperar una baja frecuencia de este haplogrupo en el País Vasco.

Sin embargo, en una muestra de la población vasca actual la frecuencia del haplogrupo J es de un 2% (RICHARDS *et al.*, 2000), en otra población de vascos actuales del Gohierri y del valle de Arratia la frecuencia es más elevada (14,6%) (ALFONSO-SÁNCHEZ *et al.*, 2008). Asimismo, en varias muestras prehistóricas vascas (SJaPL, 16,4% y Pico Ramos, 16,7%) (IZAGIRRE y DE LA RÚA, 1999) y una histórica (Aldaieta, 16,2%) (ALZUALDE *et al.*, 2005, 2006, 2007), el haplogrupo J presenta una frecuencia en torno al 16%, lo cual cuestionaría el aislamiento genético de los vascos frente a la influencia genética del neolítico, siempre y cuando asumamos que el haplogrupo J es el marcador de la colonización de Europa por los agricultores neolíticos.

Asimismo en un trabajo realizado por ALONSO *et al.* (2005), donde se analizaron 45 SNPs del cromosoma Y, se cuestiona el aislamiento de la población vasca, ya que se detecta flujo génico entre el País vasco y las regiones adyacentes. Estos autores, aunque admiten una ocupación en el área vasca desde épocas pre-Neolíticas, no encuentran una base sólida para considerar a la población vasca como la más representativa de las poblaciones paleolíticas (ALONSO *et al.*, 2005).

Recientemente se ha publicado un estudio en el que se analizan un gran conjunto de SNPs de todo el genoma humano en muestras procedentes de toda la Península Ibérica (LAAYOUNI *et al.*, 2010). Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que las diferencias observadas entre

la población vasca y las poblaciones vecinas son similares a los valores que se observan al comparar cualquier par de poblaciones de la Península Ibérica.

Por tanto, los vascos no presentarían una diferenciación genética respecto a sus poblaciones vecinas, argumentando que los trabajos realizados con los marcadores clásicos, es posible que sobreestimaran esta diferenciación de la población vasca, al tratarse de marcadores sometidos a la acción de la selección natural (LAAYOUNI *et al.*, 2010).

En la actualidad, disponemos de una amplia base de datos de muestras poblacionales humanas actuales, a partir de las cuales se han planteado diversas hipótesis sobre el origen y expansión de los linajes mitocondriales en Europa. Pero estas hipótesis sólo pueden ser contrastadas mediante los datos obtenidos de poblaciones prehistóricas o históricas.

II. OBJETIVOS

El **objetivo general** de la presente tesis doctoral, es el análisis genético de poblaciones de la Cornisa Cantábrica, desde el periodo Magdaleniense hasta la época actual, con el fin de analizar la influencia del Neolítico desde una perspectiva biológica y cultural. Este objetivo general se llevará a cabo mediante los siguientes **objetivos específicos**:

- 1) *Análisis de la variabilidad del ADNmt de los individuos recuperados en nueve yacimientos prehistóricos de la región cantábrica de la Península Ibérica:*
 - Análisis de la variabilidad del HVS-I mediante secuenciación (posiciones nucleotídicas entre 15.998 y 16.400).
 - Análisis de los polimorfismos informativos para la determinación de los haplogrupos descritos en caucásicos, que se encuentran dispersos en la región codificante, mediante la técnica de PCR-RFLP.
 - Análisis de la variabilidad existente en la posición 73 de la HVR-II mediante PCR-RFLP y/o secuenciación.
- 2) *Interpretar el comportamiento biosocial y el ritual de enterramiento de los inhumados en los yacimientos de Paternanbidea y Los Cascajos (los más representativos de la muestra analizada), mediante el análisis conjunto de los datos genéticos y las evidencias arqueológicas recuperadas.*

- 3) *Interpretar la variabilidad genética encontrada en los yacimientos prehistóricos estudiados* en el contexto de las poblaciones prehistóricas y actuales del País Vasco, Europa y Próximo Oriente.

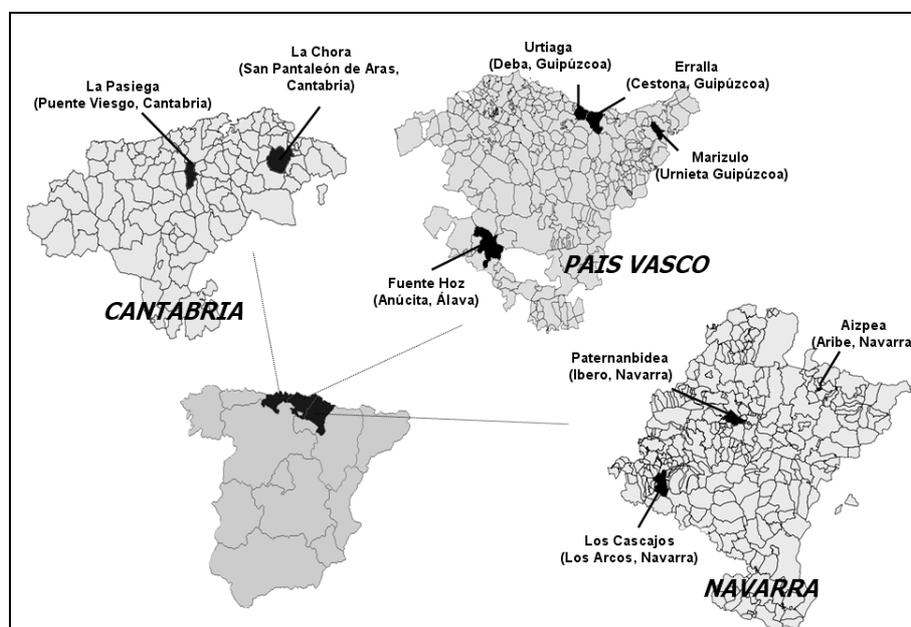
- 4) *Contrastar las hipótesis existentes sobre el fenómeno de la neolitización en Europa*, mediante el análisis de diversas poblaciones prehistóricas (cazadores-recolectores y agricultores) de la franja cantábrica.

- 5) *Contrastar con los datos de ADNn, las hipótesis filogeográficas basadas en muestras actuales*, sobre el origen y la distribución de ciertos linajes del ADNmt en la población europea.

III. MATERIAL

En este trabajo se ha llevado a cabo el estudio genético-poblacional de los restos humanos recuperados de nueve yacimientos localizados en el País Vasco, C.A. de Navarra y Cantabria, los cuales presentan una cronología que abarca desde el periodo Magdaleniense hasta la Edad del Bronce (Tabla III.1).

Figura III.1. Localización geográfica de los yacimientos arqueológicos estudiados en el presente trabajo: La Pasiega, La Chora, Urtiaga, Erralla, Marizulo, Fuente Hoz, Los Cascajos, Paternanbidea y Aizpea.



III.1. MAGDALENIENSE

A pesar de que los restos humanos correspondientes a esta época son escasos, se han podido analizar 3 muestras procedentes de 3 yacimientos ubicados en la región cantábrica de la Península Ibérica (Figura III.1): La cueva de La Pasiega, La Chora y Erralla.

III.1.1. Cueva de La Pasiega (Puente Viesgo, Cantabria)

Este yacimiento se encuentra ubicado en el municipio de Puente Viego en Cantabria, próximo al río Pas. La cueva de la Pasiega es básicamente una enorme galería de más de 120 metros, perteneciente al periodo Solutrense y Magdaleniense. En los muros que componen la cueva, se han encontrado pinturas y grabados incisos que representan caballos, ciervos y bóvidos, así como numerosos símbolos abstractos (ideomorfos) (GONZÁLEZ-ECHEGARAY, 1952).

En el nivel Magdaleniense de la cueva se encontró un maxilar superior humano, con los huesos del paladar rotos en su parte posterior. A pesar de que los alvéolos del lado derecho aparecen casi intactos, únicamente se conserva el segundo molar. El maxilar pertenece a un individuo adulto, seguramente de sexo masculino (GONZÁLEZ-ECHEGARAY, 1952).

III.1.2. Cueva de La Chora (San Pantaleón de las Aras, Cantabria)

La cueva de La Chora se encuentra ubicada en San Pantaleón de las Aras en el municipio de Voto (Cantabria) (Figura III.1). La excavación de la cueva fue dirigida por P.J. González-Echegaray y M.A. García Guinea en 1.962. En esta cueva se encontró industria de materiales de sílex, hojas de dorso y raspadores, así como arpones de hueso característicos del periodo Magdaleniense VI (GONZÁLEZ-ECHEGARAY *et al.*, 1963).

Asociados a esta industria también se encontraron restos óseos humanos, correspondientes a cuatro piezas antropológicas:

- Un fragmento de maxilar superior izquierdo con el canino, los dos premolares y el primer molar *in situ*.

- Un fragmento reducido de maxilar inferior con el primer molar derecho *in situ*.
- Un segundo molar aislado del maxilar superior derecho.
- Un segundo molar aislado del maxilar superior izquierdo.

Según los rasgos antropológicos, el fragmento del maxilar superior pertenece a un individuo diferente al de los restantes. En general, todas las piezas dentales están muy abrasionadas, debido al régimen de alimentación (GONZÁLEZ-ECHEGARAY *et al.*, 1963).

III.1.3. Cueva de Erralla (Cestona, Guipúzcoa)

Esta cueva se encuentra localizada en el municipio de Cestona en Guipúzcoa. Las excavaciones fueron llevadas a cabo en dos campañas dirigidas por J. Altuna, una en el año 1.977 y la otra al año siguiente, en 1.978 (ALTUNA *et al.* 1984; 1985). Durante estas campañas de excavación se recuperaron dos piezas dentarias: un primer molar superior derecho y un canino superior derecho, que seguramente pertenecen al mismo individuo (DE LA RÚA, 1985). Estos restos humanos recuperados son unos de los más antiguos del País Vasco, correspondientes al periodo Magdaleniense Final (~12.310 BP) (ALTUNA *et al.*, 1985).

III.2. MESOLÍTICO

Este periodo se encuentra representado por el abrigo de Aizpea (Aribe, Navarra), localizado en el Norte de Navarra, al oeste de los Pirineos, en uno de los extremos del cañón excavado por el río Irati, a unos 720-740 m sobre el nivel del mar (Figura III.1).

Las diferentes campañas de excavación de Aizpea, dirigidas por A. Cava, tuvieron lugar entre 1.989 y 1.991. La secuencia estratigráfica indica la presencia de tres niveles: el **nivel a**, es superficial, prácticamente estéril y en su zona inferior se incluyen restos líticos, óseos y cerámicas no decoradas; el **nivel b**, se extiende desde el Mesolítico final hasta el Neolítico, siendo el momento de máxima ocupación del abrigo (7.790 ± 70 BP- 6.370 ± 70 BP); por último, el **nivel c** forma la base estratigráfica del abrigo y es arqueológicamente estéril (BARANDIARÁN, 2001).

En el *nivel b* se exhumaron los restos de un esqueleto grácil que perteneció a una mujer (según la morfología y el análisis de ADN), de unos 30 años de edad y que muestra una datación de 6.600 ± 50 BP (DE LA RÚA *et al.*, 2001).

III.3. NEOLÍTICO

El grueso central de los restos óseos analizados en esta tesis doctoral pertenece al periodo Neolítico del Norte de la Península Ibérica, estando representado el *Neolítico Antiguo* por los yacimientos de Paternabidea (Ibero, Pamplona) y Los Cascajos (Los Arcos, Navarra) y el *Neolítico Medio* por Marizulo (Urnieta, Guipúzcoa) y Fuente Hoz (Anúcita, Álava) (Figura III.1).

III.3.1. Yacimiento de Los Cascajos (Los Arcos, Navarra)

El yacimiento de Los Cascajos se encuentra ubicado al sur del término municipal de Los Arcos (Navarra), en la comarca geográfica de Tierra

Estella que comprende el extremo sur-occidental de Navarra (Figura III.1). El área excavada se extiende a una superficie de 4 hectáreas, mostrando en ella evidencias arqueológicas que corresponden a un poblado neolítico, estable y continuo, a diferencia de otros yacimientos coetáneos de esta región que se presentan dispuestos en cuevas y abrigos, como son Peña Larga (Crípan, Álava) y Mendandia (Sáseta, Treviño) (GARCÍA-GAZÓLAZ y SESMA, 1999, 2001, 2007a).

A lo largo de las diferentes campañas de excavación dirigidas por J. García Gazólaz y J. Sesma entre 1.996-1.999 se han recuperado más de 550 estructuras, descritas todas ellas como depósitos en hoyo (GARCÍA-GAZÓLAZ y SESMA, 1999; 2001; 2007a). Éstas se clasifican en *construcciones, enterramientos, estructuras de combustión, depósitos de almacén, basureros, silos y depósitos rituales*. Del total de las 550 estructuras, 34 corresponden a enterramientos, en los que se han recuperado restos humanos de 36 individuos, en su mayoría dispuestos en fosas individuales o simples.

Del total de 36 individuos inhumados en el yacimiento de Los Cascajos, 25 se agrupan en una superficie de 550 m², localizada justo en la zona central del poblado, en la que no existe ninguna otra estructura, por lo que podría tratarse de una necrópolis (Figura III.2a). El resto de los 11 individuos se encuentran dispersos por el poblado de forma heterogénea con una distancia notable entre ellos. Un caso particular es el hallazgo de un inhumado (CAS-517) dentro de una de las ocho cabañas del poblado (GARCÍA-GAZÓLAZ y SESMA, 1999, 2001, 2007a) (Figura III.2b).

Todos estos datos arqueológicos de este yacimiento, hacen que Los Cascajos sea una referencia fundamental sobre el mundo funerario de las primeras comunidades campesinas, que establecieron su hábitat al aire libre en esta región (GARCÍA-GAZÓLAZ y SESMA, 1999; 2001; 2007a).

Del total de las dataciones realizadas en este yacimiento, tanto las obtenidas a partir de material óseo como de otro tipo de material datable, podemos observar dos amplias fases:

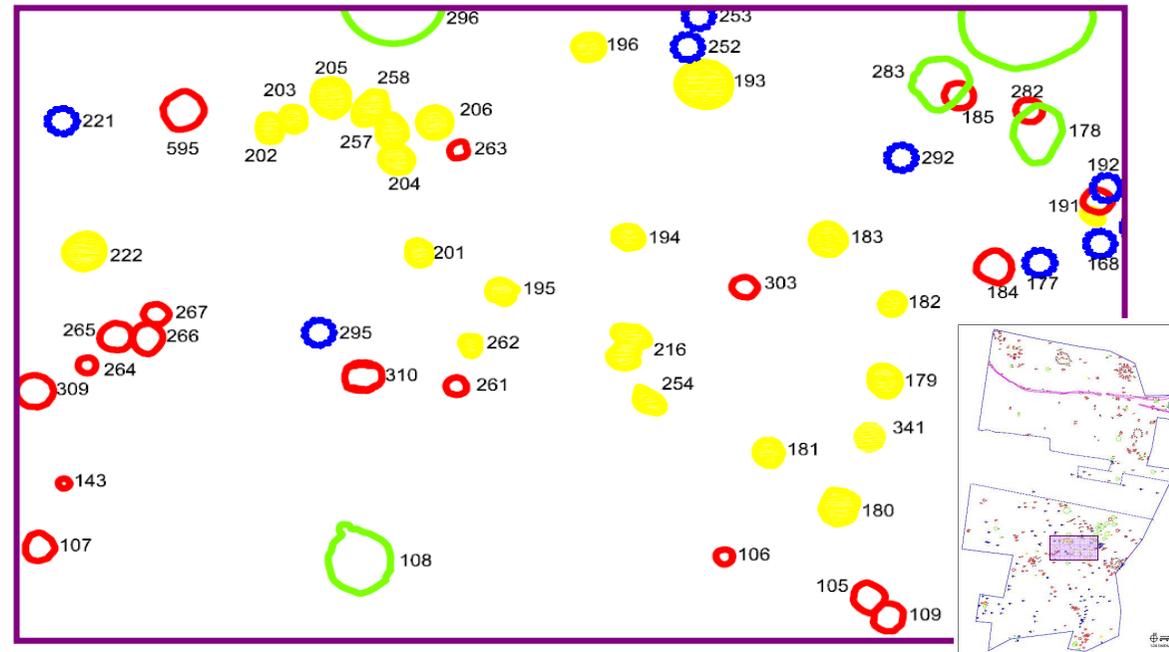
1) La **Fase I** correspondiente al Neolítico Antiguo, que en dataciones absolutas se extiende entre 6.435 ± 45 BP y 5.640 ± 35 BP. A esta fase se asocian once individuos.

2) La **Fase II** perteneciente al Neolítico Medio, se extiende hasta 5.100 ± 50 BP; fase a la que solo pertenecen dos individuos. El resto de los individuos, que son la mayoría, se han asignado a una fase denominada

Fase I-II, al no presentar ningún tipo de ajuar o característica que permita situarlos en alguna de estas dos fases (GARCÍA-GAZÓLAZ y SESMA, 2007a)

a)

Figura III.2. Plano del yacimiento neolítico de Los Cascajos (Los Arcos, Navarra) facilitado por J. Sesma y J. García-Gazolaz. a) Se muestra la sección del mapa correspondiente a las inhumaciones de la necrópolis. B) Se muestran las secciones del mapa correspondientes a las inhumaciones dispersas por el poblado. En rojo, las estructuras correspondientes a silos y basureros; en rosa la empalizada; en azul estructuras sin determinar; en verde estructuras de combustión; en amarillo estructuras correspondientes a inhumaciones y en marrón estructuras tipo poste.



La mayoría de las inhumaciones son individuales en fosa simple tipo hoyo, variando únicamente el tipo de planta (circular, ovalada o en forma de ocho) y las dimensiones (diámetro, profundidad). Cabe destacar la existencia de asociación de inhumaciones, donde se observan dos casuísticas: a) individuos *superpuestos* (CAS-193 superior e inferior) y b) individuos inhumados en *fosas adyacentes* (CAS-202-CAS-203 y CAS-257-CAS-258) (GARCÍA-GAZÓLAZ y SESMA, 1999; 2001; 2007a).

El ritual funerario conlleva unánimemente la colocación del inhumado en posición flexionada, bien sobre un costado (en el 60% de los casos) o decúbito supino (en el 30%). Las extremidades se repliegan hacia el tronco y éste se vuelca ligeramente al frente. Esta postura contraída, la presentan todos los cuerpos, independientemente de la forma y dimensiones de la fosa (GARCÍA-GAZÓLAZ y SESMA, 2007a).

El ajuar recuperado asociado a las inhumaciones es escaso, presentándose solo en 16 individuos. Mayoritariamente se trata de cerámicas, molinos de mano y cuchillos de sílex. También se han recuperado cuentas discoideas, colgantes y diademas de concha o hueso, entre otros adornos personales. Además, dos de las inhumaciones están cubiertas con una gran losa de arenisca y otras siete con tierra, pudiendo presentar estas últimas cereal carbonizado, piedras y fragmentos de molinos de mano (GARCÍA-GAZÓLAZ y SESMA, 1999, 2001, 2007a).

III.3.3. Yacimiento de Paternanbidea (Ibero, Pamplona)

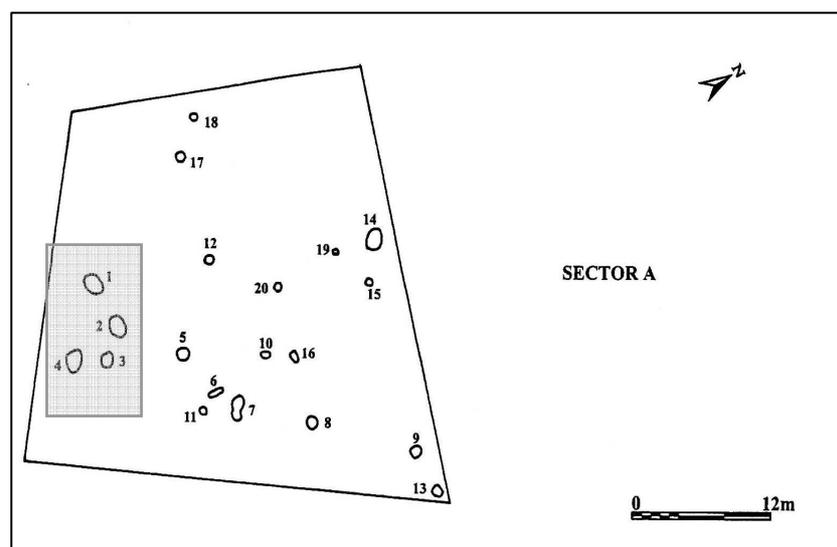
Se trata de un yacimiento al aire libre ubicado dentro del término municipal de Ibero en la cuenca de Pamplona (hacia el suroeste) (Figura

III.1). El registro se sitúa sobre el tercer nivel del río Arga que atraviesa Navarra de norte a sur. La datación absoluta a partir de fragmentos óseos ofrece una cronología absoluta entre 6.090 ± 40 BP y 5.960 ± 40 BP (GARCÍA-GAZÓLAZ,1998; GARCÍA-GAZÓLAZ y SESMA, 2007b).

La excavación de este yacimiento ha sido dirigida por J. Sesma y J. García GazólaZ obteniéndose un total de 34 estructuras de tipo *depósitos en hoyos*, correspondiendo cuatro de ellas al área de enterramiento (Figura III.3). La estructura 1 es un enterramiento múltiple y las otras tres son dobles, siendo dos de estos enterramientos simultáneos (estructura 2 y 4) debido a la disposición de los esqueletos en conexión anatómica y contacto directo. En una de estas estructuras (fosa 2), un individuo lleva un cuenco con decoración impresa a un costado y el otro, un collar de dos vueltas a base de pequeñas cuentas circulares de hueso y una pulsera de 7 vueltas (variscita). Los inhumados en las estructuras restantes no presentan elementos de adorno, pero sí han ofrecido varias armaduras de flechas asociadas (GARCÍA-GAZÓLAZ,1998; GARCÍA-GAZÓLAZ y SESMA, 2007b).

La cuarta estructura (la estructura 1) difiere del resto por tratarse de un enterramiento múltiple, con al menos cinco individuos inhumados, pero no simultáneamente. Además, en esta estructura aparecen distintos tipos de cuentas de collar sobre concha, piedra, hueso y variscita. Este yacimiento ha proporcionado un número mínimo de 11 individuos.

Figura III.3. Plano del sector A del yacimiento de Paternanbidea: Localización de las estructuras arqueológicas. En el recuadro gris se indican las estructuras correspondientes a los enterramientos (Figura modificada de GARCÍA GAZÓLAZ, 1998).



La enorme cantidad de industria lítica recuperada, de clara cronología neolítica, invita a pensar en la existencia de otras estructuras de habitación correspondientes a una fase antigua del Neolítico, ubicadas fuera de la zona de excavación (GARCÍA-GAZÓLAZ, 1998; GARCÍA-GAZÓLAZ y SESMA, 2007b).

III.3.3. La cueva de Marizulo (Urnieta, Guipúzcoa)

Esta cueva se localiza en el flanco meridional del monte Pardaki, en el barrio Goiburu del término municipal de Urnieta, a 295 m de altitud (Figura III.1). Su nombre significa el "agujero" o "la cueva de Mari" (ser mitológico vasco). La cueva es pequeña, de sólo unos 5 m de profundidad y tiene varias entradas muy estrechas, por lo que ofrece el aspecto de una serie de pequeñas galerías conectadas entre sí.

Fue descubierta en 1.961 por M. Laborde y fue excavada a lo largo de cinco campañas de excavación que comenzaron en 1.962 y finalizaron en 1.967, dirigidas por M. Laborde, J.M. de Barandiaran y J. Altuna. El yacimiento se encuentra junto a la boca principal y en él se han identificado cuatro niveles de habitabilidad, el nivel I corresponde al Calcolítico, el II al Neolítico y el III y IV al Epipaleolítico (LABORDE *et al.*, 1966, 1967).

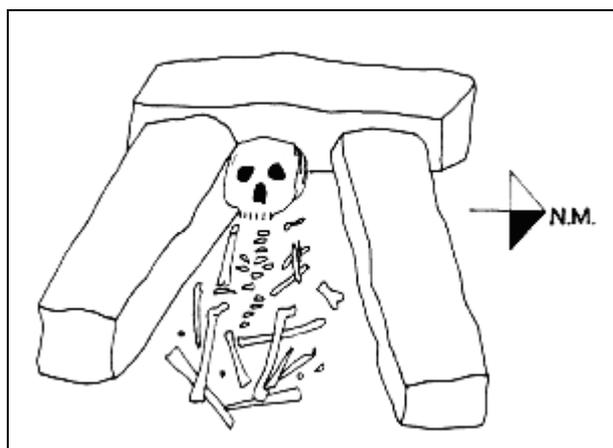
En la parte inferior del nivel I, se halló el esqueleto de un individuo masculino, de unos 25 años de edad que aparece enterrado en posición plegada, asociado a los huesos de un perro y un cordero; todo ello rodeado de tres grandes piedras que cerraban la sepultura, excepto por el este, orientación a la que miraba el cadáver (Figura III.4) (BASABE, 1971).

La datación por C^{14} para este enterramiento proporcionó una fecha de 5.285 ± 65 BP (ALDAY *et al* 1995). Asimismo, en la parte interior de la cueva, por encima de la sepultura individual mencionada, se han recuperado los restos, revueltos y dispersos, de al menos cuatro individuos, dos adultos, un juvenil y un individuo infantil, quienes presentan un gran desgaste dental (ARMENDÁRIZ y ETXEBERRÍA en, <http://personales.unicam.es/armendaa/cuevas%20sepulcrales.htm>.)

En el nivel I se han recuperado piezas de sílex (raspadores, buriles, truncaduras, microlitos geométricos...), entre las que destaca un gran "cincel" de retoque invasor, numerosos fragmentos de cerámica, punzones y otras piezas de hueso y asta, y varias cuentas de piedra, lignito y hueso; sin embargo, no es posible relacionarlos, con seguridad,

con las fases funerarias mencionadas, ya que pueden atribuirse tanto al Neolítico, como al Calcolítico o a la Edad del Bronce (LABORDE, 1967).

Figura III.4. Cueva sepulcral de Marizulo: Inhumación individual del nivel I. Figura de LABORDE *et al.*, (1967)



III.3.4. La cueva de Fuente Hoz (Anúcita, Álava)

La pequeña cueva de Fuente Hoz se ubica en la margen derecha del río Bayas junto al pueblo de Pobes en Álava (Figura III.1). Fue excavada en diferentes campañas entre 1.980 y 1.986, bajo la dirección de A. Baldeón.

La secuencia estratigráfica obtenida comprende desde el Epipaleolítico al Neolítico (BASABE y BENNASSAR 1983). En el nivel I, de carácter funerario, se distinguen dos subniveles, el Ia y el Ib. En el nivel Ia se articulan dos niveles de enterramiento, el más reciente constituido por restos muy alterados de dos individuos y tras este aparece un enterramiento con un número mínimo de tres individuos.

En el nivel Ib se localiza un sujeto en posición anatómica, bajo el cual subyacen otros niveles de habitación. No obstante, se ha de puntualizar, que la exacta repartición por capas de los individuos no está clara, ya que solo se mencionan 6 individuos, cuando el NMI es de 9. La cronología para este nivel I, es neolítica (5.240 ± 110 BP y 5.160 ± 110 BC (BALDEÓN 1984; 1986).

El grupo de individuos se corresponde a un neonato, un adolescente y seis individuos de edad adulta: (FH-1-FH-6) tratándose en su mayoría de individuos masculinos (BASABE y BERNNASSAR, 1983)

III.4. EDAD DE BRONCE

De este periodo prehistórico hemos analizado los restos humanos del yacimiento guipuzcoano de *Urtiaga* (Deba, Guipúzcoa). Se localiza en la falda de la colina Salbatore, en el barrio de Itziar del término municipal de Deba, a 160 m de altitud (Figura III.1). Las primeras excavaciones de este yacimiento fueron realizadas por T. de Aranzadi y J.M. de Barandiarán entre los años 1.928-1.936, y posteriormente por J.M. de Barandiarán entre 1.955-1.960.

La cueva comprende una serie de niveles que abarcan un periodo de tiempo que va desde el Magdaleniense Final (Paleolítico Superior) al Neolítico, donde se recuperaron numerosos restos humanos dispersos entre los diferentes niveles arqueológicos. Al *nivel D*, perteneciente al Magdaleniense Final, se atribuyeron el cráneo B1, un axis y varios fragmentos craneales pertenecientes a otro sujeto; al *nivel C*, perteneciente al Aziliense, se atribuyeron 4 cráneos (al menos dos de ellos adultos, el A1,

masculino y el A2, femenino), otros fragmentos craneales y huesos del esqueleto postcraneal.

En los *niveles B* y *A* (Neo-Eneolítico y posterior) se hallaron restos humanos esparcidos por casi toda la extensión del yacimiento, que podrían corresponder a un mínimo de 16 individuos (BARANDIARÁN, 1948). Aunque actualmente se conservan únicamente restos correspondientes a 6 individuos (ARMENDÁRIZ y ETXEBERRÍA 1983)

Las dificultades inherentes a la identificación de la posición estratigráfica de estos restos han sido origen de amplias reservas, que los propios excavadores no dudan en admitir (ARANZADI y BARANDIARÁN, 1948; DE LA RÚA, 1988), sobre todo en los niveles más antiguos. La principal cuestión a resolver en este yacimiento es la referente a la identificación estratigráfica y asignación cronológica de la serie ósea de Urtiaga.

El hecho de que se conozcan sendas dataciones de los niveles D y C (ALTUNA y DE LA RÚA, 1972), perfectamente concordantes con el periodo Paleolítico-Epipaleolítico citado, no supone argumento suficiente para que los cráneos B1, A1 y A2 se consideren de esa antigüedad, dada la problemática que plantea su adscripción estratigráfica.

Algunas evidencias, como la existencia de utensilios de piedra tallada teñidos con manchas verdosas de óxido de cobre en los niveles B, C y D, hacen pensar que durante la Edad del Hierro los niveles superiores de Urtiaga fueron removidos hasta alcanzar el nivel C y D, y por tanto los restos humanos hallados en estos niveles pertenecerían a la población de

dicho osario del Neo-Calcolítico. Así en 1.988, se llevó a cabo una nueva datación de restos óseos mediante un análisis de ^{14}C mediante acelerador de partículas (Upspsala, Suecia) (ALTUNA y DE LA RÚA, 1989).

Estas nuevas dataciones, inducen a asignar estos cráneos a etapas más recientes de nuestra prehistoria, al considerar más adecuados los valores ofrecidos por el ^{14}C : el cráneo A1 y sendas muestras del cráneo B1 arrojaron los siguientes valores respectivamente, 3.430 ± 100 BP, 3.475 ± 120 BP y 3.445 ± 110 BP. Estas dataciones vendrían a ratificar las sospechas sobre la existencia de una posible remoción en algunos sectores de Urtiaga, que podrían haber provocado el deslizamiento.

En consecuencia, los restos humanos que hasta ahora se creían pertenecientes al Aziliense y Magdaleniense, parece que deben atribuirse al nivel B, quedando datado en la primera mitad del II milenio aC, fecha que no desentona con el aspecto general de los ajuares funerarios recuperados en dicho nivel, atribuibles al Bronce Antiguo o Pleno (ALTUNA y DE LA RÚA, 1989).

En la Tabla III.1, se indican los yacimientos estudiados en la presente tesis doctoral, y el número de individuos analizado en cada uno de los casos.

Tabla III.1. Yacimientos prehistóricos estudiados en este trabajo, junto a su localización geográfica, cronología, número mínimo de individuos recuperados y el tamaño muestral analizado. La última columna corresponde a las siglas que se le han asignado a cada yacimiento.

| Yacimiento | Localización | Cronología | Ntotal | Nanal. | SIGLA |
|---------------|----------------------------------|---------------------------------|--------|--------|-------|
| La Pasiega | Puente Viesgo, Cantabria | Magdaleniense | 1 | 1 | PS |
| La Chora | San Pantaleón de Aras, Cantabria | Magdaleniense VI | 1 | 1 | CH |
| Erralla | Cestona, Guipúzcoa | Magdaleniense (12.310 BP) | 1 | 1 | ERR |
| Aizpea | Aribe, Navarra | Mesolítico (6.600±65 BP) | 1 | 1 | AZ |
| Los Cascajos | Los Arcos Navarra | Neolítico (6185-5185 BP) | 36 | 27 | CAS |
| Paternanbidea | Ibero, Navarra | Neolítico (6.090-5.960 BP) | 11 | 9 | PAT |
| Marizulo | Urnietta, Guipúzcoa | Neolítico (5.285 BP) | 1 | 1 | MZ |
| Fuente Hoz | Anúcita, Álava | Neolítico (5.240-5.160 BP) | 9 | 6 | FH |
| Urtiaga | Deba, Guipúzcoa | Edad de Bronce (3.475-3.430 BP) | 6 | 2 | URT |

IV. METODOLOGÍA

IV.1. ANÁLISIS MOLECULAR DE MUESTRAS PREHISTÓRICAS

Desde el punto de vista técnico, el análisis de ADN requiere de una gran precisión y dedicación metodológica, debido a la mala preservación de las muestras, lo que nos obliga a adaptar la metodología, casi, a cada muestra.

IV.1.1. Selección de las muestras

En el presente estudio se ha trabajado principalmente con *piezas dentarias*, ya que es el material de selección que ofrece mayores garantías a la hora de recuperar ADN (KUROSAKI *et al.*, 1993; WOODWARD *et al.*, 1994; OOTA *et al.*, 1995; ZIERDT *et al.*, 1996). Sin embargo, en algunos casos hemos tenido que recurrir a los *restos óseos* para realizar la extracción de ADN, ya que era el único material antropológico disponible.

Además, se ha tomado una muestra bucal de todo el personal que ha manipulado los restos, de forma que al comparar los resultados obtenidos podamos descartar posibles contaminaciones del material arqueológico con ADN moderno humano de los investigadores y arqueólogos.

El material antropológico se ha enviado directamente a nuestro centro, Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea, desde su ubicación original, para la selección de las muestras susceptibles para el análisis. Siempre que ha

sido posible se ha seleccionado más de una pieza dentaria por individuo, para realizar tanto el análisis por **duplicado** en nuestro laboratorio, como para corroborar nuestros resultados mediante la **replicación** en un laboratorio independiente. Concretamente en este trabajo la replicación de las muestras la ha llevado a cabo el grupo de investigación dirigido por *Dr. Vicente Cabrera*, de la Facultad de Biología, área de Genética, de la Universidad de La Laguna (Santa Cruz de Tenerife).

En aquellos casos en los que no se dispone de ninguna pieza dentaria o no hay piezas dentarias suficientes para la replicación de los resultados, se han seleccionado zonas de hueso compacto, preferentemente de huesos largos. En este caso, se primó la selección de aquellos huesos que presentaban la superficie externa lisa y aparentemente bien conservada.

Una vez seleccionadas las piezas dentarias susceptibles del análisis molecular, se realizó un registro fotográfico de cada una de las caras de las mismas (Figura IV.1) y posteriormente se tomaron medidas del diámetro buco-lingual y mesio-distal, así como de la longitud de la corona y de la raíz (Anexo I). En el caso de utilizar restos óseos, también se ha realizado un registro fotográfico de cada uno de los huesos analizados y se han tomado los diámetros de la parte distal, central y proximal, así como la longitud total. Todo el proceso de manipulación de las muestras se ha realizado en superficies que han sido sometidas a una limpieza exhaustiva con lejía y posteriormente, han sido irradiadas con luz ultravioleta de 254 nm de longitud de onda, llevando en todo momento bata, gorro, mascarilla y guantes; estériles y de un solo uso.

Figura IV.1. Ficha del registro fotográfico y métrico de las piezas dentarias. Se indican las cinco caras del diente: mesial, distal, bucal, lingual y oclusal, junto con las medidas en mm. La pieza dentaria corresponde al individuo recuperado en la estructura 90 del yacimiento de Los Cascajos.



IV.1.2. Limpieza y procesamiento de las muestras

La limpieza superficial de las muestras analizadas permite eliminar la mayor parte de la suciedad procedente del enterramiento que suele acompañar al material. Asimismo, permite eliminar posibles moléculas de ADN contaminante procedentes tanto del personal encargado de la excavación, como de los investigadores que han realizado el estudio morfológico y el análisis genético.

Se han llevado a cabo dos protocolos alternativos, dependiendo del material de partida del cual se va a realizar la extracción de ADN, bien sea diente o hueso:

IV.1.2.1 Procesamiento de las piezas dentarias: limpieza y serrado

El protocolo empleado para la limpieza de las piezas dentarias es una modificación metodológica de GINTHER *et al.*, (1992) tomada de LALUEZA, (1996). Se basa en una limpieza superficial mediante una mezcla de ácidos con alto poder depurinizante (ácido acético y ácido clorhídrico), el cual inactiva el ADN superficial. Tras este paso, se realiza una limpieza con etanol al 70% y finalmente, para eliminar los restos de estos ácidos, la pieza dentaria se sumerge en agua estéril. A continuación la pieza dentaria se somete a una irradiación ultravioleta de 254 nm de longitud de onda por todas las caras del diente.

| SOLUCIONES Y REACTIVOS |
|--|
| 20% de ácido acético: 15% ácido clorhídrico 20 ml de ácido acético (<i>Panreac</i>) 15 ml de ácido clorhídrico (<i>Panreac</i>) 65 ml de H ₂ O destilada estéril |
| 70% etanol 70 ml de etanol (<i>Panreac</i>) 30 ml de H ₂ O destilada estéril |
| H₂O destilada estéril desionizada <i>Las soluciones se almacenan a temperatura ambiente. Todas las soluciones se irradian con luz ultravioleta de 254nm de longitud de onda</i> |

Metodología

1. La pieza dentaria se sumerge durante 10 minutos (min) en un volumen suficiente como para cubrir completamente el diente, de una solución de 20% de ácido acético: 15% de ácido clorhídrico. Tras lo cual la solución usada se decanta (Figura IV.2a).
2. Se añade el mismo volumen de etanol 70% y se lava durante 15 min. Tras este tiempo se desecha el etanol usado, esterilizando así

la superficie dental de cualquier agente microbiano que pudiera estar presente.

3. Se sumerge la muestra en H₂O destilada estéril durante 30 min, para eliminar los restos de las soluciones anteriores.
4. Tras desechar el H₂O destilada estéril, el diente se irradia en un *cross-linker* con luz ultravioleta de 254 nm de longitud de onda por cada una de sus caras durante 30 min.

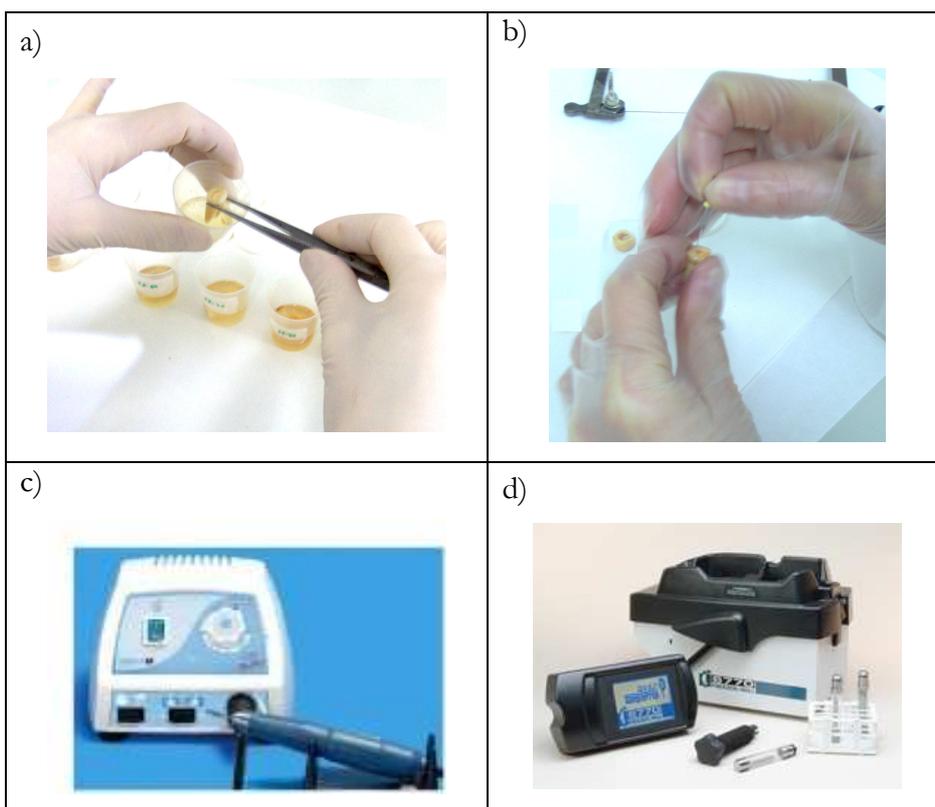
El diente se sierra en la zona cervical, entre la raíz y la corona, mediante una sierra de joyería, dejando descubierta la cavidad pulpar, que se va a limar con una lima odontológica (*Mitex*) (Figura IV.2b). De este modo se obtiene una mayor cantidad de tejido pulpar.

IV.1.2.2 Procesamiento del tejido óseo compacto: limpieza y pulverización

El protocolo para realizar la limpieza de la superficie externa del hueso compacto comienza con el raspado de esta superficie mediante una lima gruesa odontológica (*Sofu*), acoplada a un micromotor y una pieza de mano odontológica (*Novfrom*) (Figura IV.2c). Tras este proceso de limpieza, se recorta un fragmento a modo de hendidura de aproximadamente 2 cm de la zona cortical limpia.

Los fragmentos de hueso una vez limpios, se pulverizan mediante un molino de impactación electromagnética refrigerado con nitrógeno líquido (N₂) (*Freezer Mill, Spex 6770 Industries Inc., Edison N.J.*) (Figura IV.2d). El N₂ líquido congela la muestra facilitando así su pulverización y evita la posible degradación del material genético por el exceso de calor generado durante la impactación mecánica.

Figura IV.2. Imágenes del proceso de limpieza y limado de las piezas dentarias, junto con los aparatos utilizados en el proceso de limpieza y tratamiento de las muestras. a) Limpieza de la cara externa de las piezas dentarias mediante ácidos. b) Limado de la cavidad pulpar del diente c) Micromotor con pieza de mano utilizado para la limpieza de los restos óseos. d) Molino de impactación electromagnética para la pulverización de los restos óseos.



El molino consta de una cámara interior que se llena de N₂ líquido, dentro de la cual se coloca un vial de 10 cm de largo, que consta de dos extremos metálicos y un tubo transparente de policarbono entre ambos extremos. En el interior del vial se deposita la muestra junto con una pieza metálica que actúa como impactador.

Cuando el molino se pone en marcha, el impactador se mueve entre los dos polos del electroimán, impactando contra los extremos metálicos del vial y pulverizando la muestra.

Una vez pulverizada la muestra, los viales se dejan a temperatura ambiente, de modo que se facilita la apertura de los mismos. Tras sacar con cuidado el impactador, la muestra pulverizada se decanta a un tubo estéril de polipropileno bien etiquetado.

La muestra ósea pulverizada se somete a un paso de lavado con 5 ml de 0,5 M EDTA (pH 8-8.5). El EDTA es un quelante iónico que actúa secuestrando las sales iónicas contenidas en la muestra, incluyendo el calcio del hueso. Así, las células del hueso se hacen más accesibles a la solución de lisis.

Se agita suavemente el tubo durante unos minutos para lavar el hueso pulverizado y se centrifuga 5 min a 2.500 rpm. Tras la centrifugación el polvo de hueso queda adherido al fondo del tubo y se decanta el sobrenadante.

IV.1.3 Extracción del ADN

El proceso de extracción de ADN se inicia con la incubación de la pieza dentaria o el polvo de hueso en 5 ml de una solución de lisis (0,5M EDTA; 50mM Tris HCl; SDS 0,5%; 200µl *Proteinasa K*) durante dos horas a 56 °C con agitación mecánica. En este proceso se realiza una descalcificación con EDTA y una hidrólisis de los posibles restos proteicos y lipídicos.

| SOLUCIONES Y REACTIVOS |
|--|
| 0,5M EDTA pH 8,0-8,5 Ajustar el pH con NaOH concentrado Guardar a temperatura ambiente |
| SDS 5% Lauril sulfato sódico Guardar a temperatura ambiente |
| Tris-HCl 1M pH 8,0-8,5 Guardar a temperatura ambiente |
| 10mg/ml de <i>proteínasa K</i> Disuelto en 10mM de tris-HCl pH 8,0 Guardar a -20 °C |
| Solución de lisis 0,5M de EDTA a pH 8,0-8,5; 50mM Tris HCl a pH 8,0-8,5; SDS 0,5% y 200µl de <i>Proteínasa K</i> Guardar a temperatura ambiente No añadir la <i>proteínasa K</i> hasta el momento de utilizar la solución de lisis <i>Las soluciones se irradian con luz ultravioleta de 254 nm de longitud de onda</i> |

El ADN se aísla de los restos celulares mediante una extracción con fenol/cloroformo. El componente proteico del extracto se desnaturaliza y queda disuelto en la fase fenólica, mientras que los ácidos nucleicos permanecen disueltos en la fase acuosa.

Metodología

1. Incubar la muestra en 5 ml de solución de lisis a 56°C con agitación durante 2 h. Centrifugar a 5.000 rpm durante 10 min a 4 °C y recoger el sobrenadante.
2. Añadir un volumen de fenol equilibrado con 10mM Tris a pH>8,0 similar al volumen de sobrenadante recuperado, se homogeniza y se centrifuga a 5.000 rpm durante 10 min a 4 °C.
3. Recuperar la fase acuosa, localizada en este caso debajo de la fenólica; ya que cuando se trabaja con altas concentraciones de EDTA las fases se invierten. Mediante pipetas de precisión y puntas de membrana estériles, la fase acuosa se transfiere a un tubo

estéril, teniendo mucho cuidado de no arrastrar el más mínimo resto de fenol, ya que incluso cantidades muy pequeñas del mismo pueden causar una completa inhibición de la *Taq polimerasa*.

4. Añadir a la fase acuosa recuperada un volumen semejante de cloroformo; se homogeniza la muestra y se centrifuga a 5.000 rpm durante 10 min a 4 °C.

La fase acuosa se concentra mediante un Centricon-30 (*Amicon*) siguiendo las instrucciones del fabricante (Figura IV.3). Este tipo de concentradores permite reducir enormemente el volumen de la muestra, al mismo tiempo que se eliminan, por microseparación, las sales residuales de la muestra, que de otro modo dificultarían la disolución del ADN, llegando incluso a inhibir las reacciones enzimáticas posteriores. El volumen recuperado del ADN, es diluido hasta obtener un volumen final de 300 μ l. Gracias a esta dilución, se diluyen junto con el ADN los posibles inhibidores presentes en el extracto final. Tras la dilución del ADN se hacen tres alícuotas de 100 μ l y se almacenan a -20 °C, correctamente etiquetadas.

En cada tanda de extracción se incluyen además, al menos dos **blancos de extracción**, que consisten en una muestra que se somete a todo el proceso de extracción pero a la que no se le añade tejido dentario u óseo. Estos controles sirven para poner de manifiesto las posibles contaminaciones que pudieran ocurrir durante la fase de extracción en el laboratorio.

Figura IV.3. Imagen de Centricon-30 (Amicon)



IV.1.4. Cuantificación del ADN: PCR Cuantitativa

Diferentes autores han propuesto que a partir de extractos de ADN_a que contengan un número de copias de ADN inferior al millar, no es posible obtener resultados reproducibles (GILBERT *et al.*, 2003; HANDT *et al.*, 1996). Por ello, uno de los criterios de autenticación consiste en la estimación del número de moléculas de ADN_{mt} presentes en los diferentes extractos de ADN_a, mediante cuantificación absoluta por *PCR Cuantitativa a Tiempo Real (quantitative PCR, qPCR)*

La cuantificación por qPCR monitoriza la reacción de la PCR al mismo tiempo que ésta está teniendo lugar, gracias a la utilización de sondas o marcadores fluorescentes. La detección comienza en los primeros ciclos de amplificación, cuando la cantidad de producto amplificado sobrepasa un determinado umbral de detección; cuanto mayor es el número de moléculas de ADN_{mt} presentes en el extracto de ADN_a, antes se sobrepasa este umbral y se inicia la detección fluorescente.

Durante los primeros ciclos de la PCR se produce muy poco cambio de señal de fluorescencia, formándose lo que se denomina la ***línea basal***.

La detección comienza cuando se produce un incremento de la intensidad de la fluorescencia sobre la línea basal. En este punto se fija el umbral de detección de la fluorescencia o **Threshold** (Ct). El Ct es el número del ciclo de amplificación en el cual tiene lugar el incremento de la señal fluorescente (Figura IV.4)

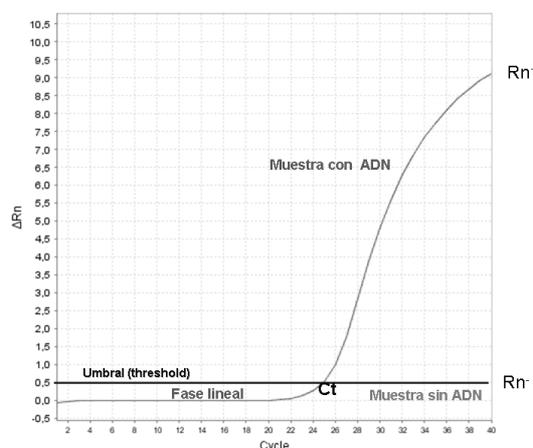
La qPCR permite llevar a cabo una cuantificación absoluta de la cantidad de moléculas de ADN presentes en los extractos de muestras problema. Para ello, se realiza una dilución seriada de una muestra de concentración conocida (estándar) y se amplifican para generar una recta estándar, que relaciona el número de copias entre las diferentes diluciones del estándar y sus valores correspondientes de Ct. Sobre esta recta se extrapolan los valores de Ct obtenidos para aquellas muestras que se desea cuantificar, obteniéndose el número de copias correspondiente (Figura IV.4).

Los ensayos de cuantificación se pueden llevar a cabo utilizando agentes fluorescentes que se unen al ADN bicatenario (Ej. SYBR-GREEN) o sondas fluorescentes (Ej. TaqMan). La cuantificación absoluta de los extractos de ADN de las muestras antiguas, se ha llevado a cabo mediante la química del SYBR-GREEN o agentes fluorescentes que se unen al ADN bicatenario. A medida que avanza la PCR la cantidad de moléculas de ADN bicatenarias aumenta, aumentando así la señal fluorescente.

La única limitación que presenta esta química, es que el SYBR-GREEN se une indiscriminadamente a cualquier ADN bicatenario, incluyendo los dímeros de cebadores y productos inespecíficos, lo cual nos lleva a

sobrealimentar la cantidad de moléculas molde que se obtienen. Se puede realizar una **curva de disociación**, que ponga de manifiesto estos anillamientos inespecíficos, de modo que optimizando la concentración de los cebadores y ajustando la temperatura de anillamiento, finalmente podamos superar esta limitación.

Figura IV.4. Cinética de amplificación y parámetros empleados en la cuantificación por qPCR



La curva de disociación se realiza una vez finalizada la PCR. Para ello se incrementa la temperatura desde los 60 °C hasta los 96 °C de forma constante. A medida que aumentamos la temperatura, disminuye la cantidad de ADN bicatenario (se disocia) y consecuentemente también disminuye la señal de fluorescencia.

Cuando se alcanza la temperatura de disociación (T_m , *Melting Temperature*), se observa un descenso brusco de la fluorescencia. Dependiendo del contenido GC y la longitud de los amplificadores obtendremos diferentes T_m , lo que nos permite diferenciar el producto amplificado de los dímeros de cebadores y otras inespecificidades.

Obtención de la muestra de estándar

Necesitamos una muestra estándar de concentración conocida que nos permita construir una recta patrón mediante la cual, por extrapolación, se puede estimar la cantidad de moléculas molde de los extractos de ADN.

El primer paso consiste en la amplificación de una muestra de ADN con los cebadores A1/5R del segmento hipervariable I (HVS-I) de la región control del ADNmt (Tabla IV.1). Este amplificado, de 405 pares de bases (bp) de longitud, contiene el fragmento que se amplifica utilizando los cebadores A1 y A1R (Tabla IV.1), de 112 pb de longitud, que será el que se utilizará para construir la curva estándar. El producto de PCR se clona, de modo que obtendremos una cantidad importante de estándar para cuantificaciones futuras. El proceso de clonación se describe en el apartado IV.1.5.3 de este capítulo.

El segundo paso consiste en la cuantificación exacta de la cantidad de ADN que tenemos en el amplificado. Para ello, la muestra insertada en el plásmido se digiere con la enzima de restricción *Eco RI*, de modo que se obtiene un fragmento lineal de 512 pb de longitud. Una vez digerido, el ADN se migra en el bioanalizador 2500 de Agilent utilizando el DNA KIT-1000bp, el cual nos indica la concentración y el tamaño del fragmento analizado (Figura IV.12). La cantidad de moléculas de ADN del estándar se estima a partir del dato obtenido de su concentración, teniendo en cuenta el número de nucleótidos que tiene la molécula del estándar, que un nucleótido es igual a 330 gr/mol y que un mol son $6 \cdot 10^{23}$ moléculas.

Por último, el tercer paso consiste en la realización de diluciones seriadas de la muestra estándar; es decir se realizan diluciones 1/10 ocho veces (Figura IV.5), las cuales se amplifican con los cebadores A1 (*Forward*) y A1R (*Reverse*). De este modo, se construye la recta patrón a partir de la cual, por extrapolación, se calcula la cantidad de moléculas molde de las muestras problema (Figura IV.6).

Figura IV.5. Diluciones seriadas del extracto de la muestra estándar.

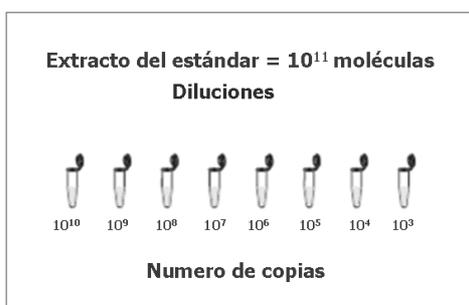
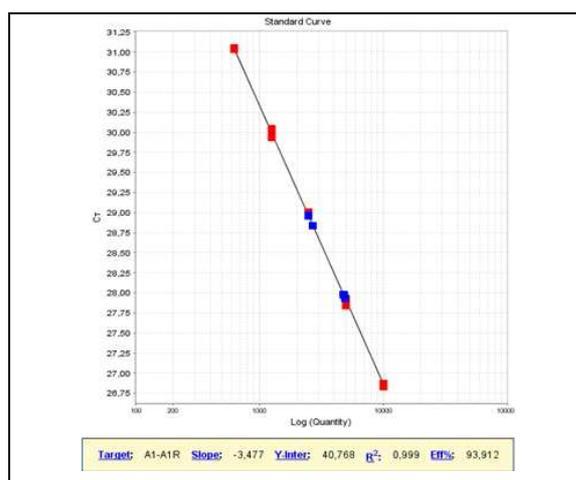


Figura IV.6. Curva estándar. Los cuadrados rojos corresponden a las diluciones seriadas del extracto de la muestra estándar y los azules corresponden a las muestra problema.



Reactivos de la qPCR

Tampón 2.0X de Power SYBR Green MasterMix qPCR (Applied Biosystem)

0,5µM de los cebadores A1 y A1R (Tabla 3 y Figura 6)

Temperaturas y ciclos de la qPCR

| 1 ciclo | 40-45 ciclos | 1 ciclo |
|--------------|-------------------------|------------------------------|
| 95 °C-10 min | 95 °C-15s 60 °C-1min | Disociación 60 °C a 96 °C |

IV.1.5. Análisis de la variabilidad del ADNmt

IV.1.5.1. Secuenciación del HVS-I de la región control del ADNmt

Para llevar a cabo la secuenciación del HVS-I a partir de extractos de ADN_a, se han utilizado 6 parejas de cebadores (ALONSO *et al.*, 2003), que nos permiten amplificar seis fragmentos solapantes de aproximadamente 100 pb de longitud cada uno, de modo que finalmente se obtiene la secuencia completa comprendida entre los nucleótidos 15.995 y 16.399 (Tabla IV.1).

Cada fragmento del HVS-I ha sido amplificado en PCRs independientes. Se prepara la siguiente mezcla de reacción en un volumen final de 25µl: 10mM Tris-HCL pH 8.3; 50mM KCl; 2M MgCl₂; 100µM de cada dNTP; 20µg BSA; 0.4µM de cada cebador; 1U de *AmpliTaq Gold* polimerasa y 10µl de ADN diluido con BSA (1:10). En todas las PCRs, además de los blancos de extracción se han incluido varios **controles negativos de la PCR**, consistentes en muestras que se someten a todo el proceso de amplificación, pero a las que no se ha añadido extracto de ADN. Estos controles sirven para poner de manifiesto posibles contaminaciones que pudieran ocurrir durante la fase de amplificación en el laboratorio.

Tabla IV. 1. Secuencia de los cebadores utilizados para la amplificación de la región **HVS-I**, junto con la T^a de anillamiento correspondiente para cada par de cebadores y el tamaño del fragmento obtenido en pares de bases (pb).

| Secuencia de los cebador (5'→3') | T^a (°C) | Tamaño (pb) |
|---|------------|-------------|
| A1 CAC CAT TAG CAC CCA AAG CT A1R ACA TAG CGG TTG TTG ATG GG | 60 | 112 |
| 1F GAA GCA GAT TTG GGT ACC AC 1R GTA CTA CAG GTG GTC AAG TAT | 57 | 123 |
| 2F CAC CAT GAA TAT TGT ACG GT 2R ATG TGT GAT AGT TGA GGG TTG | 58 | 125 |
| 3F CCC CAT GCT TAC AAG CAA GT 3R TGG CTT TAT TGT ACT ATG TAC | 55 | 132 |
| 4F CAC TAG GAT ACC AAC AAA CCT A 4R CAA GGG ACC CCT ATC TGA GG | 58 | 130 |
| 5F CGT ACA TAG CAC ATT ACA GT 5R TGA TTT CAC GGA GGA TGG TG | 57 | 92 |

REACTIVOS DE LA PCR

GeneAmp^{li} 10x PCR Gold Buffer & MgCl₂

(Applied Biosystems Cat N°4311814)
100mM Tris-HCl pH 8,0; 500mM KCl; 25mM MgCl₂
Guardar a -20 ° C

20 mg/ml BSA

(Roche Cat. N° 711 454)
Guardar a -20 ° C

dATP, dGTP, dTTP, dCTP

(Bioline Cat N° BIO-39025)
Cada dNTP se presenta en concentración 100mM a pH 7,5
Preparar alícuotas de 100µl de 2,5 mM de cada dNTP

Ampli Taq Gold (5U/µl)

(Applied Biosystems Cat N°4311814)
Guardar a -20° C

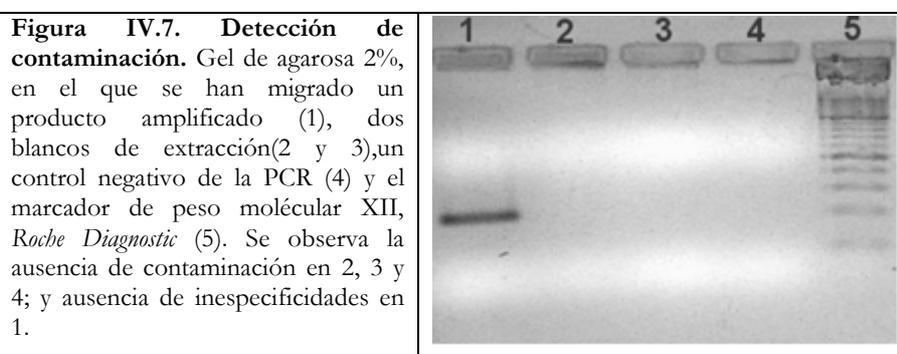
TEMPERATURAS Y CICLOS DE LA PCR

| 1 ciclo de desnaturalización | 40 ciclos | 1 ciclo de extensión |
|------------------------------|--|----------------------|
| 95 ° C-10 min | 95 °C-15s T _m -30s (Tabla IV.1) 72 °C-30s | 72 °C- 10 min |

Los amplificados se comprueban mediante migración electroforética a 90V durante 45 min en un minigel horizontal de agarosa al 2% y 0,01% de bromuro de etidio (BrEt) en buffer TBE 1X.

El gel de agarosa, teñido con BrEt, se ilumina con luz ultravioleta de 320 nm de longitud de onda. El rango de tamaños de los productos de PCR, se estiman por comparación con un marcador de peso molecular (Marcador XII, *Roche Diagnostiv*).

Si al comprobar el gel se ha detectado que algún control negativo de la PCR esta contaminado, se desechan todos los productos amplificados y se repite la PCR cambiando todos los reactivos utilizados. Si la contaminación apareciera únicamente en los blancos de la extracción, habría que desear todas las muestras relacionadas con esos blancos y volver a realizar una nueva extracción de esas muestras (Figura IV.7).



Asimismo, se comprueba que los productos amplificados sean del tamaño adecuado y no presentan inespecificidades. A continuación, se purifican los productos amplificados, eliminándose el exceso de reactivos de la PCR.La purificación se realiza mediante la acción enzimática de la ExoSap-IT siguiendo las instrucciones del fabricante (*USB corporation*).

La ExoSap-IT es la combinación de dos enzimas, una exonucleasa I, cuya función es degradar las hebras de ADN mononucleares pertenecientes tanto a los cebadores como a cualquier otro residuo sintetizado durante la amplificación y una fosfatasa alcalina que hidroliza los restos de dNTPs de la mezcla de PCR para que éstos no interfieran en la reacción de secuenciación. Los productos de amplificación purificados se secuencian de forma automática mediante el kit *dRhodamine Terminator Cycle Ready Reaction (Applied Biosystems)*. La secuenciación automática se llevó a cabo en un secuenciador ABI PRISM 310.

Una baja eficiencia de la reacción de secuenciación o una incorrecta limpieza del producto de secuenciación provocan una acumulación de terminadores marcados que no han sido incorporados al producto de extensión. Estos terminadores migran con la muestra en el secuenciador, emitiendo picos de luz que pueden impedir la lectura de algunas porciones del cromatograma. Su eliminación se lleva a cabo mediante las columnas *AutoSeq™ G-50* diseñadas específicamente para eliminar los terminadores fluorescentes de la reacción de secuenciación, siguiendo las instrucciones del fabricante (*GE Healthcare*) (Figura IV.8).

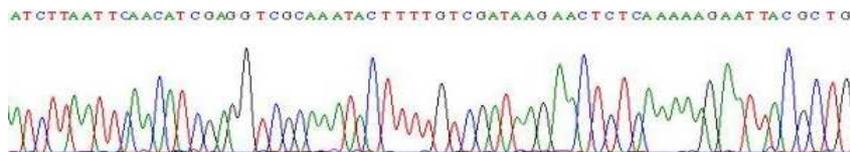
Figura IV.8. Imagen de las columnas *AutoSeq™ G-50* (*GE Healthcare*)



Las muestras purificadas se desnaturalizan añadiendo HI-DI Formamida (Applied Biosystem) y se migran en un secuenciador automático. Mediante el programa informático BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) se editan las secuencias comparándolas con la secuencia de referencia publicada por ANDERSON *et al.*, (1981) y que fue revisada por ANDREWS *et al.*, (1999), denominándose rCRS (*Revised Cambridge Reference Sequence*) (Figura IV.9)

| Reactivos del kit dRhodamine Terminator Cycle Ready Reaction | |
|---|--------------|
| (Cat. Nº. N403042) | |
| - Ampli <i>Taq</i> DNA Polimerasa FS Pirofosfatasa termoestable | |
| -Terminadores A-Dye Terminator, T-Dye Terminator, C-Dye Terminator y G-Dye Terminator | |
| -Deoxinucleotidos trifosfato: dNTPs dATP, dTTP/dUTP*, dCTP, dTTP | |
| -Tampón 5x Tris-HCl pH 9.0 | |
| -MgCl ₂ | |
| <i>Guardar a -20 ° C</i> | |
| TEMPERATURAS Y CICLOS DE LA PCR | |
| 1 ciclo de desnaturalización | 25 ciclos |
| | 96 ° C-10s |
| 94 °C-3 min | 50 °C-5s |
| | 60 ° C-1 min |

Figura IV.9. Cromatograma de un fragmento de la secuencia del HVS-I analizada en el programa Bioedit



IV.1.5.2. Secuenciación del HVS-II de la región control del ADNmt

En aquellas muestras que no mostraban posiciones polimórficas en el HVS-I, se ha llevado a cabo la secuenciación del HVS-II. Para ello, se han diseñado seis parejas de cebadores que permiten amplificar seis fragmentos solapantes del segmento HVS-II comprendido ente las

posiciones nucleotídicas 16.504-429. Asimismo, el fragmento comprendido entre los cebadores 8F y 8R se ha amplificado en todas las muestras para poder determinar cual es el nucleótido en la posición 73 (Tabla IV.2). Para obtener la secuencia de esta región se han seguido los mismos pasos que en el caso del HVS-I (Apartado IV.1.5.1).

Tabla IV.2. Secuencia de los cebadores utilizados para la amplificación del **HVS-II**, junto con la T^a de anillamiento correspondiente a cada par de cebadores y el tamaño del fragmento obtenido en pb.

| Secuencia de los cebadores (5'→3') | T ^a (°C) | Tamaño |
|--|---------------------|--------|
| 7F TTC CTA CTT CAG GGT CAT AAA GCC 7R: ACC AAA TGC ATG GAG AGC TC | 61 | 115 |
| 8F GGT CTA TCA CCC TAT TAA CC 8R GAT ACT GCG ACA TAG GGT GC | 60 | 121 |
| 9F TGC ACG CGA TAG CAT TGC GAG 9R: ATT ATG TCC TAC AAG CAT TAA TT | 58 | 136 |
| 10F CGC ACC TAC GTT CAA TAT T AC 10R ATG ATG TCT GTG TGG AAA G | 57 | 121 |
| 11F TTG AAT GTC TGC ACA GCC 11R TCT GGT TAG GCT GGT GTT AG | 57 | 148 |
| 12F: TGG CCA CAG CAC TTA AAC AC 12R: CTG TTA AAA GTG CAT ACC GCC | 55 | 109 |

IV.1.5.3. Clonación de muestras problemáticas

La clonación de los productos amplificados y su posterior secuenciación, nos permite diferenciar las mutaciones endógenas de la muestra, que deben aparecer en todos los clones, de aquellos cambios debidos a la incorporación errónea de un nucleótido en una posición dañada del ADN_a (KRING *et al.*, 1997).

La clonación se ha llevado a cabo mediante el *TOPO TA Cloning[®] Kit* (*Invitrogen*). Este kit presenta una ventaja a la hora de llevar a cabo la

clonación de productos de PCR, ya que el plásmido proporcionado por el kit, el *pCR2.1-TOPO* (Figura IV.10), presenta unos extremos 3' romos que terminan en T y aprovechando la capacidad de la mayoría de las polimerasas de incorporar adeninas en el extremo 3' de los amplicones, aumenta la eficiencia de ligación. Además este kit presenta una elevada eficiencia de clonación de productos de PCR de una longitud menor a 200 pb.

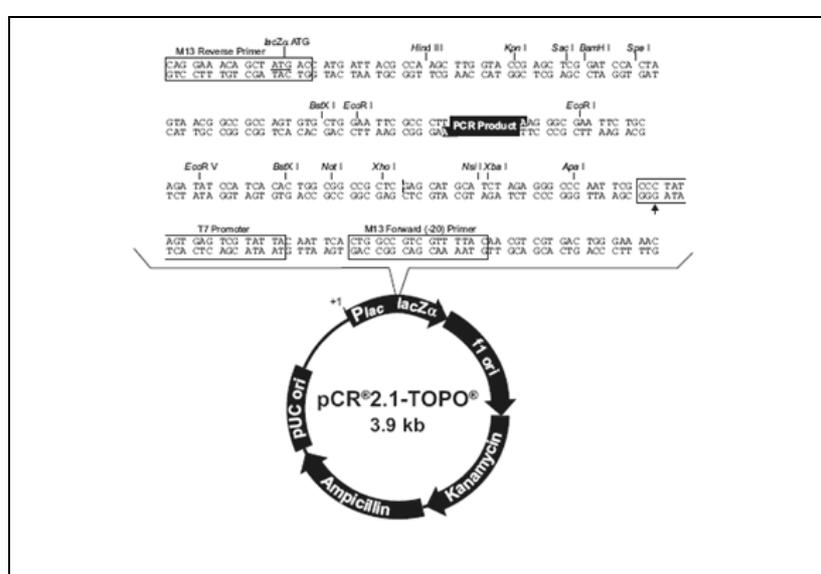
El plásmido *pCR2.1-TOPO* tiene una zona “*polylinker*” (*multiple cloning region*) que contiene una secuencia diana que es reconocida por diferentes enzimas de restricción, lo que permite cortarla en puntos determinados e insertar el fragmento de ADN exógeno que se desea estudiar. Posteriormente se puede cortar con otras enzimas de restricción que nos permiten liberar el inserto mediante una digestión simple o doble.

El vector (plásmido+inserto) se introduce en la célula huésped mediante un proceso denominado *transformación*; la membrana de la célula se permeabiliza de modo que es posible la introducción del vector. Para poder discernir si la célula ha sido transformada o no, se requiere que el plásmido tenga algún marcador selectivo. Este marcador suele ser un gen que codifica para la resistencia a un determinado antibiótico, la ampicilina en el caso de *pCR2.1-TOPO*.

Este antibiótico inhibe una serie de enzimas implicadas en la síntesis de la pared bacteriana, lo cual conduce a la lisis de la célula (SAMBROOK *et al.*, 1989). La incorporación del plásmido confiere a las células huésped la capacidad de crecer en un medio que contiene este antibiótico,

posibilitando su selección. Además, la región polylinker del plásmido está dentro del gen *lacZ* que codifica un fragmento de la enzima β -galactosidasa. La célula huésped codifica la fracción complementaria de esta enzima, necesaria para que sea activa (ULLMANN *et al.*, 1967).

Figura IV.10. Mapa circular del plásmido pCR2.1-TOPO (*Invitrogen*) (User manual versión U, TOPO-TA cloning (*Invitrogen*)).



La incorporación del inserto en el plásmido rompe la pauta de lectura del gen *lacZ* de manera que la bacteria que lo presente no producirá β -galactosidasa activa (bacteria lac⁻). En presencia de un activador del gen *lacZ*, el IPTG (isopropiltio- β -Dgalactosidasa), y de un análogo cromogénico de la *galactosa*, el X-Gal, sólo aquellas bacterias con actividad β -galactosidasa (lac⁺) serán capaces de hidrolizar el X-Gal generando una colonia azulada apreciable a simple vista.

Sin embargo, aquellas bacterias que hayan incorporado el plásmido, carentes por tanto de β -galactosidasa activa, no serán capaces de hidrolizar el X-Gal y se multiplicarán dando lugar a colonias blancas.

Metodología

1. Ligación

La ligación se realiza incubando a temperatura ambiente durante 30 min 4 μ l de producto amplificado al que se le han añadido 1 μ l de solución salina y 1 μ l del vector TOPO. Transcurrido ese tiempo, el producto de ligación se transfiere a hielo.

2. Transformación de las células

La transformación de las células ya competentes, se realiza incubando 2 μ l de la mezcla de ligación junto con las células competentes, en hielo durante 15 min. La transformación finaliza con una incubación a 42 °C durante 30 seg.

3. Cultivo de las células transformadas

Tras la transformación, se añaden 250 μ l de medio SOC y se incuban a 37 °C con agitación. Posteriormente se coge un volumen de 50 μ l de la mezcla realizada y se deposita en un medio sólido de cultivo (Tabla IV.3) que contiene, agar, *amplicidina*, X- Gal e IPTG, dejándolo toda la noche a 37 °C.

4. Selección de células transformadas

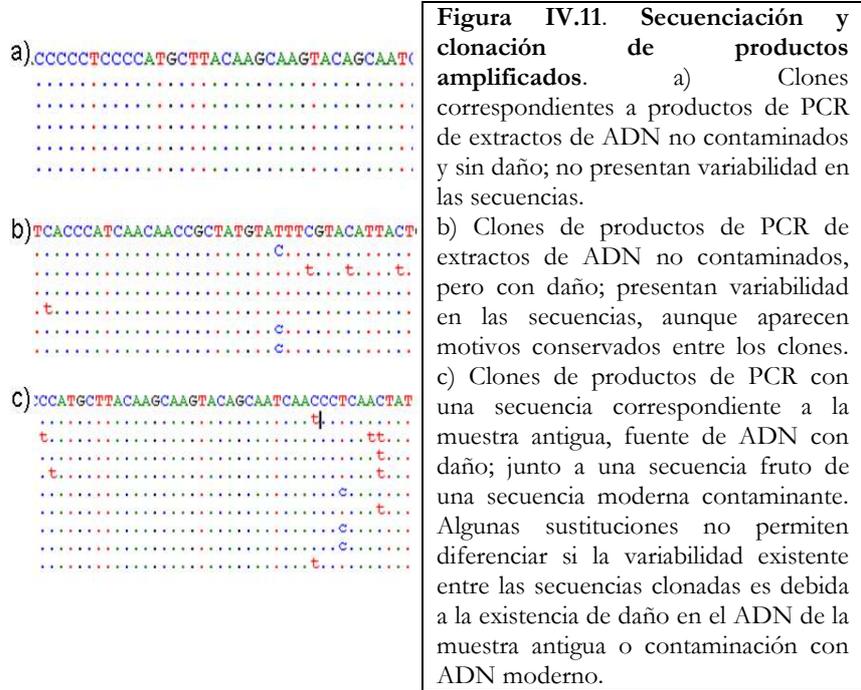
Tras comprobar el crecimiento de las células en la placa, se seleccionan las células transformadas, las que presentan una coloración blanca, y se realiza una PCR directa. La secuenciación de los clones se realiza de un modo similar a los productos de amplificado descrito en el apartado IV.1.5.1.

Tabla IV.3. Composición del medio de cultivo sólido LB-agar

| MEDIO DE CULTIVO SÓLIDO LB-AGAR |
|--|
| -20gr/l de Medio LB (<i>Pronadisa</i> , Cat. No. 1231.000) |
| -15gr/l de Agar (<i>Pronadisa</i> , Cat. No. 1802.000) |
| -50mg/ml de <i>Amplicidina</i> (<i>Apollo Scientific</i> , Cat. N° BIA0104) |
| -40mg/ml X-Gal (<i>Sigma</i> , Cat. N° B9146) |
| -100mM IPTG (<i>Apollo Scientific</i> , Cat. No. BI1340) |

Las secuencias de los clones se comparan con las obtenidas directamente a partir del producto de PCR. Si una mutación se repite en todos los clones, se considera una mutación endógena de la muestra, mientras que las mutaciones que solo aparecen en un clon se considera que son resultado de la mala preservación de la secuencia endógena de la muestra o errores de la *Taq* polimerasa, y son descartadas (Figura IV.11).

De este modo, a partir de los clones conseguimos una secuencia consenso que debería coincidir con las secuencias obtenidas directamente a partir de los productos amplificados, los duplicados y los replicados.



IV.1.5.4. Análisis de la variabilidad del genoma mitocondrial mediante RFLPs

La determinación de los lugares diagnósticos de la región codificante del ADNmt, permite clasificar la variabilidad del ADNmt en los 10 principales haplogrupos caucasoides (Tabla IV.4) (MACAULAY *et al.*, 1999; TORRONI *et al.*, 1996).

Para ello, se utilizan once parejas de cebadores que amplifican once fragmentos, de menos de 130 pb de longitud, que incluyen las posiciones polimórficas que nos permiten definir los diez haplogrupos mitocondriales en caucasoides (Tabla IV.5).

Cada fragmento ha sido amplificado en PCRs independientes; para ello se ha preparado la siguiente mezcla de reacción en un volumen final de 35 µl: 10mM Tris-HCl pH 8.3; 50mM KCl; 25mM MgCl₂; 2,5µM de cada

dNTP; 1mg/ml BSA; 10 μ M de cada cebador; 1,5U de *Taq polimerasa* (*Bioline*) y 10 μ l de ADN diluido (1:10).

En todas las PCRs, además de los blancos de extracción se incluyen controles negativos de la PCR, consistentes en una muestra que se somete a todo el proceso de amplificación pero a la que no se ha añadido ADN. Estos controles sirven para poner en manifiesto las posibles contaminaciones que pudieran ocurrir durante la fase de amplificación en el laboratorio.

Los amplificados se comprueban mediante migración electroforética a 90V durante 45 min en un minigel horizontal de agarosa al 2% en buffer TBE 1X con bromuro de etidio (BrEt) al 0,01%. Se toma un pequeño volumen (5 μ l) de los productos amplificados al que se le añade azul de bromofenol. El gel de agarosa, teñido con BrEt, se ilumina con luz ultravioleta de 320nm de longitud de onda. El rango de tamaños de los productos de PCR, se estima por comparación con el marcador de peso molecular XII (*Roche Diagnostic*).

Tras verificar la ausencia de contaminación, los productos amplificados se digieren con su correspondiente enzima de restricción siguiendo las instrucciones del fabricante y el patrón de digestión se comprueba mediante electroforesis en geles de acrilamida al 12% y tinción de plata o mediante un analizador de fragmentos (*Bioanalyzer, Agilent technologies*) (Figura IV.12).

Tabla IV.4. Patrón de ausencia/presencia de restricción que presentan los lugares diagnósticos de la región codificante analizados en este trabajo para definir los 10 haplogrupos descritos en caucasoides.

| | H | V | HV | T | J | U | K | I | X | W |
|-----------------------|---|---|----|---|---|---|---|---|---|---|
| <i>MseI</i> 14766 | - | - | - | | | | | | | |
| <i>DdeI</i> 10394 | - | - | - | - | + | - | | | | |
| <i>AluI</i> 7052 | - | + | + | | | | | | | |
| <i>NlaIII</i> 4577 | | - | + | | | | | | | |
| <i>NlaIII</i> 4216 | | | | + | + | | | | | |
| <i>HaeII</i> 9052 | | | | | | + | - | | | |
| <i>HinfI</i> 12308 | | | | | | + | + | | | |
| <i>DdeI</i> 1715 | | | | | | | | - | - | |
| <i>AluI</i> 10032 | | | | | | | | + | | |
| <i>AccI</i> 14465 | | | | | | | | | + | |
| <i>HaeIII</i> 8994 | | | | | | | | | | - |

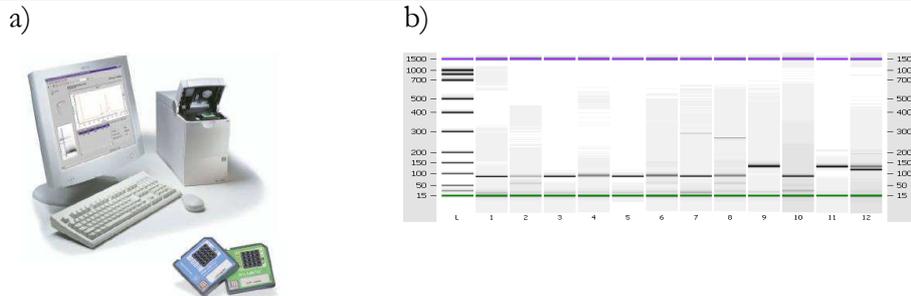
Se indica, la enzima de restricción mediante la cual se analiza la posición nucleotídica diagnóstica.

Tabla IV.5. Secuencia de los 11 pares de cebadores diseñados para la amplificación de los sitios de restricción diagnósticos de la región codificante del ADNmt que permiten definir los haplogrupos en caucasoides. Se indica la posición nucleotídica y la temperatura de anillamiento de los cebadores, junto con el tamaño del amplificado y los tamaños resultantes de los fragmentos digeridos.

| Sistema | Secuencia de los cebadores 5'-3' | Posición nucleotídica | Tm °C | Tamaño del ampl.(pb) | Tamaño dig. (pb) |
|----------------|---|-----------------------------|-------|----------------------|------------------|
| MseI (14766) | F-TCAACTACAAGAACACCAATGACC R-AGTGAGCCGAAAGTTTCATCATG | 14729-147352 14832-14853 | 52 | 125 | 66/55 |
| DdeI (10394) | F-CITTAATTAATCATCATCC TAGCC R-TTGTTTAAACTATATACCAATTCGG | 10334-103353 10395-10423 | 54 | 90 | 67/23 |
| AluI (7025) | F-ACCGTAGGTGGCCTGACTGG R-GGCAAATACAGCTCCTATTGATAGGAC | 6948-6968 7041-7070 | 62 | 120 | 78/42 |
| NlaIII (4577) | F-CACTCATCACAGCGCTAAGC R-TGGCAGCTTCTGTGGAAC | 4519-4538 4521-4540 | 55 | 120 | 62/58 |
| NlaIII (4216) | F-AACTTCCTACCACTCACC R-TACTCTATCAAAGTAACTCT | 4140-4167 4281-4300 | 47 | 121 | 61/40 |
| Hae II (9052) | F-CTACTCATTCAACCAATAGC R-GGAAGGTTAATGGTTGATATTGC | 8971-8990 9064-9086 | 51 | 116 | 86/30 |
| Hae III (8994) | F-CTACTCATTCAACCAATAGC R-GGAAGGTTAATGGTTGATATTGC | 8971-8990 9064-9086 | 55 | 116 | 91/35 |
| HinI (12308) | F-CACAAGAAGTCTAACTCATGC R-ATTACTTTTATTTGGAGTTGCACCAGGATT | 12216-12237 12338-12309 | 57 | 123 | 93/30 |
| DdeI (1715) | F-TAACTTGACCGCTCTGAGCT R-CTTGCGGTACTATATCTATTGC | 1654-1673 1762-1781 | 46 | 102 | 76/26 |
| AluI (10032) | F-TCITTTAG TATAAATAGT ACCG R-ITGCTAGGATGAGGATGGAT | 15548-15566 15634-15653 | 60 | 118 | 77/41 |
| AccI (14465) | F-CACCAAG ACCTCAACCC CTG R-ATTTAGGGGAAATGATGGTTGTC | 14404-14423 14476-14498 | 51 | 95 | 63/32 |

| REACTIVOS DE LA PCR | | |
|---|---|----------------------|
| Buffer PCR 10x (Bioline Cat. No. BIO21060) 10x NH ₄ Reaction Buffer Guardar a -20 ° C | | |
| 25mM MgCl₂ (Bioline Cat. No. BIO21060) Guardar a -20 ° C | | |
| 20mg/ml BSA (Roche Cat. N° 711 454) Guardar a -20 ° C | | |
| dATP, dGTP, dTTP, dCTP (Bioline Cat N° BIO-39025) Cada dNTP se presenta a 100mM a pH 7,5 Preparar alícuotas de 100µl de 2,5 mM de cada dNTP | | |
| Taq polimerasa (5U/µl) (Bioline Cat. No. BIO21060) Guardar a -20° C | | |
| Temperaturas y ciclos de la PCR | | |
| 1 ciclo de desnaturalización | 40 ciclos | 1 ciclo de extensión |
| 94 °C-50 min | 94 ° C-15 s Tm-10 s (Tabla IV.5) 72 °C-10 | 72 °C- 10 min |

Figura IV.12. a) Imagen de un *Bioanalyzer* (Agilent technologies) b) Imagen de resultados del análisis en un *Bioanalyzer* de diferentes digestiones enzimáticas. L: marcador de peso molecular; 1, 3, 5, 7, 9 y 11 muestras de amplificadas sin digerir; 2, 4, 6, 8, muestras tratadas con *DdeI-103924*; 10 y 12 muestras tratadas con *Hae II-9052*



IV.1.6. Autenticación de los resultados de ADN antiguo

Como ya se ha mencionado en el apartado I.1 de la introducción, el ADN antiguo presenta un conjunto de características físico-químicas debidas al

daño *post-mortem* que dificultan enormemente su análisis. Las complejas interacciones que se producen entre los tres factores que influyen en la preservación del ADN (conservación de una menor proporción de ADN, degradación y riesgo de contaminación) tienen como resultado la obtención de múltiples secuencias de ADN, compuestas de cantidades variables de la secuencia endógena de la muestra, secuencias endógenas dañadas y secuencias contaminantes, así como combinaciones artificiales de las mismas.

Todo ello dificulta la correcta determinación de las secuencias de ADN, lo que nos obliga a seguir estrictas normas, con el objeto de autentificar los resultados obtenidos. A pesar de este conjunto de normas señaladas en diversos trabajos (HOFREITER *et al.*, 2001; PÄÄBO, 1998; PÄÄBO y WILSON, 1991; PÄÄBO *et al.*, 2004; COOPER, 1994; COOPER y POINAR, 2000; POINAR *et al.*, 1996), es importante señalar las medidas de precaución que se han llevado a cabo para realizar este trabajo, debido a que la contaminación y la autentificación de los resultados es la principal limitación con la que nos encontramos en los trabajos de ADN.

IV.1.6.1. Precauciones en el análisis de ADN antiguo

-Los restos, desde el momento de su descubrimiento deben ser manipulados lo menos posible, siempre con guantes y sin que se sometan a un lavado con H₂O, ya que el H₂O acelera la degradación del ADN y puede, asimismo, hacer que el ADN contaminante superficial se introduzca en el interior.

-La extracción del ADN y la preparación de la amplificación, se han realizado en una cámara estéril con presión positiva, donde nunca se ha trabajado previamente con ADN humano de muestras actuales. De este modo se asegura un aislamiento físico entre este laboratorio y aquel donde se llevan a cabo los procesos post-PCR.

-Se ha mantenido la esterilidad del material de investigación y superficies de trabajo dedicados exclusivamente al trabajo con ADN, mediante el tratamiento de forma rutinaria con lejía e irradiación ultravioleta, gracias a unas lámparas UV colocadas en el techo del laboratorio y que están encendidas siempre que no se está trabajando.

- Siempre se ha usado una vestimenta adecuada a la hora de trabajar con ADN: gorro, guantes, bata y mascarilla desechables.

IV.1.6.2. Criterios de autenticación

A continuación se señalan los criterios de autenticación exigidos por la comunidad científica (HOFREITER *et al.*, 2001; PÄÄBO, 1989; PÄÄBO y WILSON, 1991; PÄÄBO *et al.*, 2004; COOPER, 1994; COOPER y POINAR, 2000; POINAR *et al.*, 1996), que se han tenido en cuenta a la hora de realizar este estudio.

Cuantificación del número de moléculas de ADN amplificables. La cuantificación del número de moléculas molde del extracto, nos permite valorar el estado de preservación del material y así planificar la metodología más adecuada a la hora de autenticar los resultados obtenidos.

Si un extracto contiene más de 100-1.000 moléculas molde, los resultados son fácilmente reproducibles y por tanto no es necesario llevar a cabo todos los criterios de autenticación para dar mayor fiabilidad a los resultados obtenidos. En caso contrario, se deben realizar secuencias directas a partir de múltiples amplificaciones y clonar los productos amplificados y secuenciar varios clones de cada producto de amplificado. De este modo se detectarían las mutaciones endógenas de la muestra, de los errores debidos a la *Taq* polimerasa, de la degradación de la muestra de ADN y de la contaminación con ADN moderno.

Amplificación repetida del mismo o varios extractos. Cuando se trabaja con ADN_a se debe recuperar ADN a partir de varias muestras del mismo individuo y se deben amplificar al menos dos extractos de cada muestra del mismo individuo. De modo que, finalmente, al comparar todas las secuencias obtenidas a partir de diferentes muestras del mismo individuo: 1) podemos ser capaces de detectar contaminaciones esporádicas y 2) podemos detectar los cambios debidos a las lesiones en los nucleótidos del ADN_a. La secuencia consenso que obtengamos de todos estos resultados nos va a indicar si los resultados obtenidos son fiables

Replicación de los resultados en un laboratorio independiente.

Siempre que sea posible se deben analizar tres muestras de un mismo individuo, dos analizadas en momentos diferentes en el mismo laboratorio (duplicación) (como se indica en el párrafo anterior) y una tercera muestra se analiza en un laboratorio independiente (replicación).

En este estudio la replicación de las muestras ha sido llevada a cabo por el equipo dirigido por *Dr. Vicente Cabrera* de la Facultad de Biología, área de Genética de la Universidad de La Laguna. A este equipo se le proporcionan las muestras que se van a replicar y deben llevar a cabo el mismo análisis que hemos realizado nosotros. Al finalizar, la comparación de los resultados obtenidos debe coincidir con los obtenidos por nuestro grupo.

Controles de la contaminación. Siempre que se ha realizado una extracción de ADN se han incluido al menos dos controles de la extracción en el laboratorio. Se trata de muestras que se someten a todo el proceso de la extracción pero a las que no se les ha añadido tejido. En el proceso de amplificación también se han incluido varios controles negativos de la contaminación, tratándose de muestras que se someten a la amplificación, pero a las que no se les añade ADN. El uso de estos controles nos permite identificar la contaminación tanto en la fase de extracción como durante la amplificación.

Clonación y secuenciación de los productos de PCR. Como se indica en el apartado IV.1.5.3. la clonación nos permite distinguir entre las mutaciones endógenas (reales) de la muestra, que deben aparecer en todos los clones, de aquellos cambios debidos a errores de la *Taq* polimerasa durante la amplificación o por el daño en la secuencia de ADN.

Correlación inversa entre la longitud del producto amplificado y la eficiencia de la amplificación. A medida que aumenta el tamaño del fragmento amplificado disminuye la eficiencia de su amplificación. La eficiencia de amplificación debería estar inversamente correlacionada con la longitud del producto amplificado.

Exclusión de inserciones del ADNmt en el genoma nuclear. Los fragmentos de ADNmt existentes en el genoma nuclear representan un potencial para los falsos positivos. La identificación de estas inserciones es posible gracias al diseño de cebadores específicos de la región analizada.

Correlación entre los motivos de la región control y los motivos de la región codificante que definen los haplogrupos (MONTIEL *et al.*, 2001). Los resultados de secuenciación de la región control y la caracterización de los polimorfismos de restricción en extractos diferentes de cada individuo, nos permite detectar la contaminación mediante resultados no coincidentes.

Análisis de cada espécimen por un único investigador. El análisis de cada muestra por un único investigador permite minimizar e identificar mas fácilmente la contaminación introducida durante el procesado experimental. La autora de la presente tesis doctoral ha realizado todo el proceso experimental, desde la limpieza de los dientes y huesos, hasta su amplificación por PCR.

Sin embargo, a pesar de la estricta adhesión a los criterios de autenticación establecidos (HOFREITER *et al.*, 2001; PÄÄBO, 1989; PÄÄBO y WILSON, 1991; PÄÄBO *et al.*, 2004; POINAR *et al.*, 1996; MONTIEL *et al.*, 2001; COOPER, 1994; COOPER y PONIAR, 2000), aún pueden albergarse dudas acerca de la autenticidad de los resultados obtenidos. En los últimos años se han ido incorporando nuevas cuestiones, como:

Tipaje de todo el personal que ha manipulado las muestra. Cuando las secuencias resultantes son semejantes a las de los investigadores o arqueólogos que han manipulado las muestras, cabría esperar que se hubieran contaminado o bien los restos o los extractos de ADN (GILBERT *et al.*, 2005). Para ello, se ha realizado el mismo análisis genético a las muestras tomadas a los arqueólogos, antropólogos e investigadores que hayan manipulado los restos esqueléticos.

Espectro mutacional anormal. La acumulación de un gran número de mutaciones en una misma secuencia, podría ser el resultado de cambios *post-mortem* del ADN (BANDELT *et al.*, 2005). Para ello se ha realizado el análisis de varias muestras del mismo individuo, ya que no todas ellas tienen porque tener el mismo grado de degradación.

Paradoja filogenética. Si el supuesto haplotipo mitocondrial antiguo obtenido resulta de una nueva combinación “artificial” de fragmentos de linajes de ADNmt de ramas filogenéticas diferentes, estos resultados deben ser rechazados (BANDELT *et al.*, 2005).

IV.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

IV.3.1. Cálculo de frecuencias alélicas

Las frecuencias alélicas constituyen un parámetro básico en el estudio evolutivo de las poblaciones, ya que los cambios evolutivos de las poblaciones generalmente se describen como cambios en las frecuencias de los alelos de sus genes.

En este estudio, tanto los haplogrupos como los haplotipos mitocondriales se han considerado como alelos de un único *locus*, dada la naturaleza no recombinante del ADNmt. A partir de los valores absolutos, se han calculado sus frecuencias alélicas mediante.

$$p = \frac{n_i}{N}$$

iendo n_i el número de individuos pertenecientes a un haplogrupo o haplotipo determinado y N el número total de individuos.

El error estándar (*s.e.*) o la desviación típica se estiman a partir de las frecuencias génicas determinadas mediante la fórmula de LI (1968), donde p es el valor de la frecuencia en cuestión.

$$Se = \sqrt{\frac{p(1-p)}{N}}$$

IV.3.2. Diversidad haplotípica

La diversidad génica (NEI, 1987) se define como la probabilidad de que dos alelos de una muestra escogidos al azar sean diferentes. Cuando se trabaja con secuencias, cada variante (haplotipo) equivale a un alelo, por

lo que puede utilizarse este índice para evaluar la diversidad haplotípica del conjunto. Este estimador y su varianza asociada se calculan de la siguiente forma:

$$H = \frac{n}{(n-1)} \left(1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \right)$$

$$V(H) = \frac{2}{n(n-1)} \left\{ 2(n-2) \left[\sum_{i=1}^k p_i^3 - \left(\sum_{i=1}^k p_i^2 \right)^2 \right] + \sum_{i=1}^k p_i^2 - \left(\sum_{i=1}^k p_i^2 \right)^2 \right\}$$

donde n es el número de secuencias, k es el número de alelos (haplotipos) y p_i es la frecuencia en la muestra del alelo (o haplotipo) “i”.

IV.3.3. Haplotipos diferentes

Cada variante mitocondrial definida respecto a la secuencia consenso (ANDERSON *et al.*, 1981) constituye un haplotipo mitocondrial (k). El porcentaje de haplotipos diferentes (%), k se estimó en relación al número de individuos de cada yacimiento y población.

IV.3.4. Análisis poblacional

Es necesario un marco de referencia para poder interpretar las secuencias de ADN mitocondrial obtenidas, que en este caso viene proporcionado por la diversidad mitocondrial de las poblaciones actuales y de las poblaciones antiguas. Así, se ha procedido a la construcción de una base de datos de secuencias de ADN mitocondrial de diversas poblaciones europeas actuales y de poblaciones prehistóricas, provenientes en ambos casos tanto de la bibliografía como de las muestras analizadas en la presente tesis doctoral.

IV.3.4.1 Distancias genéticas

Se ha calculado la distancia genética de Reynolds entre pares de poblaciones (REYNOLDS *et al.*, 1983). Esta distancia asume que no existen mutaciones y que la deriva genética es el único factor responsable del cambio en las frecuencias de los haplotipos. A diferencia de otras distancias como la distancia genética de Nei (NEI y LI, 1979), esta medida no asume un tamaño efectivo de población constante e igual para todas las poblaciones. La distancia genética de Reynolds (REYNOLDS *et al.*, 1983) se calcula:

$$D = \frac{\sum_m \sum_i (p_{1mi} - p_{2mi})^2}{2 \sum_m \left(1 - \sum_i p_{1mi} - p_{2mi} \right)}$$

donde m es el número de loci, “ i ” el número total de alelos del conjunto de loci y p_{mi} las frecuencias del alelo i del locus m en las poblaciones 1 y 2 respectivamente. En el caso de secuencias de ADNmt, el número de loci es igual a 1 y el número de alelos equivale al número de haplotipos de la muestra.

El cálculo de la matriz de distancias de Reynolds entre los pares de poblaciones se realizó con el programa GENDIST del paquete PHYLIP 3.68 (FELSENSTEIN, 1993). La matriz de frecuencias de haplotipos fue calculada con el programa ARLEQUIN a partir de las secuencias en bruto, con la opción *Haplotype frequencies* contenida en el apartado *Diversity indices*.

IV.3.4.2. Haplotipos compartidos entre poblaciones antiguas y actuales

Otra forma de comparar la información obtenida de los haplotipos antiguos y el conjunto actual de poblaciones es el estudio de la frecuencia y distribución de los haplotipos de la muestra antigua en las diferentes poblaciones actuales de la base de datos.

IV.3.4.3. Test exacto de diferenciación poblacional

Para determinar si existe heterogeneidad genética significativa entre las poblaciones analizadas en el presente trabajo, estas se han comparado dos a dos mediante un test análogo al de Fisher (SCHNEIDER y EXCOFFIER, 2000).

La hipótesis nula postula que la distribución de las frecuencias alélicas es independiente a través de las poblaciones, lo que corresponde a la ausencia de diferenciación poblacional, de forma que mediante un método no-paramétrico se calcula una estimación insesgada de valor " p " de aceptación o rechazo de la hipótesis nula (RAYMOND y ROUSSET 1995).

En este test se construye una la tabla de contingencia 2×2 , cuyo tamaño depende del número de haplotipos y de poblaciones. Dada la hipótesis nula, obtendremos una probabilidad p de la tabla observada. Se explora el espacio de todas las tablas de contingencia posibles y se determina para cada una de las tablas, si su probabilidad de ocurrencia es mayor o menor que p . Para que esta estimación sea insesgada se realizará un proceso de desmemorización para que la cadena de Markov comience a

partir de un lugar al azar de todo el espacio de matrices posibles (GUO y THOMPSON 1992).

$$\Pi = \frac{\prod_{i=1}^p (N_i!) \prod_{j=1}^k (N_j!)}{(N!) \prod_{i=1}^p \prod_{j=1}^k (N_{ij}!)}$$

Donde N_i se refiere al tamaño muestral total de poblaciones “ i ”, N_j es el número total de alelos “ j ”, N_{ij} es el número de alelos “ j ” en la población “ i ” y N es la suma de todos los valores N_{ij} .

Usando el método de la cadena de Markov obtendremos una estimación insesgada de la probabilidad exacta. El método de la cadena de Markov es un método para generar una distribución de probabilidad exacta bajo la hipótesis nula, que no esta sesgada por la presencia de alelos raros, ni por el pequeño tamaño muestral. Mediante este método obtendremos la probabilidad de diferenciación genética entre dos o más poblaciones para cada polimorfismo.

Todos los cálculos se han realizado mediante el programa ARLEQUIN. Además se ha aplicado el análisis de corrección de *Bonferroni* para múltiples test estadísticos.

IV.3.4.4. Cálculo de distancias genéticas Pairwise Fst

Los valores de *pairwise Fst* pueden ser utilizados como distancias genéticas entre la población, aplicando una pequeña transformación para linealizar la distancia entre poblaciones y el tiempo de divergencia de las

mismas (REYNOLDS *et al.* 1983; SLATKIN, 1995). La distancia F_{ST} de poblaciones haploides con un tamaño poblacional N que divergieron t generaciones atrás, se calcula como:

$$F_{ST} = 1 - \left(1 - \frac{1}{N}\right)^t \approx 1 - e^{-\frac{t}{N}} \qquad D = -\log(1 - F_{ST})$$

Esta distancia es aproximadamente proporcional a t/N para tiempos cortos de divergencia.

SLATKIN (1991, 1995) consideró un modelo simple en el que dos poblaciones demográficas haploides de tamaño N habían divergido hace τ generaciones de una población original. Estas dos poblaciones han permanecido aisladas desde entonces, sin sufrir migración y sin entrecruzarse.

En tales condiciones, F_{ST} se puede expresar en términos de tiempos de coalescencia; \bar{t}_1 , que es el tiempo medio de coalescencia entre dos genes procedentes de dos poblaciones diferentes y \bar{t}_0 , es el tiempo medio de coalescencia entre dos genes procedentes de la misma población. Utilizando el análisis de varianza aproximada, la F_{ST} se expresa como $F_{ST} = \frac{\bar{t}_1 - \bar{t}_0}{\bar{t}_1}$. Esta expresión se puede simplificar como $F_{ST} = \frac{\tau}{\tau + N}$ cuando \bar{t}_0 es igual a N generaciones ya que \bar{t}_1 es igual $\tau + N$ generaciones.

Entonces la distancia sería proporcional a $D = \frac{F_{ST}}{(1 - F_{ST})}$

Se puede calcular la matriz de los valores de las distancias F_{ST} gracias a los supuestos anteriores. Supongamos, dos poblaciones de tamaño N que muestran una tasa m de migración, siendo la tasa de mutación ν insignificante en comparación con la tasa de migración m . En este caso, tenemos la siguiente relación simple en el equilibrio entre la migración y la deriva,

$$F_{ST} = \frac{1}{2M + 1} \quad M \text{ se puede calcular como } M = \frac{1 - F_{ST}}{2F_{ST}}$$

Si se considera que el intercambio es entre las dos poblaciones y sin ningún intercambio de estas con otras, entonces uno debe dividir la cantidad M por un factor 2 para obtener un estimador de $M' = Nm$ para poblaciones haploides, o $M' = 2 Nm$ para diploides. Esto se debe a la expectativa de F_{ST} , dada por

$$F_{ST} = \frac{1}{\frac{4Nmd}{(d-1)} + 1} \quad \text{donde } d \text{ es el número de cambios por genes.}$$

Además del cálculo de distancias genéticas entre las poblaciones, también se puede calcular una estimación de Nei (D) y una red (DA) del número de diferencias nucleotídicas entre las poblaciones (Nei y Li, 1979). D y D_A netos son, respectivamente, calculados entre las poblaciones 1 y 2, como:

$$D = \hat{\pi}_{12} = \sum_{i=1}^K \sum_{j=1}^{K'} x_{1i} x_{2j} \partial_{ij}, \quad D_A = \hat{\pi}_{12} - \frac{\hat{\pi}_1 + \hat{\pi}_2}{2}$$

Donde K y K' es el número de haplotipos distintos en las poblaciones 1 y 2 y x_{ii} es la frecuencia del haplotipo i en la población 1 y d_{ij} es el número de diferencias entre el haplotipo i y j .

Todos los cálculos se han realizado mediante el programa ARLEQUIN. Además se ha aplicado el análisis de corrección de *Bonferroni* para múltiples test estadísticos

IV.3.4.5 *Análisis multivariantes*

En la presente tesis doctoral se realizan dos tipos de análisis multivariantes, el análisis de componentes principales (PCA) y el escalamiento multidimensional (MDS). El PCA es un método multivariable especialmente útil para describir, clasificar y definir la relación entre las variables iniciales (frecuencias), mediante un conjunto más reducido y fácilmente interpretable de factores, construido a partir de las variables iniciales (tablas de frecuencias).

Con este análisis se pueden proyectar muestras sobre una serie de ejes ortogonales. Cada una de ellas está formada por una combinación lineal de valores genotípicos a través de la frecuencia de los haplotipos o haplogrupos. Estos ejes se eligen de manera que la proyección de las muestras sobre el segundo eje maximiza la varianza de todos los posibles ejes. Del mismo modo, la proyección de las muestras sobre el segundo eje maximiza la varianza de todos los posibles ejes perpendiculares a la primera, y así sucesivamente para los componentes siguientes. Este análisis se ha realizado mediante el programa estadístico SPSS 17,0.

El MDS, es un análisis multivariante en el cual se representan las distancias genéticas entre las poblaciones (Pairwise F_{ST} o distancia de Reynolds) en dos dimensiones. Se parte de una matriz de distancias genéticas construidas a partir de las tablas de frecuencias y su representación se realiza en una aplicación estadística de SPSS (versión 17,0) (KRUSKAL, 1964).



V. **R**ESULTADOS **Y**
DISCUSIÓN

V.1.

EL YACIMIENTO NEOLÍTICO DE LOS
CASCAJOS (LOS ARCOS, NAVARRA)

V.1.1. INTRODUCCIÓN

A la hora de llevar a cabo estudios sobre los restos esqueléticos de los individuos que vivieron en el pasado, un aspecto muy importante que hay que tener en cuenta, es la información proveniente de las evidencias arqueológicas recuperadas, ya que a partir de ellas se plantean los diferentes análisis antropológicos, moleculares, faunísticos, carpológicos y arqueobotánicos, entre otros, que nos permitirán establecer los aspectos sociales, biológicos y/o económicos de estas sociedades, llegando a comprender cual era la forma de vida y el ritual de la muerte de los individuos que vivieron en el pasado.

El patrón de enterramiento de los inhumados en un yacimiento arqueológico, depende de numerosos factores, que se pueden relacionar con la concepción del mundo que tenían las sociedades que vivieron en el pasado. Mediante el análisis del ritual de enterramiento de estas sociedades podemos indagar en el tipo de sociedad, economía y/o cultura que existía en estas poblaciones.

Tradicionalmente, los estudios antropológicos de los individuos que vivieron en el pasado se han basado en el análisis morfológico de los restos óseos y dentarios recuperados. En la actualidad, gracias a los avances tecnológicos es posible llevar a cabo análisis del ADN recuperado de restos óseos y dentarios antiguos, permitiéndonos obtener una aproximación directa de la historia genética de las poblaciones del pasado (ALZUALDE *et al.*, 2005, 2006, 2007; CASAS *et al.*, 2006; FERNÁNDEZ *et al.*, 2008; FREGEL *et al.*, 2009a, 2009b; GUIMARAES *et al.*, 2009; IZAGIRRE *et al.*, 1999, 2005; VERNESI *et al.*,

2004; SAMPIETRO *et al.*, 2007; HAAK *et al.*, 2005; BRAMANTI *et al.*, 2009).

Asimismo, mediante el estudio de la variabilidad del genoma mitocondrial (genoma muy utilizado en el análisis de ADN), se pueden llevar a cabo estudios genealógicos. Así, cuando se analizan los resultados del ADNmt de muestras antiguas, la presencia de dos linajes mitocondriales diferentes en dos individuos, significaría que estos individuos no tienen una relación familiar vía materna, es decir, no se trataría de hermano/as o madre e hijos/as.

Sin embargo, la presencia del mismo linaje en más de un individuo, no significa necesariamente que entre ellos exista una relación familiar. Si tenemos en cuenta la frecuencia de estos linajes compartidos en la población general, podríamos discernir más fácilmente la existencia de una posible relación vía materna entre dichos individuos.

Si el linaje mitocondrial compartido, presenta una frecuencia baja o inexistente en la población general, tendríamos una mayor probabilidad de establecer relaciones familiares vía materna entre estos individuos. Si por el contrario, la frecuencia del linaje compartido fuera alta en la población general, resultaría más problemático establecer relaciones familiares maternas, ya que la probabilidad de que dos individuos no emparentados compartan el mismo linaje mitocondrial, es directamente proporcional a la frecuencia del linaje.

Por último, cabe mencionar que analizando el ADNmt, en ningún momento podríamos establecer relaciones familiares fuera de la línea materna; para ello, habría que estudiar otro tipo de marcadores nucleares, cuyo análisis puede ser complejo en muestras antiguas, como por ejemplo, el caso del cromosoma Y.

El yacimiento de Los Cascajos constituye una referencia fundamental sobre el mundo funerario de las primeras comunidades campesinas, que establecieron su hábitat al aire libre en Navarra (Figura III.1). Este yacimiento se encuentra ubicado al sur del término municipal de Los Arcos, en Navarra, en la comarca geográfica de Tierra Estella. El área excavada se extiende a una superficie de 4 hectáreas, habiéndose recuperado evidencias arqueológicas que corresponden a un poblado neolítico, lo que resulta novedoso en el contexto de los yacimientos coetáneos en esta región, ya que dichos yacimientos se presentan dispuestos en cuevas y abrigos, como es el caso de Peña Larga (Crípan, Álava) y Mendandía (Sáseta, Treviño), de los que carecemos de evidencias del poblado (GARCÍA-GAZÓLAZ y SESMA, 1999, 2001, 2007a).

En Los Cascajos, se han excavado hasta el momento más de 550 estructuras, que sus moradores realizaron en forma de hoyos, con diversas finalidades: cabañas, postes, silos, basureros, estructuras de combustión y enterramientos, entre otros. De las 550 estructuras recuperadas, 34 corresponden a enterramientos, en los que se han recuperado restos óseos correspondientes a 36 individuos, en su mayoría dispuestos en fosas individuales o simples.

Es de destacar, el hallazgo en el interior del poblado, de una zona de aproximadamente 550 m² restringida solo para albergar enterramientos, denominando a esta zona, **necrópolis**. Pero no todos los enterramientos recuperados se encuentran en la necrópolis, ya que también hay inhumaciones localizadas dispersas por el **poblado** (GARCÍA-GAZÓLAZ y SESMA, 1999, 2001, 2007a). Al existir dos ubicaciones para los enterramientos, en lo sucesivo, nos referiremos a ellas como “poblado” y “necrópolis” según estén situados dispersos por el poblado o en la necrópolis.

Del total de 36 individuos recuperados en este yacimiento, 25 se encuentran situados en la necrópolis y el resto, 11 individuos, dispersos por el poblado de forma no uniforme, con una distancia notable entre un enterramiento y el otro.

De las veinte dataciones realizadas hasta el momento en este yacimiento (GARCÍA GAZÓLAZ y SESMA, comunicación personal), cinco han sido realizadas a partir de restos óseos humanos. Los sujetos que ofrecen las dataciones más antiguas son CAS-497 (6.230±50 BP, Neolítico Antiguo) situado en el poblado y CAS-183 (6.185±45 BP, Neolítico Antiguo) situado en la necrópolis, lo cual nos indica que en las fechas más antiguas del yacimiento, se utiliza tanto la necrópolis como el poblado para albergar los enterramientos. Las dataciones más recientes corresponden a los individuos CAS-193S (5.330±50 BP, Neolítico Medio) situado en la necrópolis y CAS-21 (5.100±50 BP, Neolítico Medio) situado en el poblado, lo cual también indica que en las fechas más recientes, los individuos eran inhumados tanto en la necrópolis como en el poblado.

Estos datos muestran que este poblado fue utilizado como tal, al menos durante un milenio aproximadamente (tiempo transcurrido desde la fecha más antigua a la más reciente de las dataciones) y que durante este lapso de tiempo, los habitantes de Los Cascajos enterraban a sus muertos tanto en el poblado como en la necrópolis (GARCÍA-GAZÓLAZ y SESMA, 1999; 2001; 2007a).

A partir de las dataciones realizadas tanto en restos óseos como en otros tipos de materiales, se definen dos amplias fases cronológicas: 1) La **Fase I** que corresponde al **Neolítico Antiguo**, y que en dataciones absolutas se extiende entre el 6.435 ± 45 BP y el 5.640 ± 35 BP. A esta fase se asocian once individuos. 2) La **Fase II** que corresponde al **Neolítico Medio** y que en dataciones absolutas se extiende hasta 5.100 ± 50 BP, fase a la que solo pertenecen dos individuos (Tabla V.1.1). El resto de los individuos, que son la mayoría, se han asignado a una fase denominada **Fase I-II**, al no presentar ningún tipo de ajuar o característica que permita situarlos en alguna de las dos fases definidas por datación.

El ritual funerario conlleva la colocación del inhumado en posición flexionada, bien sobre un costado (60% de los casos) o decúbito supino (30% de los casos) (Tabla V.1.1), con las extremidades plegadas hacia el tronco (en el caso de las piernas dispuestas en paralelo, mientras que en el caso de los brazos presenta una mayor variabilidad) y éste se vuelca ligeramente hacia el frente. En algunas inhumaciones esta posición resulta extremadamente forzada (CAS-191 y CAS-341 por ejemplo), lo que induce a pensar en la utilización de algún sistema de inmovilización del cadáver mediante ligaduras (Figura V.1.1).

Esta postura contraída la presentan todos los cuerpos, independientemente de la forma y dimensiones de la fosa (GARCÍA-GAZÓLAZ y SESMA 2007a).

Figura V.1.1. Imagen de dos inhumados inmobilizados. a) Individuo CAS-341 y b) individuo CAS-191. Facilitada por J. Sesma y J García Gazolaz.

a)



b)



Otra vertiente del ritual es la orientación del cadáver. El 66% de los inhumados presentan el tronco (marcado por una línea imaginaria que uniría la base del cráneo y el sacro) orientado hacia el cuadrante SE-SW, y la cabeza girada hacia su izquierda, es decir, mirando hacia poniente. El resto, presenta una orientación que no puede ser agrupada en una o en unas pocas clases (Tabla V.1.1) (GARCÍA-GAZÓLAZ y SESMA, 2007a).

La mayoría de las inhumaciones son individuales en fosa simple, tipo hoyo, variando únicamente el tipo de planta (circular, ovalada o en forma de ocho) y las dimensiones (diámetro y profundidad). En unos pocos casos, existe también asociación de inhumados, dándose dos casuísticas: a) individuos superpuestos (CAS-193, superior e inferior) y b) individuos

inhumados en fosas adyacentes (CAS-202/CAS-203 y CAS-257/CAS-258) (GARCÍA-GAZÓLAZ y SESMA, 1999, 2001, 2007a).

Nueve de las 36 inhumaciones recuperadas en este yacimiento están cubiertas bien con una gran losa de arenisca (dos inhumaciones) o bien con tierra (siete inhumaciones), pudiendo presentar estas últimas cereal carbonizado, piedras y fragmentos de molinos de mano (Tabla V.1.1) (GARCÍA-GAZÓLAZ y SESMA, 1999, 2001, 2007a).

En este yacimiento resulta excepcional el hallazgo de una inhumación (CAS-517) en el interior de una de las ocho cabañas pertenecientes al poblado. Asimismo, es relevante la existencia de inhumaciones en estructuras reutilizadas (CAS-33, CAS-193, CAS-216 y CAS-222), es decir, la función primaria de estas estructuras no era la de albergar una inhumación, sino que eran usadas como almacén, estructura de combustión o basurero (GARCÍA-GAZÓLAZ y SESMA, 1999, 2001, 2007a).

El ajuar en general es pobre, mayoritariamente se trata de cerámicas, molinos de mano y cuchillos de sílex. En cuanto al adorno personal se han recuperado cuentas discordes, colgantes y diademas de concha o hueso. Solamente 16 enterramientos presentan algún tipo de ajuar. Un caso especial es el inhumado CAS-196, no solo por la singularidad de los elementos de su ajuar, sino por el número y variedad de las piezas (vasijas de cerámica, hacha pulimentada, percutor, espátula, candiles de ciervo y metapodios de ovicáprido).

Todos estos datos arqueológicos nos informan acerca de la existencia en el Neolítico Antiguo de un poblado asentado (con evidencias de hogares, cabañas, silos y almacenes, entre otras estructuras), que además alberga una necrópolis en su interior. La excepcionalidad del yacimiento de Los Cascajos reside en el hecho de ser el primer yacimiento conocido tanto en Navarra como en la Península Ibérica, hasta la fecha, que presenta una necrópolis definida dentro del poblado y en ser uno de los yacimientos más antiguos del Neolítico en la Península Ibérica (GARCÍA-GAZÓLAZ y SESMA, 1999; 2001; 2007a)

Resumiendo, los individuos del yacimiento neolítico de Los Cascajos presentan diferentes combinaciones de características culturales, como es el tipo y la presencia/ausencia de ajuar; el tipo y la presencia/ausencia de cobertura de la fosa; la inhumación en el poblado o en la necrópolis, en fosas reutilizadas o asociadas; el sexo y la edad. Teniendo en cuenta estas características culturales, se evaluará la existencia de coincidencia entre la variabilidad cultural frente a la variabilidad biológica.

Por lo tanto, el objetivo de este estudio se centra en realizar un análisis a nivel morfológico y molecular de los restos esqueléticos recuperados en el yacimiento neolítico de Los Cascajos. Estos resultados, junto con otras evidencias arqueológicas recuperadas referentes al ajuar, ubicación, cobertura, orientación y disposición del inhumado en la fosa; permitirán una mejor comprensión del patrón de enterramiento que presentan estos individuos, dado que a partir de este patrón, se puede llegar a deducir el comportamiento y la forma de vida de los individuos que se encuentran inhumados en este yacimiento.

V.1.2. MATERIAL Y METODOS

En el yacimiento neolítico de Los Cascajos (Los Arcos, Navarra) se han recuperado restos humanos pertenecientes a 36 individuos, 25 de ellos se encuentran ubicados en la necrópolis y 11 se sitúan dispersos por el poblado. Se han podido reunir un total de 75 piezas dentarias, correspondientes a 30 individuos, en los que se ha llevado a cabo el estudio genético.

El sexo y la edad de los restos humanos recuperados en Los Cascajos se han estimado mediante los criterios morfológicos habituales (WHITE *et al.*, 2005). La estimación del sexo se ha llevado a cabo principalmente mediante el dimorfismo sexual de la pelvis y el cráneo. La estimación de la edad en los individuos subadultos, se ha realizado mediante el patrón de erupción y calcificación dentaria y el patrón de cierre de las epífisis de los huesos largos. En los adultos, la estimación de la edad se ha llevado a cabo teniendo en cuenta el desgaste dentario, cambios en la sínfisis púbica, cambios degenerativos en el esqueleto y el cierre de las suturas craneales.

El protocolo seguido tanto para la selección, limpieza de las muestras, así como la extracción de ADN y el análisis del ADNmt se indica en el apartado IV.1 de la presente tesis doctoral.

Además, hemos llevado a cabo los criterios de autenticación propuestos para los estudios de ADN_a enumerados en el apartado IV.1.6 de la presente tesis doctoral

Se han realizado los controles oportunos tanto durante la extracción del ADN (“*blanco de la extracción*”, control sometido a todo el proceso de la extracción, pero al que no se le ha añadido tejido), como durante la amplificación de las muestras (“*control negativo de la PCR*”, muestra a la que se le han añadido todo los reactivos necesarios para la amplificación, excepto el ADN).

Asimismo, se ha cuantificado el número de moléculas de ADN molde presentes en el extracto de ADN mediante qPCR. También se ha llevado a cabo la duplicación de las muestras en nuestro laboratorio, para ello se han extraído dos muestras del mismo individuo, en dos momentos diferentes de trabajo. Además, hemos llevado a cabo la clonación de los amplificados, de modo que se puedan distinguir las mutaciones endógenas de la muestra, de otros cambios producidos por la degradación del ADN o por la contaminación.

Finalmente, se ha llevado a cabo la replicación de un elevado número de moléculas en un laboratorio independiente al nuestro, concretamente en el laboratorio dirigido por Dr. Vicente Cabrera de la Facultad de Biología (área de Genética) de la Universidad de La Laguna (Tenerife).

En cuanto al tratamiento estadístico, se ha realizado un análisis de Coordenadas Principales mediante el programa PCO (ANDERSON, 2003) y un Análisis de Componentes Principales (PCA) (SPSS Software), donde hemos considerado en conjunto, tanto las características culturales que presentan los inhumados, como los datos genéticos que hemos obtenido.

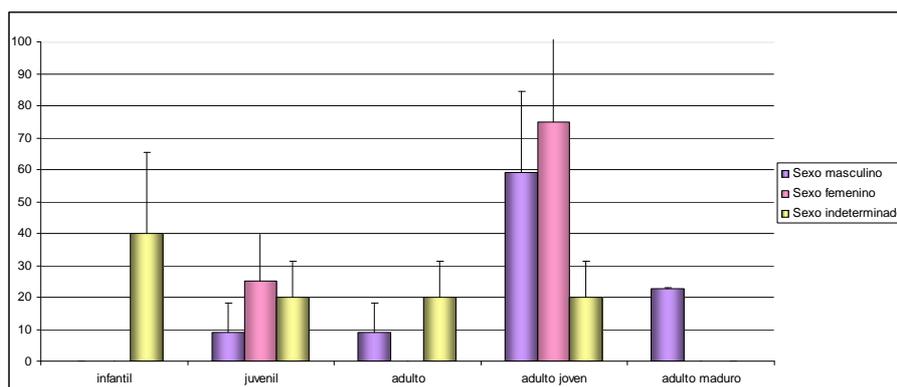
Para valorar la existencia de algún tipo de relación entre la variabilidad genética y las características culturales de algunos inhumados, se han realizado varios test exactos de diferenciación poblacional utilizando el paquete estadístico Arlequin 3,11 (SCHNEIDER *et al.*, 2000). También se ha utilizado este software para calcular la diversidad genética (NEI *et al.*, 1987).

V.1.3. RESULTADOS

V.1.3.1 Distribución según sexo y edad

El sexo y la edad se han podido estimar en el 86% de los individuos. Un 71% pertenecen al sexo masculino, el 13% al sexo femenino y en el 16% restante no se ha podido estimar el sexo, clasificándose como indeterminable. Cabe resaltar de estos resultados, el predominio de individuos masculinos (Figura V.1.2).

Figura V.1.2. Distribución del sexo en los diferentes rangos de edad estimados en el yacimiento neolítico de Los Cascajos.



En cuanto a la estimación de la edad, se observa un rango que comprende desde la edad infantil a la edad adulto maduro, siendo la gran mayoría de los individuos adultos jóvenes (54,84%) (Figura V.1.2).

Al analizar conjuntamente los resultados concernientes al sexo y la edad (Figura V.1.2), es destacable la presencia de una gran proporción de individuos masculinos adultos jóvenes, siendo este rango de edad y este sexo el mayoritario en este yacimiento.

V.1.3.2 Distribución de la variabilidad del ADNmt

En los 36 individuos que se han recuperado en el yacimiento de Los Cascajos, se ha llevado a cabo el análisis de la secuencia del HVS-I y del fragmento de HVS-II que contiene la posición nucleotídica 73, así como la determinación de algunos SNPs de la región codificante, habiéndose obtenido resultados positivos en un total de 30 individuos. Sin embargo, únicamente en 25 de ellos se han obtenido resultados reproducibles, siendo 16 de la necrópolis y 7 del poblado (Tabla V.1.1 y Figura V.1.3).

Por lo tanto, debido al estado de conservación de las muestras, sólo se han analizado el 83% de los individuos recuperados, habiéndose obtenido resultados positivos en el 77%, casos estos últimos en los que se ha cuantificado del número de moléculas molde de los extractos de ADN mediante qPCR, habiéndose obtenido unos resultados que oscilan entre 100-1000 moléculas (Tabla V.3.2), justo el límite de la cantidad de ADN que se considera suficiente para obtener resultados reproducibles (HANDT *et al.*, 1996).

Asimismo, el 92% de éstos resultados se ha verificado mediante duplicación, consistente en el análisis de dos muestras del mismo individuo, realizado de forma independiente en nuestro laboratorio. Además, se han replicado el 56% de las muestras en el laboratorio dirigido por Dr. Vicente Cabrera de la Universidad de La Laguna. Finalmente, se han clonado 41 de los fragmentos amplificados y posteriormente se han secuenciado 10 clones de cada fragmento. Gracias a la correlación obtenida al comparar todos estos resultados, podemos considerar que los resultados que hemos obtenido son auténticos (Tabla V.1.1).

La variabilidad mitocondrial que se ha obtenido se clasifica en 14 haplotipos mitocondriales, mostrando así una elevada diversidad genética ($0,9486 \pm 0,0248$), que puede agruparse en 4 haplogrupos mitocondriales (H, U, K, J), donde tres de ellos son los más frecuentes en la población europea actual (H, U y K) (Tabla V.1.1 y Figura V.1.4).

De los catorce haplotipos mitocondriales obtenidos en Los Cascajos (Tabla V.1.1), cinco se presentan en más de un individuo (ht2, ht3, ht4, ht7 y ht10), siendo éstos los haplotipos mas frecuentes; mientras que los nueve restantes, están representados cada uno por un solo individuo. Se observa que hay dos haplotipos exclusivos de los individuos inhumados en el poblado (ht1 y ht5), nueve haplotipos exclusivos de los inhumados en la necrópolis (ht6 al ht14) y tres haplotipos (ht2 al 4), se encuentran compartidos en ambas localizaciones (necrópolis y poblado) (Tabla V.1.1 y Figura V.1.3).

Variación temporal del ADNmt en poblaciones de la C. Cantábrica

Tabla V.1.1. Yacimiento neolítico de Los Cascajos (Los Arcos, Navarra): relación de los individuos recuperados en este yacimiento (INDV). Se indica el sexo y la edad, el haplotipo (HT), el haplogrupo (HG), la ubicación (necrópolis y poblado), fase cronológica (I y II), orientación (OR.), tipo de ajuar, posición (de costado o decúbito supino) y el tipo de cobertura (losa y/o tierra) (COBER), que presentan los individuos inhumados en este yacimiento.

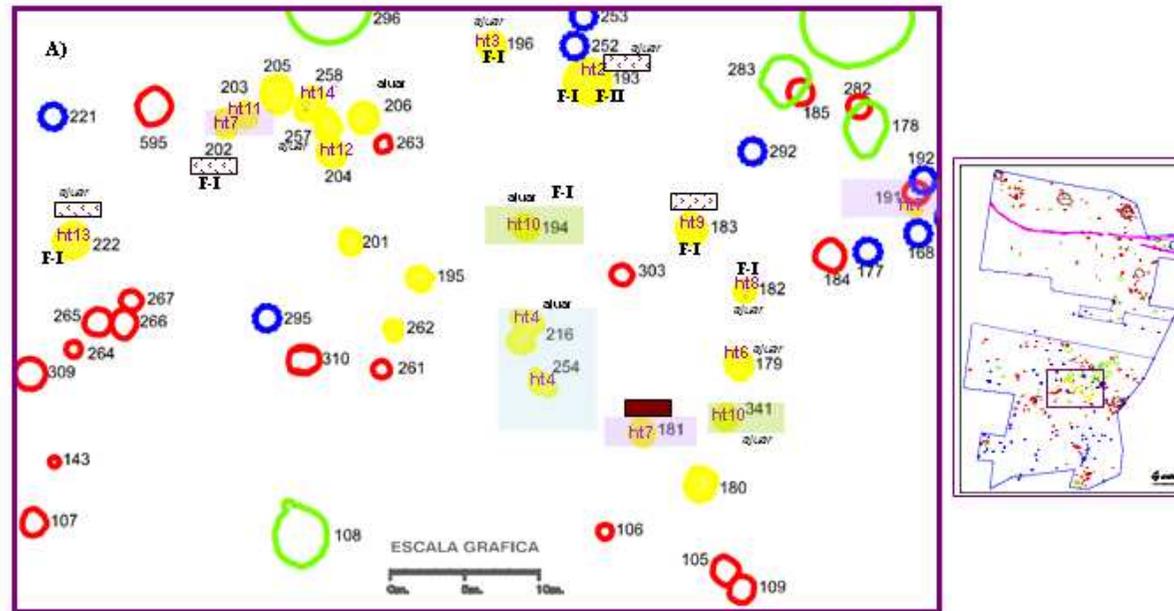
| INDV. | HVS-I | nt73 | HG | HT | SEXO | EDAD | UBICACIÓN | FASE | OR. | AJUAR | POSICIÓN | COBER. |
|----------|-------------|------|----|-----|------|---------------|------------|------|-------|-----------------|-----------------|--------|
| CAS-21 | 92 | G | H | ht1 | ♂ | adulto joven | poblado | I | SE-SW | adorno | costado | |
| CAS-33 | 311 | A | H | ht2 | ♂ | adulto joven | poblado | II | N | | costado | losa |
| CAS-48.1 | CRS | G | H | ht3 | ♂ | adulto maduro | poblado | I-II | | | | |
| CAS-48.2 | | | | | | | poblado | I | | | | |
| CAS-70 | CRS | G | U | ht4 | ♂ | adulto joven | poblado | I | SE-SW | cerámica | decúbito supino | |
| CAS-73 | | | | | ♂ | adulto | poblado | I-II | | | | |
| CAS-90 | CRS | G | H | ht3 | ♂ | adulto joven | poblado | I-II | E | cerámica | | |
| CAS-148 | 220-278-311 | G | U | ht5 | ♂? | adulto | poblado | I-II | WSW | | decúbito supino | |
| CAS-173 | | | | | ♂ | adulto joven | poblado | I-II | SE-SW | molinos de mano | decúbito supino | tierra |
| CAS-179 | 69-126-195 | G | J | ht6 | ♂ | adulto joven | necrópolis | I-II | SE-SW | cuchillos sílex | decúbito supino | |
| CAS-180 | | | | | ♂ | adulto joven | necrópolis | I-II | SE-SW | | costado | |
| CAS-181 | 224-311 | G | K | ht7 | ♂ | adulto | necrópolis | I-II | SE-SW | | costado | losa |

| INDV. | HVS-I | nt73 | HG | HT | SEXO | EDAD | UBICACIÓN | FASE | OR. | AJUAR | POSICIÓN | COBER. |
|----------|------------|------|----|------|------|------------------|------------|------|-------|---------------------|-----------------|--------|
| CAS-182 | CRS | A | H | ht8 | ♀ | adulto joven | necrópolis | I | SSE | adorno | | |
| CAS-183 | 92-288-311 | G | U | ht9 | ♂ | adulto maduro | necrópolis | I | SE-SW | | costado | tierra |
| CAS-191 | 224-311 | G | K | ht7 | ♂ | adulto joven | necrópolis | I-II | ESE | | costado | |
| CAS-193S | 311 | A | H | ht2 | ♂? | juvenil | necrópolis | II | SE-SW | molinos de mano | costado | tierra |
| CAS-193I | | | | | | infantil | necrópolis | I | SSE | molinos de mano | decúbito supino | tierra |
| CAS-194 | 92-311 | A | H | ht10 | ♂ | adulto joven | necrópolis | I | SE-SW | molinos de mano | costado | |
| CAS-195 | | | | | ♂ | | necrópolis | I-II | SE-SW | | | |
| CAS-196 | CRS | G | H | ht3 | ♂ | adulto maduro | necrópolis | I | WSW | Cerámica y hacha... | decúbito supino | |
| CAS-201 | | | | | | | necrópolis | I-II | SE-SW | | decúbito supino | |
| CAS-202 | 224-311 | G | K | ht7 | ♂ | adulto joven | necrópolis | I-II | SE-SW | | costado | tierra |
| CAS-203 | 69-126 | G | J | ht11 | ♀ | juvenil (13-14a) | necrópolis | I-II | E | | decúbito supino | |
| CAS-204 | 270-311 | G | U5 | ht12 | | infantil (8-9a) | necrópolis | I-II | SE-SW | | costado | |

Variación temporal del ADNmt en poblaciones de la C. Cantábrica

| INDV. | HVS-I | nt73 | HG | HT | SEXO | EDAD | UBICACIÓN | FASE | OR. | AJUAR | POSICIÓN | COBER. |
|---------|------------|------|----|------|------|---------------|------------|------|-------|--------------------------|-----------------|--------|
| CAS-205 | | | | | | | necrópolis | I-II | N | | costado | |
| CAS-206 | | | | | ♂ | juvenil | necrópolis | I-II | SE-SW | cerámica | decúbito supino | |
| CAS-216 | CRS | G | U | ht4 | ♂ | adulto joven | necrópolis | I-II | S | cuchillos sílex | costado | |
| CAS-222 | 129 | A | H | ht13 | ♂ | adulto maduro | necrópolis | I | SE-SW | cuchillos sílex y adorno | costado | tierra |
| CAS-254 | CRS | G | U | ht4 | | juvenil | necrópolis | I-II | WNW | | costado | |
| CAS-257 | | | | | ♀ | adulto joven | necrópolis | I-II | S | hacha azuela | costado | |
| CAS-258 | 92-224-311 | G | K | ht14 | ♀ | adulto joven | necrópolis | I-II | SE-SW | cerámica | costado | |
| CAS-262 | | | | | | adulto | necrópolis | I-II | | | | |
| CAS-263 | | | | | | | necrópolis | I-II | SE-SW | | costado | |
| CAS-341 | 92-311 | A | H | ht10 | ♂ | adulto joven | necrópolis | I-II | SE-SW | molinos de mano | costado | |
| CAS-497 | 311 | A | H | ht2 | ♂ | adulto joven | poblado | I | SE-SW | | costado | tierra |
| CAS-517 | | | | | | adulto joven | poblado | I | ENE | | costado | |

Figura V.1.3. Plano del yacimiento neolítico de Los Cascajos. A) Sección del plano correspondiente a los inhumados de la necrópolis. B) Secciones del plano correspondientes a las inhumaciones dispersas por el poblado. ■, inhumaciones; ■, cobertura de la inhumación con losas; ■, cobertura de la inhumación con tierra compuesta de material pétreo; *ajuar*, inhumaciones con ajuar asociado; F-I, Fase cronológica I; F-II, Fase cronológica II; y ♀, Individuo de sexo femenino. Figura facilitada por J. Sesma con pequeñas modificaciones.



Variación temporal del ADNmt en poblaciones de la C. Cantábrica

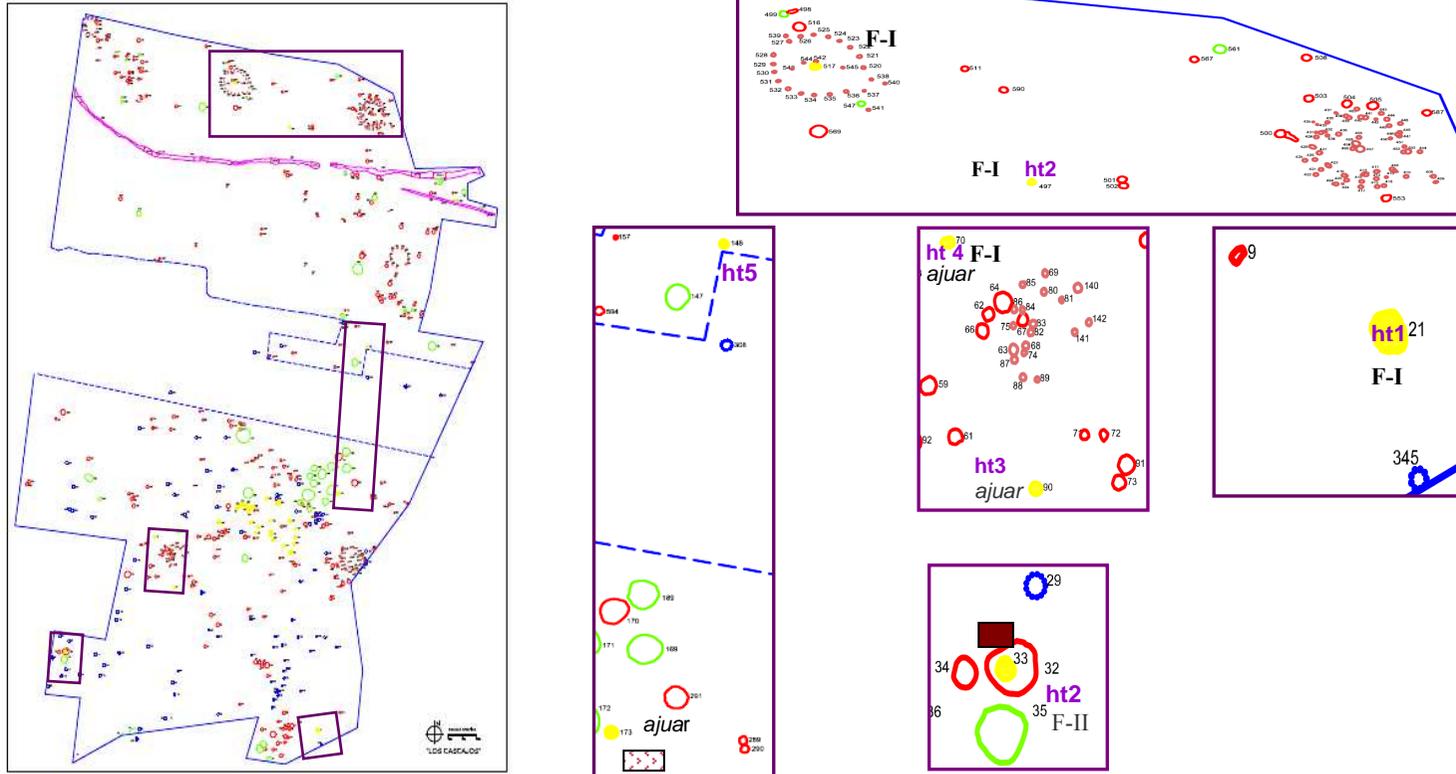
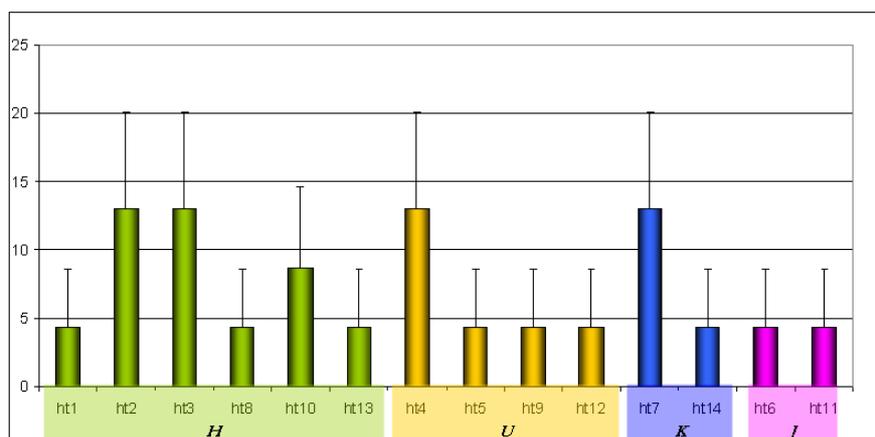


Figura V.1.4. Distribución de las frecuencias haplotipos mitocondriales (%) de los individuos recuperados en el yacimiento de Los Cascajos, junto con los haplogrupos mitocondriales en los que se clasifican.



De los cinco haplotipos más frecuentes de este yacimiento (ht2, ht3, ht4, ht7 y ht10), tres se encuentran representados tanto por individuos del poblado como de la necrópolis (ht2, ht3 y ht4). El ht2 pertenece a tres individuos varones (CAS-33, CAS-193S, CAS-497), que presentan cobertura en sus fosas, tanto de tierra con restos de material pétreo, como con una losa de arenisca. Sin embargo, sólo uno de estos individuos presenta ajuar en forma de molinos de mano (CAS-193S). Además, estos individuos pertenecen a diferentes fases cronológicas, CAS-33 y CAS-193S a la Fase II y CAS-497 a la Fase I (Tabla V.1.1). Todo ello nos indica que en la misma época (Fase-II), existían diversas prácticas funerarias (inhumaciones en la necrópolis o en el poblado, presentar cobertura de tierra o con una losa de arenisca y presencia/ausencia de ajuar en las inhumaciones).

En resumen, podemos deducir que la característica común de estos individuos es la presencia de cobertura y el haplotipo mitocondrial (ht2),

el cual presenta una elevada frecuencia en la población europea actual, ~4-6% (RICHARDS *et al.*, 2000; ACHILLI *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2008), lo que hace que resulte difícil establecer la existencia de una relación familiar vía materna entre estos individuos.

El ht3 está presente en tres individuos masculinos, dos adultos maduros y un adulto joven (CAS-48.1, CAS-90 y CAS-196). Ninguno de ellos presenta cobertura, uno de los individuos se encuentra enterrado en la necrópolis (CAS-196) y los dos restantes en el poblado (CAS-48.1 y CAS-90). Además, dos de ellos (CAS-196 y CAS-90), presentan cerámicas, siendo el caso del inhumado CAS-196 un caso excepcional, no sólo por la singularidad de los elementos de su ajuar, sino también por su número y variedad. Por lo tanto, la característica en común de estos individuos es la ausencia de cobertura y el haplotipo mitocondrial (ht3). Dado que la frecuencia de este haplotipo no es elevada en la población europea actual, oscila entre 0,5-3,1% (MACAULAY *et al.*, 1999; SALAS *et al.*, 1998; FINILLA *et al.*, 2001), podría plantearse la existencia de algún tipo de parentesco vía materna entre estos individuos.

En cuanto al ht4, está presente en tres individuos varones (CAS-70, CAS-216 y CAS-254), con ausencia de cobertura. Sin embargo, estos individuos presentan diferente tipo de ajuar (cerámica, cuchillos de sílex y ausencia de ajuar), diferentes orientaciones y diferente posición del inhumado en la fosa. El ht4, presenta una frecuencia en gradiente en las poblaciones actuales, observándose los valores máximos en las poblaciones del Próximo Oriente, disminuyendo su valor al acercarse a las poblaciones del suroeste de Europa (7-20%) (RICHARDS *et al.*, 2000;

ACHILLI *et al.*, 2005, LEE *et al.*, 2008). Así, asumimos que la característica en común de estos tres individuos es la ausencia de cobertura y el haplotipo (ht4), siendo muy difícil poder establecer alguna relación familiar vía materna entre ellos, dada la frecuencia de este haplotipo en la población europea actual.

Otros haplotipos compartidos por más de un individuo en este yacimiento, son el ht7 y ht10, los cuales, además, son exclusivos de individuos enterrados en la necrópolis. El ht7 está presente en tres individuos masculinos (CAS-181, CAS-191 y CAS-202), sin ajuar, orientados hacia poniente y con una posición de costado en la fosa. Sin embargo, sólo en dos casos presentan cobertura, bien de tierra con material pétreo o bien con una losa de arenisca. Por tanto, estos individuos tienen en común la ausencia de ajuar y el haplotipo. La frecuencia de este haplotipo en la población actual es de un 6% (RICHARDS *et al.*, 2000; ACHILLI *et al.*, 2005, LEE *et al.*, 2008), resultando arriesgado plantear la existencia de relaciones vía materna entre ellos.

El ht10, es un caso único en este yacimiento, ya que lo comparten dos individuos masculinos (CAS-194 y CAS-341), que presentan molinos de mano, ausencia de cobertura, una orientación hacia poniente y una posición de costado en la fosa. Si a todo esto, le sumamos que este haplotipo presenta una frecuencia baja o nula en la población actual, es factible pensar en la existencia de una posible relación familiar vía materna entre estos dos individuos.

El resto de los haplotipos (ht1, ht5, ht6, ht8, ht9, ht11, ht12, ht13 y ht14), están representados por un único individuo cada uno; siendo el ht1 y ht5, exclusivos del poblado y el resto de la necrópolis.

Se ha realizado un test exacto de diferenciación poblacional a fin de valorar la posible diferenciación biológica entre los individuos inhumados tanto en la necrópolis como en el poblado. El resultado de este test indica un valor no significativo ($p=0,65897\pm 0,0086$, $P<0,05$), es decir, la disposición de los inhumados en el poblado o en la necrópolis, no parece relacionarse con la existencia de grupos poblacionales con diferente sustrato genético.

Este resultado, se ve apoyado por los valores de la diversidad genética calculada para cada una de las áreas de inhumación (poblado y necrópolis). El valor más elevado de diversidad obtenido en la necrópolis ($0,9583\pm 0,0363$), se debe a que tanto el tamaño muestral como el número de haplotipos es mayor que en el caso del poblado ($0,9048\pm 0,1033$).

Una peculiaridad en cuanto a la ubicación de los individuos es el caso de los inhumados en **estructuras reutilizadas** (CAS-33, CAS-193S, CAS-216 y CAS-222); ya que todas ellas están localizadas en la necrópolis, excepto el individuo CAS-33 que se encuentra en el poblado. En los cuatro casos, se trata de individuos varones, en su mayoría adultos jóvenes, dispuestos sobre un costado y con algún tipo de ajuar (molinos de mano, cerámicas o cuchillos de sílex), excepto el individuo CAS-33 que no presenta ningún tipo de ajuar (Tabla V.1.1 y Figura V.1.3).

Si analizamos los haplotipos de estos cuatro individuos (ht2, ht4 y ht13), sólo un haplotipo (ht2) es común a dos individuos (CAS-33 y CAS-193S), que además pertenecen a la misma fase cronológica, Fase II. Sin embargo, uno está en el poblado y el otro en la necrópolis, presentando además diferencias en la cobertura (CAS-33 presenta losa y CAS-193S tierra con material pétreo). Por tanto, hay más diferencias que características comunes entre los individuos inhumados en fosas reutilizadas.

Otro caso que cabe mencionar, es la existencia de dos tipos particulares de **fosas asociadas**, ambas ubicadas en la necrópolis: fosas adyacentes y fosas superpuestas. Las fosas adyacentes corresponden a las inhumaciones CAS-202/CAS-203 y CAS-257/CAS-258. Los enterramientos CAS-257/CAS-258, consisten de dos mujeres adultas jóvenes, siendo éstas, dos de las cuatro mujeres encontradas en este yacimiento, de las cuales desafortunadamente únicamente se ha obtenido resultado molecular reproducible en una de ellas (CAS-258, ht14). Por lo tanto, resulta imposible discutir sobre las posibles relaciones biológicas entre estos dos individuos.

Sin embargo, en los inhumados CAS-202/CAS-203, se han identificado un hombre adulto joven y una mujer subadulta, que presentan además distinto linaje mitocondrial (ht7 y ht11, respectivamente), lo que nos obliga a descartar la existencia de cualquier tipo de relación de parentesco materno entre estos individuos (Tabla V.1.1 y Figura V.1.3).

En el caso de las fosas superpuestas (CAS-193S y CAS-193I), se trata de dos individuos inhumados en la necrópolis, que tienen como ajuar molinos de mano y la cobertura de la fosa es de tierra con restos de material pétreo. Se trata de dos individuos subadultos, siendo uno infantil (CAS-193I) y el otro juvenil (CAS-193S).

Estos individuos pertenecen cada uno a una fase cronológica diferente (CAS-193I a la Fase I y CAS-193S a la Fase II). Los resultados moleculares sólo se han obtenido en uno de los individuos (CAS-193S), que presenta el haplotipo (ht2), el cual es bastante frecuente en la población europea actual. Sin embargo, el hecho de ser la única estructura superpuesta recuperada en este yacimiento, de que ha transcurrido aproximadamente un milenio entre los dos inhumados y de que además, compartan diversas características comunes (edad, sexo, ajuar y cobertura), pudiera tener algún significado a nivel del ritual de enterramiento.

V.1.3.3. Análisis multivariante de la diversidad genética y cultural

Con el fin de evaluar si existe algún tipo de relación entre las características culturales (tales como ajuar o cobertura de la fosa) y biológicas (ADNmt), se ha realizado una comparación entre los haplotipos mitocondriales resultantes en diferentes grupos. Los individuos se han agrupado por: 1) presencia/ausencia de ajuar, 2) presencia/ausencia de cobertura de la fosa, 3) por el sexo y 4) la edad.

La casuística de los individuos de Los Cascajos es muy diversa, encontrándose individuos: con ajuar/con cobertura, con ajuar/sin cobertura, sin ajuar/con cobertura y sin ajuar/sin cobertura, que a su vez pueden estar enterrados o bien en la necrópolis o bien en el poblado. Los haplotipos en los que se han clasificado son también muy diversos (Tabla V.1.1). Por ello, vamos a indagar si existen casos en los que haya una coincidencia entre el haplotipo y alguna de las características culturales.

En primer lugar, se ha analizado si entre los individuos que comparten un mismo haplotipo existe coincidencia con la presencia de algún tipo de característica cultural. Entre los individuos enterrados en este yacimiento se han encontrado 5 haplotipos que están compartidos por más de un individuo y son: el ht2 (CAS-33, CAS-193S y CAS-497), ht3 (CAS-48.1, CAS-90 y CAS-196), ht4 (CAS-70, CAS-216 y CAS-254), ht7 (CAS-181, CAS-191 y CAS-202) y ht10 (CAS-194 y CAS-341).

El ht10 está compartido exclusivamente por dos individuos (CAS-194 y CAS-341), enterrados en la zona de la necrópolis y que además presentan otras características comunes como son: el sexo (varones), la edad (adultos jóvenes), molinos de mano y que carecen de cobertura (Tabla V.1.1). Dada la elevada variabilidad cultural asociada a los individuos de este yacimiento y teniendo en cuenta que este haplotipo mitocondrial es muy raro en la población europea actual, el hecho de encontrar dos individuos que compartan las características mencionadas nos permite plantear la existencia de alguna relación de parentesco entre ellos.

Los individuos CAS-90 y CAS-196 pertenecen ambos al ht3, presentan cerámicas, carecen de cobertura y son ambos de sexo masculino. Sin embargo, presentan diferencias en cuanto a la edad, (uno es un adulto joven y el otro es un adulto maduro) y su ubicación, (uno se encuentra enterrado en la necrópolis y el otro, en el poblado) (Tabla V.1.1 y Figura V.1.3). Estos datos muestran la existencia de dos individuos que presentan algunas características culturales comunes junto con el mismo haplotipo (ht3), pudiendo plantear, basándonos en los datos genéticos, la existencia de algún tipo de relación de parentesco entre estos individuos que presentan algún tipo de relación cultural o de ritual funerario. Sin embargo, este planteamiento se debe rechazar, ya que el ht3 no es exclusivo de estos dos únicos individuos, el individuo CAS-48.1 también pertenece al ht3, el cual solamente tiene en común con ellos la ausencia de cobertura.

Los individuos CAS-193S y CAS-497 comparten el haplotipo ht2 y desde el punto de vista cultural presentan cobertura en forma de tierra con restos de material pétreo. Ambos son varones, pero de distinta edad y uno está enterrado en la necrópolis (CAS-193S) y el otro en el poblado (CAS-497). Dada la elevada frecuencia del ht2 en la población europea actual ~4-6% (ACHILLI *et al.*, 2004), no es posible plantear una relación biológica entre estos dos individuos, además, tampoco los aspectos culturales presentan un patrón definido.

Para averiguar si existe alguna asociación entre los haplotipos mitocondriales y las principales características culturales (lugar de

enterramiento, presencia/ausencia de ajuar y presencia/ausencia de cobertura), hemos agrupado a los individuos en las siguientes categorías:

1. Inhumados en el poblado, con ajuar y con cobertura (**PAC**): (CAS-173)
2. Inhumados en el poblado, con ajuar y sin cobertura (**PA**): (CAS-21, CAS-70, CAS-90)
3. Inhumados en el poblado, sin ajuar y con cobertura (**PC**): (CAS-33, CAS-497)
4. Inhumados en el poblado, sin ajuar y sin cobertura (**P**): (CAS-48.1, CAS-180, CAS-73, CAS-148)
5. Inhumados en la necrópolis, con ajuar y con cobertura (**NAC**): (CAS-193S, CAS-193I, CAS-254),
6. Inhumados en la necrópolis, con ajuar y sin cobertura (**NA**): (CAS-179, CAS182, CAS-194, CAS-196, CAS-206, CAS-216, CAS-257, CAS-258, CAS-341)
7. Inhumados en la necrópolis, sin ajuar y con cobertura (**NC**): (CAS-181, CAS-183, CAS-202)
8. Inhumados en la necrópolis, sin ajuar y sin cobertura (**N**): (CAS-180, CAS-181, CAS-183, CAS-191, CAS-195, CAS-201, CAS-203, CAS-204, CAS-205, CAS-254, CAS-262, CAS-263)

Se han tenido en cuenta los haplotipos resultantes de los individuos integrantes de cada una de las anteriores agrupaciones (siempre que haya datos de más de un individuo) y se ha realizado un test exacto de diferenciación poblacional entre estos grupos. En la Tabla V.1.2, se muestran los resultados de este análisis, donde no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los agrupamientos

resultantes y la variabilidad del ADNmt, lo que no parece apoyar la idea de diferencias genéticas en los grupos definidos por sus características culturales.

Tabla V.1.2. Test exacto de diferenciación poblacional entre los individuos de las diferentes categorías (PA, PC, P, NAC, NA, NC, N). Valor de significación *P<0,002.

| | PA | PC | P | NAC | NA | NC |
|-----|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| PC | 0.3999±0.004 | | | | | |
| P | 1.0000±0.000 | 1.0000±0.000 | | | | |
| NAC | 1.0000±0.000 | 0.3357±0.003 | 1.0000±0.000 | | | |
| NA | 0.9347±0.004 | 0.3297±0.005 | 0.8859±0.004 | 1.0000±0.000 | | |
| NC | 0.3996±0.003 | 0.2003±0.003 | 0.3999±0.004 | 0.3933±0.004 | 0.2577±0.005 | |
| N | 1.0000±0.000 | 0.4637±0.006 | 1.0000±0.000 | 1.0000±0.000 | 0.7494±0.005 | 1.0000±0.000 |

Con el fin de analizar de forma multivariante toda la información, tanto genética como cultural (Tabla V.1.1), se ha realizado un análisis de componentes principales (PCA) y otro de coordenadas principales (PCO). El análisis de componentes principales explica el 75,3% de la varianza total (Figura V.1.5).

El primer componente explica el 47,4% de la varianza y muestra en un extremo a los individuos inhumados en la necrópolis, con ajuar y sin cobertura, y en el otro, a los individuos cuya única característica cultural común es la presencia de cobertura (Figura V.1.5). Los haplotipos que presentan una mayor correlación con el primer componente son, ht6, ht8, ht10 y ht14, que corresponden a individuos que presentan características recogidas en la categoría 6 (inhumados en la necrópolis, con ajuar y sin cobertura, **NA**).

Asimismo, el ht4 también presenta una alta correlación con el primer componente, pero a diferencia de los haplotipos anteriores, únicamente se presenta en individuos enterrados en el poblado. En posición opuesta al primer componente, se encuentran diversos haplotipos (ht9, ht2, ht7 y ht13) que corresponden a individuos cuya característica común es la existencia de cobertura.

Los haplotipos que presentan coeficientes de correlación más altos con el primer componente, son el ht4 (0,847) y el ht9 (-0,905). Los individuos que pertenecen al ht4, se encuentran enterrados tanto en la necrópolis como en el poblado, presentan ajuar y carecen de cobertura de la fosa.

El ht9 es exclusivo de individuos de la necrópolis, no presentan ajuar, pero sí cobertura. Junto al ht9, se sitúa el ht2 (-0,840) que está presente tanto en individuos de la necrópolis como del poblado, con presencia variable de ajuar y presencia de cobertura en todos los casos. Por lo tanto, el primer componente representa la dualidad, “presencia/ausencia de cobertura en la fosa”, siendo secundario la ubicación de los inhumados en la necrópolis o el poblado y la presencia/ausencia de ajuar.

El segundo componente, explica el 27,9% de la varianza; muestra en un extremo a los individuos que presentan los haplotipos ht1 y ht5, exclusivos del poblado, y el ht3, presente en individuos tanto de la necrópolis como del poblado. En el otro extremo, está el ht7, exclusivo de la necrópolis. Por lo tanto, el segundo componente diferencia a los haplotipos que solo se encuentran en la necrópolis del resto.

Para poder establecer si existen diferencias genéticas entre los individuos con presencia/ausencia de ajuar y presencia/ausencia de cobertura de la fosa, hemos realizado un test exacto de diferenciación poblacional teniendo en cuenta sus haplotipos mitocondriales (Tabla V.1.3). Los resultados indican que no existen diferencias significativas entre los rasgos comparados, por lo que no parece que estos rasgos culturales sean una manifestación de posibles diferencias biológicas entre estos individuos.

Figura V.1.5. Análisis de Componentes Principales. Se han considerado los haplotipos mitocondriales de los individuos analizados junto con las características culturales que presentan (ajuar, cobertura y lugar de inhumación [necrópolis y poblado]).

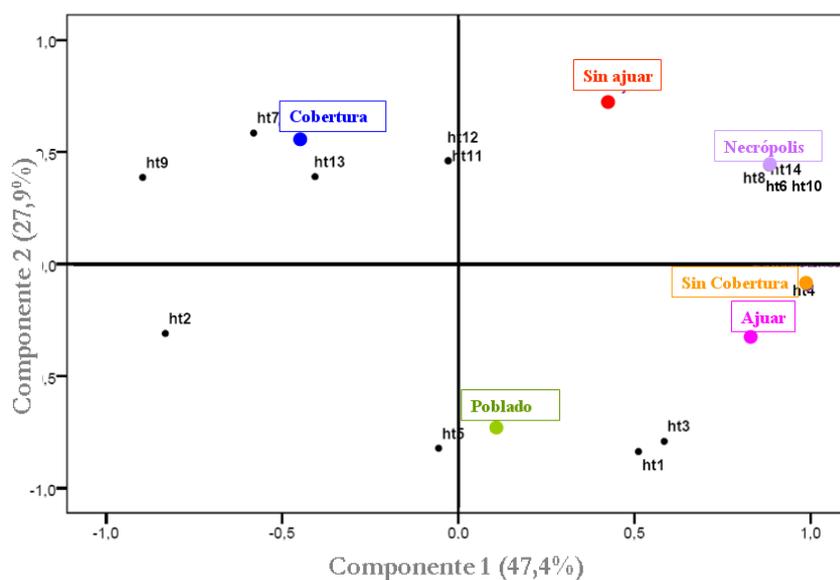


Tabla V.1.3. Valores de P resultantes del test exacto de diferenciación poblacional entre los individuos que presentan ajuar o cobertura de la fosa y los individuos que carecen de ajuar o de cobertura de la fosa. Valor de significación *P<0,008.

| | con ajuar | sin ajuar | con cobertura | sin cobertura |
|---------------|----------------|----------------|----------------|---------------|
| con ajuar | 0 | | | |
| sin ajuar | 0.39706±0.0099 | 0 | | |
| con cobertura | 0.34809±0.0069 | 0.93259±0.0027 | 0 | |
| sin cobertura | 0.99224±0.0008 | 0.76649±0.0056 | 0.06631±0.0019 | 0 |

En el análisis de coordenadas principales, también se han tenido en cuenta el haplotipo mitocondrial y las características culturales asociadas a cada uno de los individuos. Se han analizado 23 individuos pertenecientes a 14 haplotipos mitocondriales, agrupados en ocho categorías culturales ya mencionadas (inhumación en la necrópolis o en el poblado, presencia/ausencia de ajuar y presencia/ausencia de cobertura de la fosa).

En la Figura V.1.6, se representan los resultados obtenidos en el análisis de coordenadas principales, donde podemos observar que este análisis explica el 93% de la variabilidad total, el eje I representa el 54% y el eje II el 39% restante.

En este análisis, se puede diferenciar varias casuísticas. La primera de ellas consiste en la existencia de algunas características culturales que se muestran asociadas a un único haplotipo representado por un único individuo, siendo este el caso de:

- CAS-21, inhumado en el poblado, con ajuar y ausencia de cobertura de la fosa (ht1)
- CAS-148, inhumado en el poblado, sin ajuar y ausencia de cobertura de la fosa (ht5)

- CAS-183, inhumado en la necrópolis, sin ajuar y presencia de cobertura de la fosa (ht9)
- CAS-222, inhumado en la necrópolis, con ajuar y presencia de cobertura de la fosa (ht13)

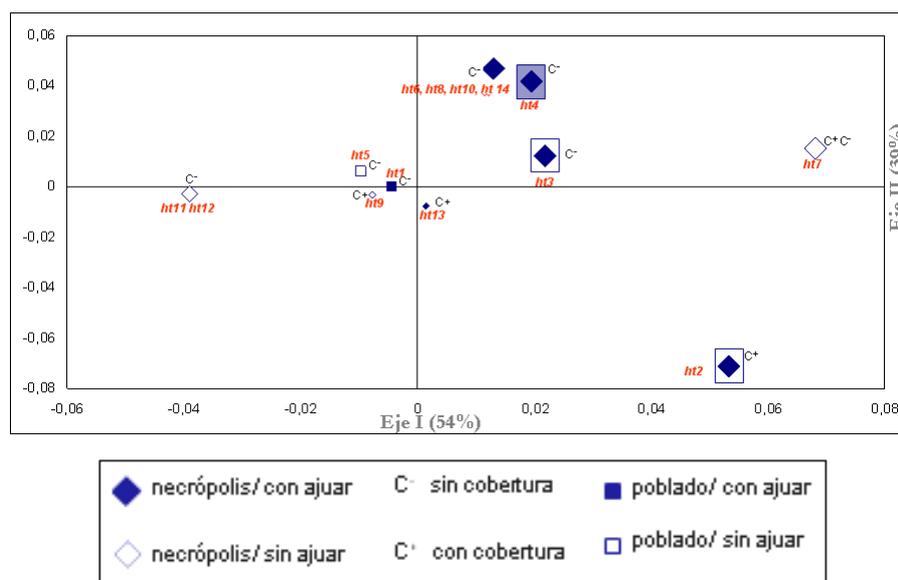
Otra relación que aparece en el análisis de coordenadas principales es la de aquellos individuos que, compartiendo las mismas características culturales, presentan haplotipos mitocondriales diferentes.

Un ejemplo de esta asociación corresponde a los individuos que comparten los haplotipos ht11 y ht12, que se encuentran en la necrópolis y no presentan cobertura ni ajuar asociado a la inhumación. Otro ejemplo, corresponde a los individuos pertenecientes a los haplotipos ht6, ht8, ht10 y ht14, todos ellos se encuentran en la necrópolis, no presentan cobertura, pero en cambio presentan ajuar.

Finalmente, también se pueden encontrar combinaciones de características culturales diferentes asociadas al mismo haplotipo, representado además por más de un individuo; como es el caso de:

- Los individuos que comparten el ht3, que se encuentran tanto en la necrópolis como el poblado, con presencia/ausencia de ajuar y sin cobertura.
- Los individuos que comparten el ht4, que se encuentran tanto en la necrópolis como el poblado, con ajuar y ausencia de cobertura.
- Los individuos que comparten el ht7 que se encuentran en la necrópolis sin ajuar, con presencia/ausencia de cobertura.

Figura V.1.6. Análisis de Coordenadas Principales. Los individuos inhumados en la necrópolis están representados por un rombo y los inhumados en el poblado por un cuadrado, cuyo tamaño es proporcional al número de individuos que los representan. Los símbolos azules corresponden a los individuos que presentan ajuar y los blancos a los que no presentan ajuar. C⁺, presencia de cobertura de la fosa; C⁻, ausencia de cobertura de la fosa.



Si nos centramos en aquellos agrupamientos que presentan un mayor número de individuos, se puede observar: que los haplotipos ht3, ht4, ht8, ht10 y ht14, corresponden a individuos que carecen de cobertura; el ht2 corresponde a individuos con cobertura; y finalmente, el ht7 corresponde a individuos que en algunos casos presentan cobertura y en otros casos no. En las agrupaciones mencionadas, la presencia/ausencia de ajuar y la localización de la inhumación (poblado/necrópolis) no es una característica diferencial de estos linajes mitocondriales.

Por lo tanto, con este análisis confirmamos una de las observaciones realizadas en el análisis de componentes principales (Figura V.1.5), en el

que se mostraba la dualidad de la presencia/ausencia de cobertura de la fosa, siendo independiente la ubicación de los inhumados en la necrópolis o el poblado y la presencia/ausencia de ajuar.

El análisis de coordenadas principales (Figura V.1.6), indica la gran variabilidad de haplotipos mitocondriales asociados a diferentes características culturales, existiendo 10 posibles combinaciones de características culturales asociadas a 14 haplotipos mitocondriales. Asimismo, este análisis pone de manifiesto lo que ya se había observado en el análisis de componentes principales (Figura V.1.5), es decir, la existencia de individuos que compartiendo las mismas características culturales, presentan haplotipos mitocondriales diferentes.

V.1.4. DISCUSIÓN

El yacimiento de Los Cascajos representa un poblado plenamente Neolítico, tanto desde el punto de vista cronológico como cultural, en el cual se han encontrado tanto evidencias del lugar de habitación (cabañas, estructuras de combustión, silos...) (*poblado*), como de la zona de enterramiento (*necrópolis*).

Este yacimiento representa a un poblado de gran extensión, donde se ha practicado un variado ritual funerario durante un largo periodo de tiempo, ya que se han identificado dos fases cronológicas, la Fase I que corresponde al Neolítico Antiguo y la Fase II que corresponde al Neolítico Medio. Teniendo en cuenta las dataciones realizadas, este yacimiento fue utilizado durante un periodo de tiempo de aproximadamente un milenio.

Una característica destacable del yacimiento, es que las inhumaciones se ubican tanto en la necrópolis (donde se encuentran la mayoría de las inhumaciones), como en el poblado (donde las fosas se encuentran dispersas y con una gran distancia entre ellas).

También existe una diferenciación en el tipo de cobertura que presentan las fosas; mientras que unas pocas están cubiertas con una gran losa de arenisca o con tierra compuesta de material pétreo (cereal carbonizado y fragmentos de molinos de mano), la mayoría no presentan ningún tipo de cobertura. Lo mismo ocurre con el ajuar asociado a las inhumaciones, siendo más bien pobre, no siendo generalizada su presencia en las inhumaciones. El ajuar recuperado consiste sobre todo de vasijas de cerámica, molinos de mano, cuchillos de sílex y elementos de adorno (cuentas discordes o colgantes de hueso y concha).

Teniendo en cuenta todas estas evidencias arqueológicas, el estudio de este yacimiento ofrece la oportunidad de analizar las relaciones existentes entre biología y cultura, mediante el análisis del ritual funerario y la constitución genética de los individuos recuperados en este yacimiento del Neolítico Antiguo.

En primer lugar, se ha abordado el estudio antropológico (estimación del sexo y la edad) de los individuos recuperados del yacimiento de Los Cascajos, siendo destacable el hecho de encontrar una gran proporción de individuos de sexo masculino y adultos jóvenes (Figura V.1.1).

Sin embargo, existe una pequeña fracción de individuos subadultos, tanto masculinos como femeninos, inhumados en la necrópolis (CAS-193S, CAS-193I, CAS-203, CAS-204, CAS-206 y CAS-254) (Tabla V.1.1), perteneciendo dos de ellos a una fosa superpuesta (CAS-193S y CAS-193I) y el otro a una fosa adyacente (CAS-203).

Se ha podido determinar el haplotipo mitocondrial en cuatro de estos seis individuos, resultando todos diferentes (ht2, ht11, ht12 y ht4). Cabe destacar que dos subadultos presentan haplotipos que son compartidos con otros individuos adultos, como es el caso del ht4 (CAS-70, CAS-216 y **CAS-254**) y el ht2 (CAS-33, **CAS-193S** y CAS497), lo que podría sugerir algún tipo de relación biosocial entre estos sujetos, no pudiendo generalizar este hecho a todos los individuos subadultos recuperados.

En el análisis molecular realizado en los restos humanos recuperados de Los Cascajos, se han obtenido resultados positivos en 23 individuos, que se han clasificado en 14 haplotipos mitocondriales diferentes. Dos haplotipos son exclusivos de los inhumados en el poblado (ht1 y ht5), nueve de la necrópolis (ht6 al ht14) y tres haplotipos están compartidos entre individuos de la necrópolis y el poblado (ht2, ht3 y ht4). De los 14 haplotipos resultantes, cinco se presentan en más de un individuo cada uno (ht2, ht3, ht4, ht7 y ht10) y el resto, nueve, son haplotipos únicos, es decir sólo se ha encontrado un individuo perteneciente a cada uno de estos nueve haplotipos en este yacimiento.

De los cinco haplotipos compartidos por más de un individuo, **hay tres haplotipos comunes a individuos de la necrópolis y el poblado (ht2, ht3 y ht4)** y únicamente dos están presentes solo en la necrópolis (ht7y ht10).

El **ht2** se ha encontrado en tres individuos (CAS-33, CAS-193S, CAS-497), cuya única característica cultural común es la presencia de cobertura, tanto de tierra con restos de material pétreo, como de una losa de arenisca. Este haplotipo presenta una elevada frecuencia en la población europea actual (RICHARDS *et al.*, 2000; ACHILLI *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2008); por tanto, resulta difícil establecer, la existencia de una relación biológica vía materna entre estos individuos, ya que la probabilidad de encontrar dos individuos con el mismo haplotipo mitocondrial y que no estén emparentados es inversamente proporcional a la frecuencia del haplotipo.

Además, esta característica cultural (cobertura de la fosa) no es exclusiva del ht2, ya que también se encuentra en individuos que presentan otros haplotipos. Por otro lado, estos datos indican que algunas características culturales (como la cobertura de la fosa), estaban vigentes durante el milenio de uso del poblado, ya que estos individuos pertenecen a diferentes fases cronológicas, dos individuos a la Fase II (CAS-33 y CAS-193S) y uno a la Fase I (CAS-497) (Tabla V.1.1). Asimismo, estos datos parecen indicar que en la misma época (Fase II), existían diversas prácticas funerarias (inhumaciones en la necrópolis o en el poblado y presentar tierra o una losa de arenisca cubriendo la fosa).

El ht3 está presente en tres individuos masculinos (CAS-48.1, CAS-90 y CAS-196), cuya característica cultural común es la ausencia de cobertura. La baja frecuencia del ht3 en la población europea (0,5-3,1%) (MACAULAY *et al.*, 1999; SALAS *et al.*, 1998; FINILLA *et al.*, 2001), hace más factible establecer la existencia de una relación biológica entre estos individuos.

En cuanto al patrón de enterramiento de los individuos pertenecientes al ht3, no es homogéneo, ya que estos individuos presentan más características culturales diferentes que comunes, por lo que no podemos afirmar que exista una correlación entre el linaje ht3 y algunas de las características culturales presentes en los individuos portadores de estos linajes.

El ht4, está presente en tres individuos, que como en el caso anterior, presentan en común la ausencia de cobertura (CAS-70, CAS-216, CAS-254). El ht4 presenta una frecuencia en gradiente en las poblaciones actuales, teniendo las poblaciones del Próximo Oriente, los valores mas elevados, disminuyendo hacia las poblaciones del suroeste de Europa (7-20%) (RICHARDS *et al.*, 2000; ACHILLI *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2008).

Así, asumiendo que estos individuos presentan en común la ausencia de cobertura y el haplotipo mitocondrial, y teniendo en cuenta la frecuencia en la población europea actual, no resulta fácil establecer, la existencia de una relación biológica entre estos individuos. En cuanto al ritual de enterramiento, los individuos que comparten el ht4 presentan gran número de diferencias a nivel cultural, por lo tanto, no encontramos

correspondencia entre el componente biológico y el cultural, ya que los individuos que portan el ht4, presentan un ritual de enterramiento heterogéneo.

Otros haplotipos presentes en más de un individuo en este yacimiento son el ht7 y ht10, siendo además exclusivos de individuos enterrados en la necrópolis. Los individuos CAS-181, CAS-191 y CAS-202, tienen en común la ausencia de ajuar y la pertenencia al **ht7**. Aunque estos individuos presentan varias características de enterramiento comunes, dada la frecuencia del ht7 en la población europea actual (6%), (ACHILLI *et al.*, 2005), no podemos establecer una relación biológica entre estos individuos.

El ht10 es asimismo, otro caso de haplotipo exclusivo de dos individuos ubicados en la necrópolis (CAS-194 y CAS-341). Éstos tienen en común, además, la presencia de molinos de mano, una orientación hacia poniente y la posición hacia un costado. Teniendo en cuenta que este haplotipo presenta una frecuencia baja o nula en la población actual y que los individuos pertenecientes a este haplotipo, presentan unas características culturales comunes, éste puede ser un caso de ritual funerario asociado a una relación biológica.

Por lo tanto, teniendo en cuenta los haplotipos que se encuentran compartidos por más de un individuo y las características culturales que presentan los mismos, observamos que en su mayoría, no existe una correlación entre la composición biológica y el ritual de enterramiento.

Sin embargo, si podemos observar que algunas de las características culturales (como la cobertura de la fosa) estaban vigentes en el yacimiento durante todo el periodo de uso del poblado, aproximadamente un milenio. Es decir, que individuos que pertenecen a diferentes fases cronológicas, presentan la misma característica cultural.

La diversidad genética obtenida en el yacimiento de Los Cascajos ($0,9486 \pm 0,0248$; 14 haplotipos de 23 individuos analizado), no parece apoyar la hipótesis de que este yacimiento represente a una población aislada y de tamaño efectivo reducido, ya que en este caso la endogamia hubiera producido un aumento en la frecuencia de determinados linajes.

La variabilidad genética hallada en este yacimiento se ha agrupado en cuatro haplogrupos mitocondriales caucasoides, H, U, K y J, tres de ellos (H, U y K) son los más frecuentes en la población europea actual y presentan edades de coalescencia desde 25.000-20.000 años en el caso del haplogrupo U, hasta 17.500-13.500 años en el caso del haplogrupo K (RICHARDS *et al.*, 2000). Teniendo en cuenta los datos de coalescencia, parece coherente su presencia en este yacimiento, ya que se trata de un poblado del Neolítico Antiguo.

Una mención especial requiere el haplogrupo J, presente en dos individuos de este yacimiento. Dada, la edad de coalescencia obtenida para dicho haplogrupo (8.000-10.000 años), RICHARDS *et al.* (1996, 1998, 2000) y TORRONI *et al.* (1996) han propuesto que este haplogrupo sería el marcador de la introducción en Europa de los agricultores neolíticos desde el Próximo Oriente.

Según este planteamiento, la presencia de este haplogrupo en la población de Los Cascajos confirmaría la existencia de flujo génico de los agricultores neolíticos del Próximo Oriente en etapas temprana del neolítico en la Península Ibérica.

El hecho de que este yacimiento presente dos ubicaciones para las inhumaciones, nos hizo plantear la posible existencia de una diferenciación genética entre los individuos enterrados en la necrópolis y en el poblado. Sin embargo, los resultados del test exacto de diferenciación poblacional, basado en la localización de los enterramientos y los haplotipos mitocondriales que presentan, no muestran diferencias estadísticamente significativas.

Tampoco existe una diferenciación cultural, ya que las características culturales (tipo de ajuar, cobertura, fase cronológica, orientación y posición del inhumado), son comunes tanto en los individuos recuperados de la necrópolis como del poblado.

Un caso particular de inhumaciones en la necrópolis, es la presencia de cuatro **fosas reutilizadas**. El hecho de que cuatro individuos (CAS-33, CAS-193, CAS-216 y CAS-222) se encuentren inhumados en fosas reutilizadas no puede explicarse por medio de evidencias culturales ni genéticas, dado que presentan más características diferentes que comunes, tanto culturales como genéticas, entre los individuos recuperados de estas fosas reutilizadas.

Otro caso que cabe mencionar, es la presencia en la necrópolis de dos tipos particulares de **fosas asociadas**: las **fosas adyacentes** (CAS-202/CAS-203 y CAS-257/CAS-258) y la **fosa superpuesta** (CAS-193S/CAS-193I). Puesto que de la fosa adyacente CAS-257/CAS-258 solo se ha obtenido resultado molecular reproducible en un solo individuo (CAS-258, ht14), no es posible discutir sobre las relaciones biológicas entre estos dos individuos.

Sin embargo, en los inhumados CAS-202/CAS-203, se han podido determinar los linajes mitocondriales de ambos individuos, siendo éstos diferentes (ht7 y ht11, respectivamente), lo que permite descartar una relación de parentesco materno entre estos individuos. Pero no podríamos descartar, dada la edad y sexo (masculino adulto joven, y femenino juvenil) que haya otro tipo de relación biológica o social entre ellos y que se pueda explicar con otro tipo de marcadores genéticos, como por ejemplo, el cromosoma Y, siendo el análisis de este marcador muy complejo en las muestras de ADN.

En el caso de la **fosa superpuesta** (CAS-193S y CAS-193I), solo se ha podido obtener el linaje mitocondrial de uno de los individuos, el CAS-193S (ht2). Sin embargo, el hecho de que sea la única estructura superpuesta recuperada en este yacimiento, y que ha transcurrido aproximadamente un milenio entre los dos inhumados y que además comparten diversas características culturales (edad, sexo, ajuar y cobertura), pudiera tener algún significado a nivel del ritual de enterramiento.

A pesar de haber intentado, por todos los medios, obtener resultados positivos en el individuo CAS- 193I, no ha sido posible, lo que impide, por ahora, indagar sobre cualquier significado que pueda tener este enterramiento.

En estos dos tipos de asociación de fosas, las adyacentes y la superpuesta, aunque no haya sido posible obtener datos genéticos de todos los inhumados, podemos destacar dos hechos: 1) en el caso de la fosa adyacente CAS-257/CAS-258, se trata de dos de las cuatro mujeres jóvenes existentes en el yacimiento y 2) en el caso de la fosa superpuesta CAS-193S/CAS193I, se trata de dos de los cinco individuos subadultos del yacimiento. Podría plantearse que la coincidencia de que dos mujeres y dos subadultos aparezcan en sendas fosas asociadas, no sea fruto del azar. Sin embargo, la imposibilidad de obtener resultados a nivel molecular en estos individuos, nos impide indagar en este hecho. Por tanto, no tenemos evidencias de diferenciación social ni biológica en los inhumados de las fosas asociadas respecto a las otras inhumaciones del yacimiento.

La casuística de las características culturales asociadas a los individuos de Los Cascajos es muy diversa, encontrándose individuos: con ajuar y cobertura de la fosa, con ajuar y sin cobertura, sin ajuar y con cobertura y sin ajuar ni cobertura. Los haplotipos mitocondriales de estas agrupaciones son también muy diversos (Tabla V.1.1 y Figura V.1.3). Al comparar mediante el test exacto de diferenciación poblacional los haplotipos mitocondriales de estos grupos (Tabla V.1.3), no

encontramos diferencias estadísticamente significativas, por lo que los rasgos culturales no parece que impliquen una diferenciación biológica.

Al comparar, mediante el test de diferenciación poblacional las ocho diferentes combinaciones de características culturales (lugar de enterramiento, ajuar y cobertura de la fosa) (Tabla V.1.2), tampoco se observan diferencias estadísticamente significativas entre los agrupamientos resultantes, ya que existen linajes mitocondriales comunes en cada una de las categorías, lo que no parece apoyar la idea de diferencias genéticas en los grupos definidos por sus características culturales.

A partir de las características de enterramiento que definen a las inhumaciones de este yacimiento y los haplotipos mitocondriales resultantes, se ha realizado un análisis de componentes principales (Figura V.1.5) y otro de coordenadas principales (Figura V.1.6), que han permitido representar **la relación entre características culturales y composición biológica de los inhumados**. Ambos análisis ponen de manifiesto la existencia de una gran variabilidad, tanto cultural como genética, ya que en un gran número de casos, encontramos que un único haplotipo mitocondrial representa de forma específica una combinación de variables culturales únicas y a su vez diferentes a otro haplotipo.

En el análisis de componentes principales (Figura V.1.5), observamos que el primer componente representa la dualidad “presencia/ausencia de cobertura de la fosa”, siendo secundario la ubicación del enterramiento en la necrópolis o el poblado y la presencia/ausencia de ajuar.

Esta dualidad puede que se fundamente en alguna característica biológica, ya que los linajes mitocondriales de los individuos con cobertura, no se repiten en los individuos sin cobertura y viceversa. Aunque, esta diferenciación no es estadísticamente significativa (Tabla V.1.3).

Por otro lado, el segundo componente establece una diferenciación entre los haplotipos exclusivos de la necrópolis y el resto. Sin embargo, no se encuentran diferencias estadísticamente significativas en el test exacto de diferenciación poblacional, en el que se han tenido en cuenta las características culturales y genéticas de los inhumados en la necrópolis y el poblado (Tabla V.1.2).

Además, dado que no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los haplotipos del poblado y los de la necrópolis, la diferenciación mostrada por el segundo componente se podría atribuir a diferencias en el tamaño muestral (9 haplotipos exclusivos de la necrópolis y 2 haplotipos exclusivos del poblado).

En este análisis de componentes principales, observamos que individuos que presentan características culturales comunes (que podrían relacionarse con factores sociales o biológicos), presentan una gran diversidad a nivel de ADNmt. Un ejemplo, es el caso de los individuos “inhumados en la necrópolis, con ajuar y sin cobertura en la fosa” (características recogidas en la llamada categoría 6), que presentan los haplotipos ht4, ht6, ht8, ht10 y ht14. Estos resultados permiten

desestimar la influencia de factores biológicos en el ritual de enterramiento.

El análisis de coordenadas principales pone de manifiesto lo ya observado en el análisis de componentes principales, es decir, la existencia de individuos que compartiendo las mismas características culturales, presentan haplotipos mitocondriales diferentes. Este es el caso de dos agrupaciones que se observan en la Figura V.1.6, uno de los grupos, corresponde a dos individuos subadultos (CAS-203 y CAS-204) que presentan los ht11 y ht12, ambos inhumados en la necrópolis, sin ajuar ni cobertura. Y el otro caso, lo constituyen cinco individuos (CAS-179, CAS-182, CAS-194, CAS-258 y CAS-341) que se encuentran inhumados en la necrópolis, con ajuar y sin cobertura, y que también presentan haplotipos mitocondriales diferentes (ht6, ht8, ht10 y ht14). Estos dos casos corroboran la existencia de individuos que presentan características culturales o sociales comunes, aunque no existe una relación biológica entre ellos (a través del ADNmt).

En el yacimiento de Los Cascajos no se encuentra una relación entre el ritual funerario y los datos del ADNmt obtenidos, siendo el hecho de presentar cobertura de la fosa el rasgo diferencial más destacable, ya que el hecho de inhumarse en la necrópolis o el poblado y la presencia/ausencia de ajuar diferenciado resulta ser secundario. El hecho de que exista esta dualidad “presencia/ausencia de cobertura en las fosas” nos hizo pensar en una diferenciación genética de los individuos que presentan cobertura de la fosa, respecto a los que no la tienen.

Sin embargo, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas al comparar la distribución de los haplotipos mitocondriales. Por lo tanto, con los datos recuperados en este yacimiento, creemos que esta diferenciación cultural no se corresponde con una diferenciación biológica.

El yacimiento de Los Cascajos corresponde al Neolítico antiguo aunque no a su fase inicial y sus características culturales indican un modelo de vida plenamente neolítico, supuestamente acompañado de cierta complejidad social. Sin embargo, el análisis realizado, en el que hemos considerado de forma conjunta los datos funerarios y genéticos, nos indica una ausencia de estratificación social. La cronología neolítica antigua del yacimiento junto con su vigencia durante aproximadamente un milenio, permiten pensar que las innovaciones culturales más propias de este periodo, podrían constituir el germen de un proceso de diferenciación social en el grupo humano que habitó en Los Cascajos. Sin embargo, el presente estudio no apoya esta idea y por tanto cuestiona los planteamientos que asocian la neolitización con el origen de la complejidad social de los grupos humanos (ALDAY *et al* 2009; GARCÍA-MARTINEZ, 2008; BLASCO, 1996; AGUADO, 2001).

V.2.

EL YACIMIENTO NEOLÍTICO DE
PATERNANBIDEA (IBERO, NAVARRA)

V.2.1. INTRODUCCIÓN

En la presente tesis doctoral, al igual que en el yacimiento de Los Cascajos (Apartado V.1), también se aborda el análisis morfológico y genético de los restos óseos y dentarios recuperados de otro yacimiento neolítico de Navarra, el yacimiento de Paternanbidea (Ibero, Navarra; 6.090 ± 40 - 5.960 ± 40 años BP). Este yacimiento es excepcional, ya que aunque no se han recuperado evidencias de prácticas ganaderas y agrícolas, se han encontrado cerámicas y ajuares propios de la época neolítica. Asimismo en este yacimiento se ha localizado un espacio funerario, con un ritual de enterramiento excepcional en Europa occidental, con la presencia de enterramientos dobles y múltiples, siendo éstos simultáneos o acumulativos (GARCÍA-GAZÓLAZ, 1998; GARCÍA-GAZÓLAZ y SESMA, 2007b).

Paternanbidea es un yacimiento al aire libre, ubicado en el suroeste de la gran cubeta sedimentaria que configura la unidad geográfica conocida como *Cuenca de Pamplona* (Figura I.1). Todo el registro arqueológico reconocido hasta la fecha se localiza exactamente sobre el tercer nivel de terraza conformada por el río Arga, que atraviesa la citada cuenca de noreste a suroeste. Estas amplias plataformas elevadas sobre el río han sido densamente ocupadas a lo largo de toda la prehistoria, reconociéndose una densa red de asentamientos, especialmente entre el Neolítico y la Edad del Bronce (GARCÍA-GAZÓLAZ, 1998).

La excavación fue realizada en dos campañas durante el año 1997, ambas dirigidas por J. García Gazólaz. La información proveniente de las evidencias arqueológicas recuperadas en este yacimiento, muestra la

presencia de cuatro fosas muy próximas entre si (Figura III.3); tres corresponden a enterramientos dobles (fosa 2, 3 y 4), mientras que la cuarta, pertenece a un enterramiento múltiple (fosa 1), con al menos cinco individuos inhumados en ella, según el informe arqueológico. A continuación se detallan las evidencias arqueológicas correspondientes a cada una de las fosas, las cuales presentan una característica común, las fosas presentan una morfología elíptica e irregular (GARCÍA-GAZÓLAZ, 1998; GARCÍA-GAZÓLAZ y SESMA, 2007b).

El registro arqueológico recuperado en el interior de la **fosa 1**, se presenta en cuatro conjuntos bien definidos (GARCÍA-GAZÓLAZ, 1998; GARCÍA-GAZÓLAZ y SESMA, 2007b):

- Individuo PAT-1E2, presenta la cabeza girada hacia la izquierda, siendo la orientación del tronco NW-SE.
- Individuos PAT-1E3, PAT-1E4 y PAT-1E5, representados todos ellos por el cráneo y formando un conjunto aislado.
- Individuo PAT-1E7, aparece muy mal conservado y situado sobre una pequeña “bandeja” formada por dos lajas de arenisca fragmentadas.
- Por ultimo, existe una zona denominada “Área H”, que hace referencia a un espacio intermedio entre el individuo PAT-1E2 y los cráneos de los individuos PAT-1E3, PAT-1E4 y PAT-1E5, dónde se han recuperado una amalgama de restos óseos en deficiente estado de conservación y con conexiones anatómicas muy parciales (PAT-1E1; PAT-1E6).

La compleja disposición de los restos óseos en esta fosa, es suficiente para asignar el carácter acumulativo múltiple de este enterramiento. Sin duda, este enterramiento, debió reutilizarse en diversas ocasiones, probablemente tanto para alojar nuevos restos, como para trasladar otros a nuevas ubicaciones.

En esta fosa, asimismo, cabe destacar el ajuar recuperado, tanto por su número como por su variedad. Sin embargo, las diferentes aperturas de la tumba han hecho imposible asignar los diferentes elementos a individuos concretos. El hecho de que la mayor parte son elementos de adorno personal y en algún caso incluso aparecen haces de cuentas, nos sugiere que fueron usados (como collares o pulseras) por alguno de los individuos, y que tras las modificaciones provocadas por las reutilizaciones quedaron dentro de la fosa pero, en gran medida, desarticulados (GARCÍA-GAZÓLAZ y SESMA, 2007b). Son seis los tipos de cuentas y/o colgantes identificados en esta fosa:

- colgantes de morfología pseudotriangular
- cuentas de morfología circular de hueso, piedra y concha
- dentalia, dos colgantes en piedra caliza de sección casi cuadrada,
- un colgante de morfología triangular formado sobre una pieza verde del tipo a la variscita
- un tubo de hueso.

Los últimos tres tipos de cuentas o colgantes mencionados, se encuentra asociados al individuo PAT-1E7. Siendo este el único caso, en el que se asocia el ajuar, presente en esta fosa, a los restos de un individuo.

Además, en esta fosa se ha recuperado un candil de asta de ciervo, localizado sobre el cráneo del individuo PAT-1E2, perfectamente adaptado a la curvatura de la cabeza (propio de la época mesolítica).

La **fosa 2**, presenta en su interior y sobre el fondo, a dos individuos en conexión anatómica, bien conservados y representados. El individuo, PAT-2E1, se presenta en posición decúbito supino, con las extremidades inferiores ligeramente flexionadas y las superiores dispuestas a lo largo del cuerpo. La mano izquierda se encuentra colocada sobre el lado izquierdo del área pélvica y, la derecha, bajo el coxal derecho. La cabeza apoyada sobre el lado izquierdo y la orientación del tronco es E-W. El otro individuo, denominado PAT-2E2, se presenta apoyado sobre el lado derecho y sus piernas aparecen flexionadas, al igual que el brazo izquierdo. La cabeza se apoya sobre el lado derecho y la orientación del tronco es NE-SW.

La ausencia de desplazamientos que indiquen movimientos postdeposicionales y la disposición de los esqueletos encarados el uno frente al otro (el individuo PAT-2E2 con la cabeza casi apoyada sobre el hombro izquierdo del individuo PAT-2E1), contribuyen a pensar que fueron inhumados en un solo acto y sin intervalo de tiempo entre uno y otro enterramiento. Tratándose, así, de un enterramiento doble simultáneo.

El ajuar identificado en esta fosa, lo forman elementos bien diferenciados: un collar, una pulsera, dos segmentos de círculo de retoque en doble bisel y una lámina de sílex, asociados todos ellos al

individuo PAT-2E1, y finalmente, una vasija de cerámica manufacturada asociada al individuo PAT-2E2. Las materias primas utilizadas para la manufactura de estos ajuares, son variadas: hueso, piedra y concha. Aunque es destacable el uso de una piedra de color verde del tipo de la variscita. Completa el conjunto un cuenco hemisférico muy deteriorado que presenta una pequeña asa de cinta junto al borde, y a ambos lados de la misma una decoración impresa a base de tres círculos concéntricos. Por lo que se refiere a la disposición de todo este ajuar, hay que destacar que el adorno personal aparece asociado al individuo PAT-2E1, el collar, lógicamente, al cuello y la pulsera sobre la muñeca derecha. La vasija, en cambio, aparece depositada sobre el costado izquierdo del individuo PAT-2E2 (GARCÍA-GAZÓLAZ, 1998; GARCÍA-GAZÓLAZ y SESMA, 2007b).

En la *fosa 3* se encuentran inhumados dos individuos en desigual grado de conservación. Uno de los individuos, PAT-3E1, aparece en posición flexionada sobre el costado izquierdo y la orientación del tronco es E-W. El otro individuo, PAT-3E2, está representado por escasos restos óseos. El alto grado de desplazamiento que presentan los restos del individuo PAT-3E2, incluida la desaparición de determinadas partes esqueléticas, invitan a pensar en una reapertura de la fosa para alojar al individuo PAT-3E1. Esta remoción, que con todo no llegó a alterar algunas conexiones anatómicas (parte de la columna vertebral, uno de los brazos, etc.), supone que no debió transcurrir demasiado tiempo entre ambas inhumaciones, por ello, la fosa 3 se considera una fosa doble acumulativa (GARCÍA-GAZÓLAZ, 1998; GARCÍA-GAZÓLAZ y SESMA, 2007b).

En este caso (fosa 3), el ajuar lo componen cuatro segmentos de círculo de retoque en doble bisel y una pequeña lamina de cristal de roca. Todas estas piezas se asocian al individuo PAT-3E2, aunque su disposición original ha podido verse alterada por la reutilización de la fosa, coincidiendo con la inhumación del individuo PAT-3E1 (GARCÍA-GAZÓLAZ, 1998, 2007b).

Por ultimo la **fosa 4**, se caracteriza por presentar en su interior dos individuos en conexión anatómica, bien conservados y representados. El individuo PAT-4E1, presenta el tronco en posición decúbiteo supino, con las extremidades inferiores plegadas y apoyadas sobre el lado izquierdo. El brazo izquierdo se dispone a lo largo del cuerpo y el derecho flexionado sobre el tórax. La cabeza se apoya en el lado izquierdo. La orientación del tronco es SE-NW. El Individuo PAT-4E2, presenta una complexión grácil. Aparece decúbiteo supino, con las piernas flexionadas y el brazo derecho hiperflexionado hacia el hombro, con una orientación del tronco E-W. La ausencia de desplazamientos que indiquen movimientos postdeposicionales, la disposición de los esqueletos encarados el uno frente al otro y la situación ajustada de las extremidades, contribuyen a pensar que fueron inhumados en un solo acto y sin intervalo de tiempo. Por tanto, se puede reafirmar que se trata de un enterramiento doble simultáneo ((GARCÍA-GAZÓLAZ, 1998; GARCÍA-GAZÓLAZ y SESMA, 2007b).

El ajuar asociado a las inhumaciones de la fosa 4, está compuesto por un elemento de hoz sobre lámina, un prisma de cristal de roca y seis segmentos de círculo de retoque en doble bisel (puntas de flecha).

La mayor parte de estos elementos se asocian al individuo PAT-4E1, salvo uno de los segmentos y más claramente el prisma de cristal de roca, que se ubica bajo la pelvis del individuo PAT-4E2.

Las cuatro fosas forman un conjunto uniforme, ya que se encuentran en un espacio de unos 50 m² (Figura III.3), al noroeste del área excavada (2500 m²) y separados del resto de estructuras de habitación. En este sentido, podemos hablar de una necrópolis o espacio funerario, aunque se desconoce la conexión de estas tumbas con el resto de estructuras contemporáneas existentes en el yacimiento. La enorme cantidad de industria lítica recuperada en prospección, en parte de clara cronología neolítica, invita a pensar en la existencia de otras estructuras de habitación datables en una fase antigua del Neolítico, que deben ubicarse fuera de la zona de excavación (GARCÍA-GAZÓLAZ, 1998; GARCÍA-GAZÓLAZ y SESMA, 2007b).

El hallazgo tanto de enterramientos dobles simultáneos, como de fosas acumulativas múltiples, resulta excepcional en este yacimiento arqueológico datado en el Neolítico antiguo. De hecho, si se comparan estos datos con los que ofrece la necrópolis de Los Cascajos, no se encuentran similitudes en este sentido.

La riqueza de los ajuares también contrasta con el caso de Los Cascajos, dónde no se ha encontrado ajuar tan frecuente ni tan abundante. Llama especialmente la atención el elevado número de elementos de adorno personal, en ocasiones elaborados sobre materiales de procedencia lejana, como es el caso de los colgantes sobre concha (de origen marino) o de

los fabricados sobre piedra verde (probablemente variscita). El origen de este mineral pudo estar en las minas neolíticas de Can Tintorer (Gavà, Baix Llobregat) (VILLALBA *et al.*, 1995), ya que se ha encontrado este tipo de mineral en Huesca y Burgos. Sin embargo, también existe una mina neolítica, Palazuelo de las Cuevas, en Zamora (ARRIBAS, 1971), de la que pudo proceder este mineral. La datación de este mineral en el yacimiento de Paternanbidea indica una antigüedad mayor que la de las minas citadas (GARCÍA-GAZÓLAZ y SESMA, comunicación personal).

El hecho de encontrarse este tipo de mineral en dos individuos (PAT-1E1 y PAT-2E1) inhumados en fosas diferentes (fosas 1 y 2), junto con la abundancia de adornos personales en los inhumados de las fosas 1 y 2, puede ser un reflejo de la diferenciación social que pudo existir entre los habitantes de este yacimiento neolítico (BLASCO *et al.*, 1995). Los individuos del resto de las fosas llevan asociados únicamente ajuares del tipo de puntas de flechas.

Por todo ello, los enterramientos de Paternanbidea se consideran un hecho insólito dentro del mundo funerario conocido para el Neolítico antiguo peninsular. Es difícil, ante las evidencias arqueológicas mostradas, dilucidar si estamos ante unos modos funerarios excepcionales, por ejemplo el caso de las tumbas simultáneas, producto de circunstancias muy particulares o bien si forman parte de las costumbres habituales de las primeras comunidades campesinas en estas latitudes.

En este sentido, hay que tener en cuenta que en el poblado de Los Cascajos, siendo el referente más cercano y mejor conocido, el ritual funerario observado es diferente.

El yacimiento de Paternanbidea aumenta la complejidad del mundo funerario Neolítico, en contraste con el del Mesolítico. Ambos presentan un ritual básico común, la inhumación individual en fosa, pero en el caso del Neolítico se observan variantes, que milenios después, se convertirán en predominantes, como es el caso de las tumbas colectivas acumulativas, presentes a partir del Calcolítico en Navarra.

Asimismo, el objetivo de este estudio es el de evaluar, mediante datos antropológicos y moleculares, las interpretaciones generadas a partir de los datos arqueológicos recuperados en este yacimiento.

Las características de los enterramientos de las poblaciones humanas del pasado, nos permite inferir los aspectos sociales y biológicos de las sociedades que las representaban, ya que la variabilidad de las prácticas funerarias depende de numerosos factores, tanto económicos, sociales como culturales, entre otros (WARSON, 1994). Así, el estudio de los aspectos funerarios en el contexto de variabilidad biológica, puede permitirnos llegar a una mejor comprensión de la estructura social y el comportamiento biológico de las poblaciones que vivieron en el pasado (ALZUALDE *et al.*, 2005, 2006, 2007; CASAS *et al.*, 2006; FERNÁNDEZ *et al.*, 2008; IZAGIRRE *et al.*, 1999; 2005; FREGEL *et al.*, 2009a, 2009b; GUIMARAES *et al.*, 2009; VERNESI *et al.*, 2004).

Las evidencias arqueológicas recuperadas en este yacimiento, sugieren que la agrupación de individuos en fosas diferenciadas y con distintos tipos de ajuar, podría responder a factores sociales y/o biológicos, lo que nos permitiría ahondar en la interpretación del comportamiento biosocial de los habitantes de este yacimiento neolítico del Alto Valle del Ebro. Para ello se ha realizado un análisis conjunto de los datos demográficos, genéticos y culturales.

V.2.2. MATERIAL Y MÉTODOS

El yacimiento neolítico de Paternanbidea (Ibero, Navarra) (6.090 ± 40 años BP y 5.960 ± 40 años BP) (Figura III.1), nos ha proporcionado un número mínimo de 11 individuos (GARCÍA-GAZÓLAZ, 1998; GARCÍA-GAZÓLAZ y SESMA, 2007b), siendo 9 los individuos en los que se ha llevado a cabo el análisis genético.

La estimación del sexo y edad se ha llevado a cabo mediante los criterios morfológicos habituales (WHITE *et al.*, 2005). La estimación del sexo se ha realizado mediante la morfología de la pelvis, ya que incluso en restos fragmentarios es posible identificar porciones con dimorfismo sexual. Los restos craneales, en caso de existir, se utilizaron para verificar el diagnóstico. La estimación de la edad de los individuos adultos se ha realizado utilizando los cambios degenerativos de las superficies articulares (sínfisis púbica y articulación sacro-ilíaca), la obliteración de las suturas craneales y el desgaste dentario. La edad de los subadultos se ha estimado mediante la calcificación y erupción dentarias y mediante el desarrollo y fusión de los centros de osificación.

En el análisis molecular realizado, hemos seguido un estricto criterio de selección de piezas dentarias (sin caries, ni fisuras). Siempre que ha sido posible, se ha tomado más de un diente por individuo, pudiendo reunir 24 piezas dentarias correspondientes a 9 individuos, permitiéndonos realizar el análisis por duplicado y realizar, la replicación de los mismos en un laboratorio independiente. El protocolo seguido tanto para la selección, limpieza de las muestras, así como la extracción de ADN y el análisis del ADNmt se indica en el apartado IV.1 de la presente tesis doctoral.

Asimismo, se han llevado a cabo los criterios de autenticación propuestos para los estudios de ADN_a, enumerados en el apartado IV.1.6. Se han realizado los controles oportunos tanto durante la extracción del ADN (*blanco de la extracción*, control sometido a todo el proceso de la extracción, pero al que no se le ha añadido tejido), como durante la amplificación de las muestras (*control negativo de la PCR*, muestra a la que se le han añadido todo los reactivos necesarios para la amplificación, excepto el ADN).

Se ha cuantificado el número de moléculas molde presentes en el extracto mediante PCR cuantitativa a tiempo real (Tabla V.3.2). También se ha llevado a cabo la duplicación de las muestras en nuestro laboratorio, para ello se han extraído dos muestras del mismo individuo, en dos momentos diferentes de trabajo.

Además, hemos llevado a cabo la clonación de los amplificados de PCR de modo que se puedan distinguir las mutaciones endógenas de la

muestra, de otros cambios producidos por la degradación del ADN o por la contaminación. Finalmente se ha llevado a cabo la replicación de un elevado número de muestras en un laboratorio independiente al nuestro, concretamente en el laboratorio dirigido por Dr. Vicente Cabrera de la Facultad de Biología (área de Genética) de la Universidad de La Laguna (Tenerife).

V.2.3. RESULTADOS

El análisis morfológico de los restos esqueléticos recuperados del yacimiento neolítico de Paternanbidea (Ibero, Navarra), nos ha permitido cuantificar el número mínimo de individuos inhumados en este yacimiento en trece individuos. Siete de ellos en la fosa 1, tratándose de un enterramiento múltiple, donde en el momento de la excavación se describieron cinco individuos. Los individuos restantes (6), se encuentran dispuestos en tres fosas dobles (fosa 2, 3 y 4).

La estimación del sexo se ha realizado en el 77% de los individuos, correspondiendo un 38% al sexo masculino, un 38% al femenino y en el 24% restante no se ha podido llevar a cabo la estimación. La edad se ha estimado en todos los individuos abarcando un amplio rango, desde el primer año de vida hasta la edad adulto-senil, siendo el 50% de los individuos adultos jóvenes (Figura V.2.1).

El estado de conservación de los restos esqueléticos de los individuos recuperados del yacimiento de Paternanbidea, nos ha permitido llevar a cabo el análisis del ADNmt en el 70% de los individuos, habiéndose

verificado los resultados mediante duplicación (consistente en el análisis de dos muestras del mismo individuo, en dos momentos independientes en nuestro laboratorio) en el 88% de los casos. Además, se ha podido realizar en el 33% de las muestras, la replicación en un laboratorio independiente (Dr. Vicente Cabrera de la Facultad de Biología, área de Genética de la Universidad de La Laguna). Finalmente, el 41% de los fragmentos amplificados han sido clonados y posteriormente secuenciados. Todos estos datos han corroborado la secuencia obtenida mediante la secuenciación directa.

Se han obtenido resultados reproducibles en los nueve individuos analizados en el yacimiento de Paternanbidea, habiéndose clasificado la variabilidad mitocondrial en 7 linajes mitocondriales distintos (Tabla V.2.1). Se ha determinado el haplogrupo al que corresponde cada haplotipo resultante mediante la secuencia de HVS-I, la secuencia del fragmento de HVS-II que contiene la posición nucleotídica 73 y los SNPs de la región codificante. Son cinco, los haplogrupos mitocondriales caucásicos (TORRONI *et al.*, 1996) que engloban el total de la variabilidad haplotípica hallada en el yacimiento de Paternanbidea (H, U, K, HV e I) (Tabla V.2.1 y Figura V.2.2), donde tres de ellos son los más frecuentes en las poblaciones europeas actuales (H, U y K). La diversidad genética calculada para estos individuos presenta unos valores elevados ($0,944 \pm 0,0702$).

Figura V.2.1. Distribución del sexo y la edad en el yacimiento neolítico de Paternanbidea.

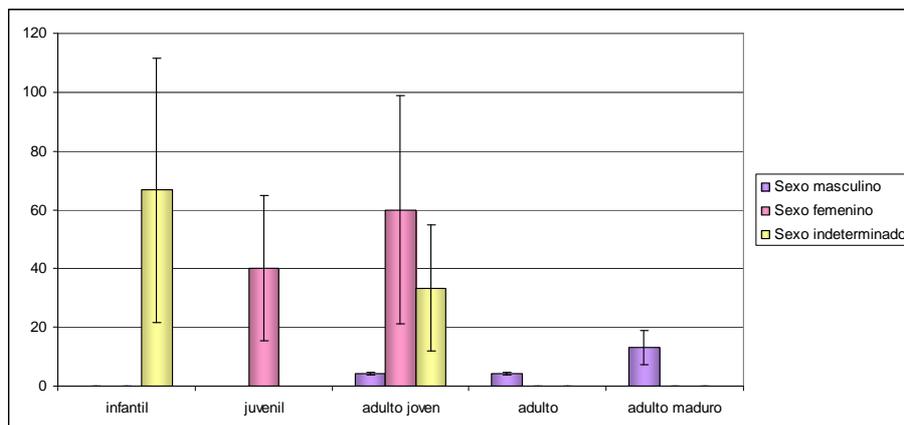


Figura V.2.2. Distribución de las frecuencias relativas de los haplotipos mitocondriales de los individuos recuperados en el yacimiento de Paternanbidea (Ibero, Navarra). Se indica el haplogrupo en el que se clasifican los haplotipos.

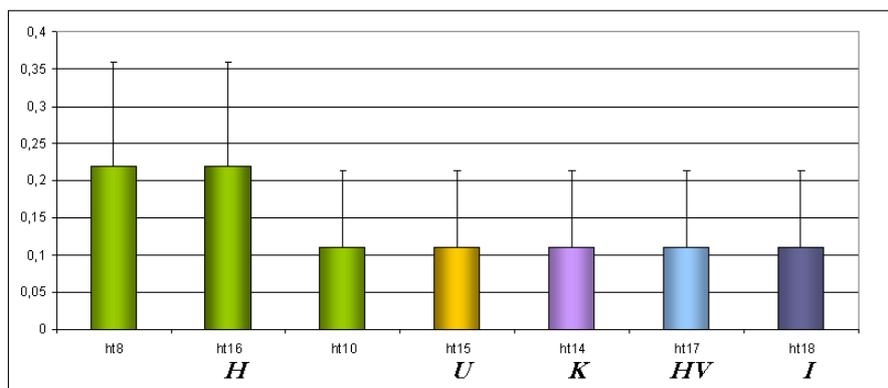


Tabla V.2.1. Relación de individuos analizados en el yacimiento de Paternabidea (Ibero, Navarra) (Neolítico antiguo). Se indican el sexo y edad, así como los haplotipos mitocondriales (HT) definidos por las mutaciones del HVS- I, la posición nucleotídica 73 y los RFLPs de la región codificante. (a: años)

| IND. | FOSA | SEXO | EDAD | HVS I | Nt 73 | RFLPs- región codificante | HT | HG |
|---------|------|------|--------------------------|----------------------|-------|-----------------------------------|------|----|
| PAT-1E1 | 1 | | adulto-joven > (17-20 a) | CRS | G | +7025AluI;+9052HaeII;+12308HinfI | ht15 | U |
| PAT-1E2 | 1 | ♂ | adulto-joven < (17-25 a) | | | | | |
| PAT-1E3 | 1 | ♂ | adulto (40-50 a) | CRS | A | -14766MseI; -7025AluI | ht8 | H |
| PAT-1E4 | 1 | ♀ | adulto-joven (16-21 a) | 16209 | A | -14766MseI;-7025AluI;-6776Tsp509I | ht16 | H3 |
| PAT-1E5 | 1 | | infantil (9-10 a) | 16092-16311 | A | -14766MseI; -7025AluI | ht10 | H |
| PAT-1E6 | 1 | ♂ | adulto-senil | | | | | |
| PAT-1E7 | 1 | | infantil < 1 a | | | | | |
| PAT-2E1 | 2 | ♀? | juvenil (14-16 a) | CRS | A | -14766MseI; -7025AluI | ht8 | H |
| PAT-2E2 | 2 | ♀ | juvenil (15-16 a) | 16092 16224 16311 | G | +7025AluI;+9052HaeII;-12308HinfI | ht14 | K |
| PAT-3E1 | 3 | ♂ | adulto-maduro | | | | | |
| PAT-3E2 | 3 | ♀? | adulto-joven | 16311 | G | +7025AluI; -14766MseI;+4577NlaIII | ht17 | HV |
| PAT-4E1 | 4 | ♂ | adulto-maduro (35-50 a) | 16129-16223 | G | -1715DdeI; +10032AluI | ht18 | I |
| PAT-4E2 | 4 | ♀ | adulto-joven (25-35 a) | 16209 | A | -14766MseI;-7025AluI;-6776Tsp509I | ht16 | H3 |

Cabe destacar la presencia de dos haplotipos mitocondriales (ht8 y ht16), presentes en más de un individuo, pero que se encuentran inhumados en distintas fosas (Tabla V.2.1). Si analizamos la variabilidad genética de los individuos pertenecientes a la misma fosa, observamos que no existe ninguna relación familiar interpretable por los datos del ADNmt, entre estos individuos.

V.2.4. DISCUSIÓN

En el yacimiento neolítico de Paternanbidea, se han encontrado cuatro fosas muy próximas entre sí, donde se localizan al menos trece individuos (según el estudio morfológico). Estas cuatro fosas merecen una mención especial, debido a que se trata de dos fosas dobles simultáneas (fosa 2 y fosa 4) y las dos restantes, serían fosas acumulativas, una doble y otra múltiple. Además, en las fosas 1 y 2, se ha recuperado un ajuar destacable tanto por su significado, como por su variedad y abundancia.

Teniendo en cuenta todas estas evidencias arqueológicas, el estudio de este yacimiento ofrece la oportunidad de analizar las relaciones existentes entre los individuos de las fosas simultáneas o acumulativas, mediante la comparación del ritual funerario y la constitución genética de los individuos de este yacimiento del Neolítico Antiguo de Navarra.

En la **fosa 1**, hay siete individuos, habiéndose estimado el sexo en cuatro de ellos, siendo uno femenino y los otros tres masculinos. En cuanto a la edad, se trata de dos infantiles (uno menor de 1 año de edad y el otro de

9-10 años) y cinco adultos de distintas edades (3 jóvenes, 1 maduro, 1 senil) (Tabla V.2.1). Sobre el significado de este enterramiento múltiple, se plantea la posibilidad de que se trate de miembros de un grupo familiar, dado el perfil demográfico, con un predominio de infantiles y jóvenes (cinco jóvenes, de un total de siete individuos).

Dado que el análisis molecular se centra en el ADNmt, molécula que se hereda vía materna, solo es posible analizar relaciones entre madre e hijos/as, o cualquier otra relación familiar vía materna, pero no el resto de posibles relaciones familiares, para ello se debería realizar el análisis de marcadores genéticos nucleares, análisis complejos en el caso de muestras de ADNn.

En la fosa 1, se han obtenido resultados en cuatro de los siete individuos, quienes representan a cuatro haplotipos diferentes (ht8, ht10, ht15 y ht16). Teniendo en cuenta la edad y sexo estimado en estos cuatro sujetos, no es posible plantear ninguna relación materno-filial. En un sentido más amplio, tampoco podemos decir que exista alguna relación vía materna entre ellos, ya que no se ha obtenido ningún haplotipo mitocondrial común entre los individuos de esta fosa (Tabla V.2.1).

En la **fosa 3**, se han recuperado restos pertenecientes a dos individuos, existiendo evidencias de haber sido reutilizada. Los dos individuos presentan diferente sexo y edad, además, aunque se ha intentado por todos los medios obtener el haplotipo mitocondrial de ambos individuos, solo se han obtenido resultados reproducibles en el individuo PAT-3E2, el cual pertenece al haplotipo ht14 (Tabla V.2.1).

Por lo tanto, no podemos plantear ningún tipo de relación de parentesco materno entre estos individuos.

El caso de las fosas 2 y 4 requiere una mención especial, ya que en cada una de ellas se ha encontrado una pareja de individuos inhumados de forma simultánea, sin evidencia de reutilización. En la **fosa 2**, hay dos sujetos femeninos juveniles con un ajuar diferenciado del resto de individuos del yacimiento: el individuo PAT-2E1 presenta un collar y una pulsera con unos motivos centrales específicos y el individuo PAT-2E2 presenta una vasija de cerámica con decoración impresa. En cuanto al ADNmt, presentan haplotipos diferentes (Tabla V.2.1), por lo que hay que desestimar la posibilidad de parentesco, al menos por vía materna. En la **fosa 4**, se encuentran inhumados un individuo masculino y otro femenino. Los resultados genéticos sugieren la misma conclusión que en el caso de la fosa 2, sin embargo, en este caso no se puede descartar que se trate de una pareja, en el sentido biológico del término, dada la edad y sexo de los inhumados.

Los resultados obtenidos en el análisis del ADNmt de los nueve individuos analizados en el yacimiento de Paternanbidea (Tabla V.2.1), no apoyan la existencia de parentesco vía materna entre los individuos de la misma fosa. Sin embargo, analizando la variación genética del conjunto de la necrópolis, encontramos dos haplotipos (ht8 y ht16) que se presentan cada uno en dos individuos, todos ellos inhumados en fosas diferentes (ht8, en las fosas 1 y 2; ht16, en las fosas 1 y 4). Ambos haplotipos pertenecen al haplogrupo H, siendo este haplogrupo el más frecuente en la población europea actual.

Cabe destacar que el ht16 corresponde al subhaplogrupo H3, el cual representa a una pequeña fracción del haplogrupo H. Las frecuencias más altas del H3 dentro del haplogrupo H, se han obtenido en la Península Ibérica (16%), presentando valores elevados en la población vasca actual (13,9%), seguido de Galicia (8,3%) (ENNAFAA *et al.*, 2009). Sin embargo, en el resto de Europa su frecuencia oscila entre el 0,4-6,2%, con la excepción de Cerdeña (8,5%) (ACHILLI *et al.*, 2004). Teniendo en cuenta el tamaño reducido de la muestra analizada, la presencia de dos sujetos pertenecientes al subhaplogrupo H3, aunque podría deberse a variaciones aleatorias, podría explicarse por la existencia de una relación de parentesco vía materna entre ambos sujetos.

La edad de coalescencia del haplogrupo H es de $18,4 \pm 2,0$ kya y la del subhaplogrupo H3 es de $10,3 \pm 2,4$ kya (ACHILLI *et al.*, 2004). Esta edad sería compatible con la presencia de este subhaplogrupo en los individuos del yacimiento de Paternanbidea, ya que se trata de una población del Neolítico Antiguo (6.090 ± 40 años BP y 5.960 ± 40 años BP).

El análisis del ADNmt nos aporta una información esencial en el estudio de esta necrópolis, ya que las evidencias arqueológicas apuntaban a la hipótesis de algún tipo de relación familiar entre los individuos inhumados en cada fosa. Sin embargo, con los datos obtenidos a partir del ADNmt podemos descartar la existencia de cualquier tipo de relación familiar vía materna dentro de cada fosa.

En cuanto a la variación genética entre las fosas, solo se han observado dos haplotipos compartidos (ht8 y ht16). Dada la elevada frecuencia del ht8 en la población europea actual, el hecho de que dos individuos de distinta fosa compartan este haplogrupo, no indica necesariamente que existan relaciones de parentesco materno entre ellos. Ya que, la probabilidad de que dos individuos escogidos al azar en la población compartan el mismo haplotipo aumenta con la frecuencia del haplotipo. Pero en el caso del ht16, no podemos descartar la existencia de una posible relación familiar vía materna entre los individuos que lo comparten.

En este yacimiento se observa una alta diversidad genética ($0,944 \pm 0,0702$), indicándonos que los individuos inhumados en él no serían representativos de una población aislada, ni de tamaño reducido. Ya que de ser así, se darían cruzamientos endógamos, lo que incrementaría la posibilidad de que se repitieran uno o varios linajes en un mayor número de casos.

Por último, concluir que a partir del análisis de algunas características antropológicas, culturales y genéticas de los individuos inhumados en las cuatro fosas de este yacimiento, parece deducirse que el patrón de enterramiento no se basa en relaciones familiares vía materna. Además, el hecho de que los individuos de este yacimiento presenten diferente tipo y número de ajuar, parece no tener una base biológica en función de los datos del ADNmt.

V.3.

VARIABILIDAD GENÉTICA DE
YACIMIENTOS PREHISTÓRICOS DE LA
CORNISA CANTÁBRICA

V.3.1. INTRODUCCIÓN

El registro arqueológico nos indica la existencia de acontecimientos demográficos que podrían haber afectado a la composición genética de las poblaciones humanas a escala continental, como podría ser la primera colonización de Eurasia por el *Homo sapiens* anatómicamente moderno (HSAM), al inicio del Paleolítico Superior (hace aproximadamente 45.000 años) o la difusión de los portadores de una economía productora (agricultores y ganaderos) durante el Neolítico (hace aproximadamente 10.000 años).

En ambos casos las poblaciones del Próximo Oriente se habrían expandido hacia el oeste y norte de Europa, lo que podría haber originado patrones de distribución clinal en sentido sudeste-noroeste para muchos *loci* genéticos. Otro acontecimiento demográfico que pudo haber afectado al *pool génico* actual es el repliegue de las poblaciones a los refugios glaciales durante el LGM (*Latest Glacial Maximum*) y la recolonización post-glacial de Europa desde estos refugios glaciales durante el Mesolítico.

Existen numerosas publicaciones de estudios genéticos y antropológicos, tanto de poblaciones actuales como prehistóricas, que intentan explicar el origen de la variabilidad genética de la población europea actual y cómo tuvo lugar el proceso de difusión de la economía productora asociada al Neolítico.

Estos estudios, muestran que la variabilidad genética existente en las poblaciones europeas actuales se asocia con diversos acontecimientos

demográficos, pudiendo ser el reflejo tanto de la diversidad genética de las primeras formas de HSAM del Paleolítico Superior con una economía cazadora-recolectora, como de la recolonización de Europa desde los refugios glaciales después del LGM, o de la llegada de los agricultores desde el Próximo Oriente durante el Neolítico.

También pueden haber existido otros acontecimientos demográficos que pudieron haber influido en la composición genética de las poblaciones actuales, como sería el caso de eventos demográficos asociados a épocas post-neolíticas (ALZUALDE *et al.*, 2005, 2006, 2007; CASAS *et al.*, 2006; BRAMANTI *et al.*, 2009; MALMSTRÖM *et al.*, 2009; GHIROTTO *et al.*, 2010). Todos estos acontecimientos no tienen por que ser excluyentes entre sí, sino que todos ellos pudieron haber contribuido en mayor o menor medida al *pool génico* de las poblaciones europeas actuales.

Durante el Neolítico, la adaptación a la economía productora, es decir, a la agricultura y ganadería, se presume que facilitó el crecimiento de la población, posibilitando posteriormente la dispersión de las sucesivas generaciones, aumentando la ocupación de su territorio e incrementando la esperanza de vida de los cazadores-recolectores existentes (GALLAGHER *et al.*, 2009).

La difusión de la agricultura y ganadería en Europa durante el Neolítico, se ha enmarcado tradicionalmente dentro de una dicotomía basada, bien en un fenómeno de aculturación o bien de difusión démica.

La hipótesis de *aculturación*, propone una continuidad genética de los primeros HSAM con una forma de vida cazadora-recolectora, sin sufrir ningún aporte genético asociado a la dispersión de la agricultura neolítica, y en consecuencia el neolítico no habría influido en la variación genética de la población europea actual (RICHARDS *et al.*, 1996; HAAK *et al.*, 2005).

La hipótesis de *la difusión démica*, propone que la dispersión de la agricultura asociada al Neolítico desde el Próximo Oriente hacia Europa (hace 10-6 kya), habría tenido gran influencia en la composición genética de la población europea actual (AMMERMAN y CAVALLI-SFORZA, 1984; BARBUJANI *et al.*, 1995, CAVALLI-SFORZA, 1993; CHIKIHI *et al.*, 1998,, 2002; SOKAL *et al.*, 1991). De acuerdo con este último planteamiento, las poblaciones del Próximo Oriente habrían aumentado su tamaño gracias al desarrollo de la agricultura y la ganadería, pudiendo haberse dispersado a otros lugares, mezclándose con los cazadores-recolectores indígenas.

Estas dos hipótesis son las más extremas, y entre ellas pueden definirse otros modelos que permiten predecir el proceso de dispersión del neolítico en Europa. RICHARDS, (2003), ha publicado siete modelos que permiten estimar como fue la dispersión de la cultura neolítica en Europa:

1. *Migracionista*: movimiento unidireccional de los agricultores del Próximo Oriente hacia Europa, con un reemplazamiento genético de los cazadores-recolectores indígenas.

2. *Difusión démica*: mezcla de los agricultores neolíticos con los cazadores-recolectores, sin un reemplazamiento total, lo que conllevaría a la formación de gradientes para algunos linajes.
3. *Elite dominante*: una elite social de agricultores y/o ganaderos penetraría en una zona e impondría su cultura a nivel local. Los grupos recién llegados no dejarían muchas evidencias genéticas en la zona colonizada.
4. *Infiltración de pequeños grupos especializados*: un pequeño número de individuos agricultores y/o ganaderos, se introducirían en nuevas áreas, donde dejarían huellas de algunos linajes de la población original
5. *Leapfrog*: colonización de áreas geográficamente limitadas, por parte de grupos de agricultores y/o ganaderos de tamaño reducido, óptimas para su forma de vida, quedando así rodeados por los grupos indígenas.
6. *Movilidad de fronteras*: intercambio genético en las zonas fronterizas creadas entre los grupos de agricultores neolíticos y los grupos de cazadores-recolectores indígenas.
7. *Contacto regional o aculturación*: intercambio cultural entre los cazadores-recolectores indígenas y los agricultores neolíticos

AMMERMAN y CAVALLI-SFORZA (1984), propusieron por primera vez un modelo de dispersión de la economía productora asociada al Neolítico basándose en marcadores genéticos clásicos, el denominado *modelo de ola de avance (modelo 2)*. Correlacionaron la difusión de la agricultura durante el Neolítico con una expansión démica desde el Próximo Oriente hacia Europa hace 10-6 kya, y propusieron un modelo migratorio que tuvo una

gran influencia en la composición genética de las poblaciones actuales. Según este modelo, los grupos poblacionales del Próximo Oriente habrían incrementado su tamaño poblacional gracias al desarrollo de la agricultura, lo que habría permitido su dispersión a otros lugares, donde se habrían mezclado con los grupos cazadores-recolectores indígenas.

Un gran número de estudios genéticos que abordan la cuestión de la dispersión del neolítico se basan en el análisis del ADNmt. Sin embargo, no debemos olvidar, que los resultados derivados del estudio del ADNmt se deben interpretar con cautela, ya que debido a su naturaleza haploide, no hay recombinación y se hereda en bloque, comportándose como un único *locus* y debido a su transmisión vía materna, se limita únicamente a la reconstrucción de la historia evolutiva de las mujeres.

Los análisis del ADNmt en una serie de grupos de europeos actuales geográficamente dispersos (RICHARDS *et al.*, 1996; TORRONI *et al.*, 1994, PULT *et al.*, 1994), revelaron un patrón de dispersión del neolítico diferente al propuesto por AMMERMAN y CAVALLI-SFORZA (1984), sugiriendo que la influencia de las migraciones neolíticas sobre las poblaciones europeas actuales ha sido sobreestimada en los estudios de marcadores clásicos. Se propone que la variación genética de la población europea sería un reflejo de la primera colonización paleolítica de Europa por HSAM, siendo la influencia del Neolítico eminentemente cultural (*modelo 7*).

Posteriormente, RICHARDS *et al.* (2000), realizaron un análisis de los datos del ADNmt de las poblaciones europeas y del Próximo Oriente, aplicando un análisis fundacional. El análisis fundacional consiste en llevar a cabo la comparación de la variabilidad genética entre la población de origen (el Próximo Oriente) y la de destino (Europa), lo que permite determinar la edad de coalescencia de los linajes mitocondriales e identificar los linajes mitocondriales fundacionales de Europa.

Asimismo, cuantificaron el aporte de la variabilidad genética asociada a los agricultores neolíticos en el *pool* génico de las poblaciones europeas actuales en un 13%, lo que indicaría que hubo una mayor difusión cultural que démica. Por lo tanto, estos autores apoyarían los *modelos* intermedios 4 y 5, según los cuales los colonizadores agrícolas habrían dejado trazas de sus linajes (13%) en las zonas más cercanas al Próximo Oriente (la zona sureste y centro de Europa), generándose en el resto de Europa una aculturación de los grupos cazadores-recolectores indígenas (*modelo 7*).

El análisis del ADN recuperado de restos humanos antiguos, permite inferir una aproximación directa de la historia evolutiva de nuestra especie. Estos análisis han puesto de manifiesto que dicha historia es más compleja que la inferida a partir de los datos genéticos actuales (BRAMANTI *et al.*, 2009; HAAK *et al.*, 2005; SAMPIETRO *et al.*, 2007; MACA-MEYER *et al.*, 2005; FREGEL *et al.*, 2009a, 2009b; CASAS *et al.*, 2006; ALZUALDE *et al.*, 2005, 2006, 2007; MALMSTRÖM *et al.*, 2009; GHIROTTI *et al.*, 2010).

El análisis de ADNmt de restos óseos pertenecientes a los primeros agricultores neolíticos de Europa central (7.5-7 kya) (HAAK *et al.*, 2005), ha cuestionado la aportación de los agricultores neolíticos al *pool* génico de los europeos actuales. Estos primeros agricultores neolíticos de Europa central muestran una frecuencia elevada de haplotipos mitocondriales pertenecientes al haplogrupo N1a, lo que se ha interpretado como una insignificante contribución genética de los agricultores neolíticos al *pool génico* de los europeos actuales, proponiendo que los cruzamientos se habrían dado entre los primeros hombres agricultores y las mujeres indígenas cazadoras-recolectoras. Por otro lado, la frecuencia de este haplogrupo es baja en la población europea actual. Sin embargo, los autores rechazan la posibilidad de que este haplogrupo haya disminuido su frecuencia por efecto de la deriva genética que pudo haber acontecido en los últimos 7.500 años.

El análisis genético del ADNmt de individuos procedentes del yacimiento neolítico de “*Cami de Can Grau*” (Granollers, Barcelona), de finales del quinto milenio (SAMPIETRO *et al.*, 2007), muestra unos resultados diferentes a los publicados por HAAK *et al.* (2005) en relación a la dispersión de la agricultura. Esta diferencia se basa principalmente en la existencia de linajes mitocondriales característicos de las poblaciones actuales de la Península Ibérica y de la zona mediterránea de Europa en el yacimiento neolítico de “*Cami de Can Grau*”. Además, ninguno de los individuos recuperados en este yacimiento pertenece al haplogrupo N1a.

Por lo tanto SAMPIETRO *et al.* (2007), proponen un modelo dual para explicar el proceso de dispersión del Neolítico: 1)- una difusión démica

(*modelo 2*) en la zona mediterránea de Europa y 2)- un proceso de aculturación en la zona central de Europa (*modelo 7*).

Estudios recientes sobre muestras de cazadores-recolectores de Escandinavia (MALMSTRÖM *et al.*, 2009) y de Europa central (BRAMANTI *et al.*, 2009), indican la existencia de una discontinuidad genética entre las poblaciones cazadoras-recolectoras y las neolíticas en ambas zonas (*modelo 1*). Asimismo, las poblaciones neolíticas también muestran una discontinuidad genética con respecto a las poblaciones actuales en sus respectivas zonas. Estos dos estudios, plantean la existencia de un reemplazamiento poblacional, tanto en el periodo Neolítico como en épocas post-Neolíticas.

En el presente estudio, se aborda el análisis genético de los individuos recuperados de varios yacimientos localizados en el norte de la Península Ibérica (País Vasco, Navarra y Cantabria), cuya cronología abarca desde el periodo Magdaleniense hasta la Edad del Bronce (Figura III.1 y Tabla III.1). De éstos, cuatro corresponden a grupos poblacionales de *cazadores-recolectores*: **La Chora** (Pantaleón de las Arias, Cantabria) (GONZÁLEZ-ECHEGARAY *et al.*, 1963), **La Pasiéga** (Puente Viesgo, Cantabria) (GONZÁLEZ-ECHEGARAY y RIPOLL, 1952), **Erralla** (Cestona, Guipúzcoa) (DE LA RÚA, 1985) y **Aizpea** (Aribe, Navarra) (DE LA RÚA *et al.*, 2001); otros cuatro corresponden al periodo *Neolítico*: **Los Cascajos** (Los Arcos, Navarra) (GARCÍA GAZÓLAZ, 1999, 2001; GAZÓLAZ y SESMA 2007a), **Paternanbidea** (Ibero, Pamplona) (GARCÍA GAZÓLAZ, 1998; GARCÍA GAZÓLAZ y SESMA, 2007b), **Marizulo** (Urnietta, Guipúzcoa) (BASABE *et al.*, 1971; ALDAY *et al.*, 1995) y **Fuente Hoz**

(Anúncita, Álava) (BASABE y BENNASSAR, 1983); y el último yacimiento corresponde a la *Edad del Bronce*, **Urtiaga** (Deba, Guipúzcoa) (DE LA RÚA, 1988; ALTUNA *et al.*, 1989).

Los yacimientos neolíticos de Paternanbidea y Los Cascajos, tienen una gran importancia. Se trata de poblados al aire libre plenamente neolíticos, tanto en el sentido cronológico como cultural del término. La importancia del resto de yacimientos radica en la excepcionalidad de las muestras recuperadas, a pesar de que se trate de tamaños muestrales pequeños (1-6 individuos), su antigüedad y su localización permitirá contrastar las hipótesis actuales sobre la influencia biológica y cultural del Neolítico.

El análisis genético de los restos recuperados en estos nueve yacimientos del norte de la Península Ibérica, tiene como objetivo valorar la influencia del Neolítico en la zona norte de la Península Ibérica y mostrar la perspectiva biológico temporal existente en esta zona, desde la época Magdaleniense hasta la actualidad.

V.3.2. MATERIAL Y MÉTODOS

En este estudio se ha realizado el análisis de un total de 54 individuos procedentes de nueve yacimientos ubicados en la zona norte de la Península Ibérica, concretamente en el País Vasco, Navarra y Cantabria (Figura III.1 y Tabla III.1).

En el análisis molecular realizado, hemos seguido un estricto criterio de selección de piezas dentarias (sin caries, ni fisuras). Siempre que ha sido posible, se ha tomado más de un diente por individuo, pudiendo reunir

un mínimo de 122 piezas dentarias y 14 huesos correspondientes a 54 individuos, lo que nos ha permitido cumplir con los requisitos de autenticación de los resultados de ADN, tales como la duplicación y la replicación.

El protocolo seguido tanto para la selección, limpieza de las muestras, así como la extracción del ADN y el análisis de la variabilidad del ADNmt, tanto de muestras antiguas como actuales, se indica en los apartados IV.1 y IV.2. Previo al análisis molecular, se ha realizado un registro fotográfico de todas las muestras antropológicas (óseas y dentarias), así como una medición de las mismas (Anexo I).

En este estudio se han llevado a cabo los criterios de autenticación propuestos para los estudios de ADN los cuales se encuentran descritos en el apartado IV.1.6.2. Se han realizado los *controles* oportunos tanto durante la extracción del ADN, como de la amplificación de las muestras. Asimismo, se ha realizado la *cuantificación* del número de moléculas molde presentes en los extractos mediante PCR cuantitativa a tiempo real. Además, hemos corroborado los resultados obtenidos mediante la *duplicación* de las muestras en nuestro laboratorio y la *replicación* de los mismos en un laboratorio independiente (grupo del Dr. *Vicente Cabrera* de la Facultad de Biología, área de Genética de la Universidad de La Laguna).

Finalmente, se ha *clonado* un número elevado de productos de PCR y posteriormente se han secuenciado 10 clones de cada muestra amplificada.

En cuanto al tratamiento estadístico, se ha realizado un *Análisis de Componentes Principales (Principal Component Analysis, PCA)* y otro de *Escalamiento Multidimensional (Multidimensional Scaling, MDS)* (*SPSS 17 Software*), en el que se han considerado las frecuencias de los haplogrupos mitocondriales, así como los datos de las poblaciones actuales y prehistóricas del Próximo Oriente y Europa, recopiladas de la bibliografía.

Para valorar la posible diferenciación genética entre estas poblaciones se ha realizado un *test exacto de diferenciación poblacional* y un análisis de *Pairwise Fst*, utilizando para ello el paquete estadístico *Arlequin 3.11* (SCHNEIDER *et al.*, 2000). También se ha utilizado este software para calcular la *diversidad genética* (NEI *et al.*, 1987) de las poblaciones analizadas. Estos análisis estadísticos se encuentran detallados en el apartado IV.3.

V.3.3. RESULTADOS

V.3.3.1. Análisis de la variabilidad del ADN_{mt} de las muestras prehistóricas

En una fase previa al análisis del ADN, se ha realizado la selección, el registro fotográfico y la medición de las muestras (Anexo I, Tabla A1 y A2), en este caso un total de 122 piezas dentarias y 14 huesos.

De un total de 61 inhumados provenientes de los nueve yacimientos estudiados, se han analizado 54 individuos, obteniéndose resultados de 47 de ellos, siendo reproducibles en 42 casos (Tabla V.3.1); esto representa el 77% de la muestra recuperada. Este porcentaje se ve

reducido, ya que en algunos casos no se ha obtenido suficiente cantidad y un estado del ADN que permita reproducir los resultados (Tabla V.3.1).

De los 54 individuos analizados, un 66% han sido analizados por duplicado en nuestro laboratorio, lo que consiste en el análisis de dos muestras del mismo individuo en momentos diferentes. Además se ha realizado la replicación del 44% de los resultados, por el equipo del Dr. Vicente Cabrera (Área de Genética de la Facultad de Biología, Universidad de La Laguna). Asimismo, se ha llevado a cabo la cuantificación del número de moléculas molde de cada extracto, mediante qPCR (Tabla V.3.2).

Los resultados obtenidos muestran que el número de moléculas de ADN molde de los extractos oscila entre 100-1000 (Tabla V.3.2), valores que se ajustan al límite propuesto para los estudios de ADN_a, ya que por debajo de este valor los resultados no serían reproducibles (HANDT *et al.*, 1996).

También se ha realizado la clonación del 26% de los productos de PCR y posterior secuenciación de diez clones de cada uno de ellos. Los resultados de todos estos análisis nos confirman la autenticidad del 77% de los individuos recuperados.

De estos 42 individuos, que presentan resultados reproducibles, se han obtenido 22 haplotipos mitocondriales diferentes (Tabla V.3.2), siendo estos haplotipos compartidos tanto entre los individuos de cada uno de los yacimientos, como entre individuos de diferentes yacimientos (Tabla

V.3.3). Algunos linajes mitocondriales han persistido a lo largo de varios periodos de tiempo en la misma zona geográfica.

Tabla V.3.1. Muestras analizadas. Total, nº de individuos recuperados; Analizado, nº de individuos analizados; DUP, muestras analizadas por duplicado en nuestro laboratorio; REP, muestras replicadas en un laboratorio independiente; CLON, muestras clonadas; AUTENT, nº de muestras que presentan resultados reproducibles. **Yacimientos de cazadores-recolectores:** Erralla (ERR), Aizpea (AIZ), La Pasiaga (PS), y La Chora (CH). **Yacimientos neolíticos:** Paternanbidea (PAT), Los Cascajos (CAS), Marizulo (MZ) y Fuente Hoz (FH). **Yacimiento de la Edad del Bronce:** Urtiaga (URT).

| YAC | Total | Analizado | Diente | Hueso | DUP | REP | CLON | AUTENT. |
|--------------|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| ERR | 1 | 1 | 1 | - | - | 1 | - | 1 |
| AIZ | 1 | 1 | 1 | - | 1 | 1 | 6 | 1 |
| CAS | 36 | 30 | 27 | 3 | 25 | 12 | 41 | 23 |
| PAT | 11 | 11 | 9 | 2 | 8 | 4 | 17 | 9 |
| MZ | 1 | 1 | 1 | - | 1 | 1 | - | 1 |
| FH | 6 | 6 | 6 | - | 1 | 3 | - | 3 |
| URT | 3 | 2 | 2 | - | - | 2 | - | 2 |
| PS | 1 | 1 | 1 | - | - | - | - | 1 |
| CH | 1 | 1 | 1 | - | - | - | - | 1 |
| Total | 61 | 54 | 49 | 5 | 36 | 24 | 64 | 42 |

Tabla V.3.2. Distribución de los haplotipos y haplogrupos obtenidos en los nueve yacimientos analizados del norte de la Península Ibérica. IND, sigla del individuo analizado; HVS-I, los motivos del segmento I (sumar 16000 para determinar la posición nucleotídica); 73, estado alélico del nucleótido de la posición 73; HVS-II, los motivos del segmento II; n° molec., el número de moléculas molde de ADNmt recuperadas en cada extracto; D, muestra duplicada; R, muestra replicada; y C, muestra clonada.

| IND. | HVS-I | 73 | HVS-II | HT | HG | n° molec | |
|----------|-------------------|----|---------------------------------------|------|------|----------|---------|
| CAS-21 | 92 | G | - | ht1 | H | 116,5 | R, D, C |
| CAS-33 | 311 | A | - | ht2 | H | 35,5 | R, D, C |
| CAS-48 | CRS | G | 73-146-263-285-309.1-310.1-312-313 | ht3 | H | 76 | R, D, C |
| CAS-70 | CRS | G | 73-146-263-309.1C-315.1C-320 | ht4 | U | 35,5 | D, C |
| CAS-90 | CRS | G | 73-146-263-285-309.1C-310.1T-312-313 | ht3 | H | 411,5 | D, C |
| CAS-148 | 220-278-311 | G | - | ht5 | U | - | - |
| CAS-179 | 69-126-195 | G | - | ht6 | J | 473,37 | D, C |
| CAS-181 | 224-311 | G | 73-263-315.1C | ht7 | K | 388,8 | D, C |
| CAS-182 | CRS | A | - | ht8 | H | - | - |
| CAS-183 | 92-288-311 | G | - | ht9 | U | 185,2 | R, D, C |
| CAS-191 | 224-311 | G | 73-263-315.1 | ht7 | K1a | 656,3 | R, D, C |
| CAS-193S | 311 | A | - | ht2 | H | 91,03 | R, D, C |
| CAS-194 | 92-311 | A | - | ht10 | H | 1167,3 | R, D, C |
| CAS-196 | CRS | G | 73-146-263-285T-309.1C-310.1T-312-313 | ht3 | H | 411,5 | R, D, C |
| CAS-202 | 224-311 | G | 73-263-315.1 | ht7 | K1a | 524,5 | R, D, C |
| CAS-203 | 69-126 | G | - | ht11 | J | 176,2 | D, C |
| CAS-204 | 270-311 | G | - | ht12 | U5 | 458,3 | D, C |
| CAS-216 | CRS | G | 73-146-263-309.1C-315.1C-320 | ht4 | U | 495,7 | R, D, C |
| CAS-222 | 129 | A | - | ht13 | H | 975,1 | R, D, C |
| CAS-254 | CRS | G | 73-146-263-309.1C-315.1C-320 | ht4 | U | 909,9 | D, C |
| CAS-258 | 92-224-311 | G | 73-146-263-315.1C | ht14 | K | 185,1 | R, D, C |
| CAS-341 | 92-311 | A | - | ht10 | H | 820,9 | D, C |
| CAS-497 | 311 | A | - | ht2 | H | 479,6 | D, C |
| PAT-1E1 | CRS | G | - | ht15 | U | 122,9 | R, D, C |
| PAT-1E3 | CRS | A | - | ht8 | H | 333,5 | R, D, C |
| PAT-1E4 | 209 | A | - | ht16 | H3 | - | D, C |
| PAT-1E5 | 92-311 | A | - | ht10 | H | - | D, C |
| PAT-2E1 | CRS | A | - | ht8 | H | 751,7 | R, D, C |
| PAT-2E2 | 92-224-311 | G | 73-146-263-315.1C | ht14 | K | 258,5 | D, C |
| PAT-3E2 | 311 | A | - | ht17 | HV | 287,3 | D, C |
| PAT-4E1 | 129-223 | G | - | ht18 | I | 22,8 | D, C |
| PAT-4E2 | 209 | A | - | ht16 | H3 | 372,4 | D, C |
| ERR-1 | 270 | G | - | ht19 | U5 | 6666,7 | R |
| MZ-1 | 224-311 | G | 73-263-315.1C | ht7 | K1a | 766,7 | R |
| FH-1 | CRS | G | - | ht15 | U | 1233,3 | R |
| FH-2 | 192-270 | G | - | ht20 | U5a | 496,7 | R |
| FH-6 | CRS | A | - | ht8 | H | 554,5 | R |
| URT-1 | CRS | A | - | ht8 | H | 3333,33 | R |
| URT-2 | 192-270 | G | - | ht20 | U5a | 1420,33 | R |
| CH-1 | 93C-224C-311C | G | - | ht21 | K1a | 669,21 | |
| PS-1 | CRS | A | - | ht8 | H | 1229,6 | |
| AIZ | 51-93-189-192-270 | G | - | ht22 | U5b1 | 12797 | D, R, C |

Tabla V.3. Distribución de las frecuencias de los haplotipos y haplogrupos mitocondriales obtenidos en los nueve yacimientos estudiados (Erralla, Aizpea, La Pasiega, La Chora, Marizulo, Urriaga, Fuente Hoz, Paternabidea y Los Cascajos).

| INDIVIDUO | HT | HVS-I-II | N | % | HG | % |
|--|------|--|---|------|------|------|
| CAS-21 | ht1 | 16092-73 | 1 | 2,4 | H | 45,2 |
| CAS-33, CAS-193S, CAS-497 | ht2 | 16311 | 3 | 7,1 | H | |
| CAS-48, CAS-90, CAS196 | ht3 | 73-146-263-285-309.1C- 310.1T-312-313 | 3 | 7,1 | H | |
| PAT-1E3, PAT-2E1, CAS- 182, FH-6, URT-1, PS-1 | ht8 | CRS | 6 | 14,3 | H | |
| PAT-1E5, CAS-194, CAS-341 | ht10 | 16092-16311 | 3 | 7,1 | H | |
| CAS-222 | ht13 | 16129 | 1 | 2,4 | H | |
| PAT-1E4, PAT-4E2 | ht16 | 160209 | 2 | 4,8 | H3 | |
| CAS-70, CAS-216, CAS- 254 | ht4 | 73-146-263G-309.1C- 315.1C-320 | 3 | 7,1 | U | 28,7 |
| CAS-148 | ht5 | 16220-16278-16311-73 | 1 | 2,4 | U | |
| CAS-183 | ht9 | 16092-16288-116311-73- 263-315.1C | 1 | 2,4 | U | |
| CAS-204 | ht12 | 16270-16311-73 | 1 | 2,4 | U5 | |
| PAT-1E1, FH-1 | ht15 | CRS-73 | 2 | 4,8 | U | |
| ERR-1 | ht19 | 16270-73G | 1 | 2,4 | U5 | |
| FH-2, URT-2 | ht20 | 16192-16270-73G | 2 | 4,8 | U5a | |
| AIZ-1 | ht22 | 16051-16093-16189- 16192-1270 | 1 | 2,4 | U5b1 | |
| CAS-181, CAS-191, CAS-202,MZ-1 | ht7 | 16224-16311-73 | 4 | 9,5 | K1a | 16,7 |
| PAT- 2E2, CAS-258 | ht14 | 16092-16224-16311-73- 146-263-315.1 | 2 | 4,8 | K | |
| CH-1 | ht21 | 16093-16224-16311-73G | 1 | 2,4 | K1a | |
| CAS-179 | ht6 | 16069-16126-16195-73 | 1 | 2,4 | J | 4,8 |
| CAS-203 | ht11 | 16069-16126-73 | 1 | 2,4 | J | |
| PAT-3E2 | ht17 | 16311 | 1 | 2,4 | HV | 2,4 |
| PAT-4E1 | ht18 | 16129-16223-73 | 1 | 2,4 | I | 2,4 |

A partir de los 22 haplotipos mitocondriales resultantes, se ha calculado la diversidad genética de cada uno de los yacimientos. En aquellos yacimientos que no presentaban más de un haplotipo mitocondrial no se ha podido realizar este cálculo.

En el caso de Los Cascajos y Paternanbidea, que son los yacimientos con un mayor número de individuos, se han obtenido unos valores de diversidad genética muy elevados, $0,9289 \pm 0,035$ y $0,9444 \pm 0,0702$, respectivamente.

En algunos yacimientos, solo se ha recuperado un individuo, razón por la cual los yacimientos contemporáneos con un tamaño muestral pequeño se han agrupado. Así, Aizpea, Erralla, La Chora y La Pasiega constituyen el grupo de cazadores-recolectores, denominado CR_CANTÁBRICO, mientras que Marizulo y Fuente Hoz constituyen el grupo NEO_OTROS. El yacimiento de Urtiaga no se ha considerado en estos tests, debido a que presenta un tamaño muestral pequeño y su cronología no es contemporánea con ningún otro yacimiento analizado.

Para analizar si los individuos de diferentes yacimientos y cronologías se encuentran dentro del mismo rango de variabilidad genética, se ha realizado *un test exacto de diferenciación poblacional* (Tabla V.3.4) y un análisis de *pairwise* F_{ST} (Tabla V.3.5), teniendo en cuenta las frecuencias de los haplotipos mitocondriales. Los resultados obtenidos de ambos tests, indican que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos poblacionales comparados, indicando un sustrato genético común entre estos grupos poblacionales.

De los 22 haplotipos mitocondriales obtenidos (Tabla V.3.3), dos de ellos se consideran únicos, el ht5 y el ht9, por no encontrarse en otras poblaciones, ni actuales ni prehistóricas. Ambas secuencias pertenecen al haplogrupo U. Las 20 secuencias restantes son de asignación europea, y

se pueden clasificar en seis haplogrupos mitocondriales: H, U, K, J, HV e I (Tabla V.3.2 y V.3.3) (ordenados de mayor a menor frecuencia).

Tabla V.3.4. Resultados del Test exacto de diferenciación poblacional y su desviación estándar ($p \pm de$) (* $P < 0.00625$) (RAYMOND y ROUSSET, 1995).

| | NEO_OTROS | NEO_CAS | NEO_PAT | CR_CANTÁBRICO |
|---------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------------|
| NEO_OTROS | - | | | |
| NEO_CAS | 0,88389 \pm 0,0038 | - | | |
| NEO_PAT | 0,14797 \pm 0,0077 | 0,00708 \pm 0,0015 | - | |
| CR_CANTÁBRICO | 1,00000 \pm 0,0000 | 0,70413 \pm 0,0046 | 0,06044 \pm 0,0046 | - |

Tabla V.3.5. Resultados del Test F_{ST} y su desviación estándar ($p \pm de$) (* $P < 0.00625$) (REYNOLDS *et al.*, 1983; SLATKIN *et al.*, 1995).

| | NEO_OTROS | NEO_CAS | NEO_PAT | CR_CANTÁBRICO |
|---------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------------|
| NEO_OTROS | - | | | |
| NEO_CAS | 0,90090 \pm 0,0032 | - | | |
| NEO_PAT | 0,30225 \pm 0,0046 | 0,02089 \pm 0,0014 | - | |
| CR_CANTÁBRICO | 0,99990 \pm 0,0000 | 0,76062 \pm 0,0041 | 0,13791 \pm 0,0034 | - |

Estos haplogrupos mitocondriales se encuentran ampliamente distribuidos en la población europea actual, pero la frecuencia observada en las poblaciones prehistóricas del presente estudio es, para algunos haplogrupos, superior a la publicada para las poblaciones europeas actuales. A continuación se describen los haplogrupos mitocondriales en los que se han clasificado los haplotipos encontrados en el presente estudio.

Haplogrupo H

El haplogrupo H es el mayoritario, alcanzando una frecuencia de un 45% en las muestras prehistóricas analizadas (Tabla V.3.3). Está presente en los individuos recuperados en cinco de los nueve yacimientos analizados:

La Pasiega (100%), Fuente Hoz (33%), Urtiaga (50%), Los Cascajos (48%) y Paternanbidea (55%), siendo Las Pasiega el único grupo cazador recolector que presenta este haplogrupo. Este resultado evidencia que este haplogrupo estaba presente en el periodo Magdaleniense y ha persistido hasta la actualidad. La frecuencia de este haplogrupo en los yacimientos analizados, es semejante a la observada en la población europea y vasca actual.

En el presente estudio se han encontrado siete linajes diferentes pertenecientes al haplogrupo H, siendo el más frecuente el linaje ht8 (14,3%), que es asimismo, el linaje más frecuente en la población europea actual (~45%) (RICHARDS *et al* 2000; LARRUGA *et al.*, 2001; PEREIRA *et al.*, 2006; ACHILLI *et al.*, 2007). Los otros seis linajes del haplogrupo H (ht1, ht2, ht3, ht8, ht10, ht13 y ht16), se encuentran presentes de forma exclusiva en Los Cascajos y Paternanbidea. Los haplotipos ht8, ht10 y ht13, se encuentran distribuidos en la población europea actual y en el oeste de Eurasia (RICHARDS *et al.*, 2000).

Los haplotipos ht1 y ht3, aunque pertenecen al haplogrupo H, presentan en la posición 73 del HVS-II un polimorfismo, una G en vez de una A (denominado haplotipo H-73G), poco frecuente en el haplogrupo H. Estos dos linajes presentan una frecuencia baja en la población europea actual, 0,5-3,1% (MACAULAY *et al.*, 1999; SALAS *et al.*, 1998; FINILLA *et al.*, 2001; ÁLVAREZ *et al.*, 2007). En las poblaciones prehistóricas que hemos analizado, el linaje H-73G, solo se ha encontrado en el yacimiento de Los Cascajos, siendo su frecuencia de un 2,4% para el ht1 y un 7,1% para el ht3. En las poblaciones antiguas, el valor más elevado descrito

hasta ahora, es el encontrado en la necrópolis de Aldaieta (20%), lo que fue atribuido a factores de parentesco (IZAGIRRE *et al.*, 2005).

Cabe destacar la presencia de dos individuos en el yacimiento de Paternanbidea que comparten el haplotipo ht16, perteneciente al subhaplogrupo H3. Este subhaplogrupo representa una pequeña fracción del haplogrupo H, encontrándose el valor más elevado de su frecuencia en la Península Ibérica, 13,9% la población vasca actual y 8,3% Galicia (ENNAFAA *et al.*, 2009).

Aunque la distribución del haplogrupo H, es uniforme prácticamente en toda Europa, el subhaplogrupo H3 muestra un gradiente muy acusado, un pico central en el suroeste de Europa (Norte de la Península Ibérica y Sudoeste de Francia) y unas frecuencias que van disminuyendo desde este núcleo central hacia el nordeste y sudeste europeo (ACHILLI *et al.*, 2004).

Todos estos linajes pertenecientes al haplogrupo H, se encuentran ampliamente distribuidos en las poblaciones europeas actuales (exceptuando a los Saami). También se han observado en el Norte de África, Oriente Medio, Norte de India y en Asia Central, donde presentan frecuencias entre el 5-10% (RICHARDS *et al.*, 2002).

Se ha propuesto que el haplogrupo H se originó en el Próximo Oriente hace ~30-25 kya (ACHILLI *et al.*, 2004), aunque dependiendo de la tasa de mutación que se emplee, podría tener un origen más reciente, ~18,6 kya (SOARES *et al.*, 2009).

El haplogrupo H, se habría extendido por toda Europa gracias a un proceso de recolonización ocurrido durante el Paleolítico. Este haplogrupo habría estado implicado en las expansiones ocurridas desde los refugios glaciales tras el LGM (TORRONI *et al.*, 1998; RICHARDS *et al.*, 2000; SOARES *et al.*, 2009).

Haplogrupo U

El segundo haplogrupo más frecuente entre los individuos prehistóricos analizados, es el haplogrupo U (28,7%), que es, asimismo el haplogrupo con más variabilidad, ya que se han hallado ocho haplotipos mitocondriales diferentes (ht4, ht5, ht9, ht12, ht15, ht19, ht20 y ht22) (Tabla V.3.3). Los dos haplotipos únicos obtenidos en este trabajo (no se han descrito en ninguna otra población actual, ni antigua), el ht5 y el ht9, se encuentran clasificados dentro del haplogrupo U.

La frecuencia del haplogrupo U en el total de las poblaciones prehistóricas analizadas en el presente estudio (28,7%), es superior a la que muestran las poblaciones actuales europeas (12,6%) y del País Vasco (18,2-14,48%) (RICHARDS *et al.*, 2000; ALFONSO-SÁNCHEZ *et al.*, 2007). El valor hallado en las muestras antiguas, se aproxima más al encontrado en las poblaciones actuales del Próximo Oriente (23%) (RICHARDS *et al.*, 2000).

Si analizamos la distribución de la frecuencia del haplogrupo U en las poblaciones prehistóricas y las poblaciones recuperadas de la bibliografía, observamos que los valores más elevados los presentan los cazadores-

recolectores de Escandinavia y Europa central, ambos con una frecuencia del 82% (BRAMANTI *et al.*, 2009; MALMSTRÖM *et al.*, 2009).

En cuanto a las poblaciones neolíticas, observamos que los valores son más bajos, siendo la población de Los Cascajos la que presenta el valor más elevado (26,3%), seguido de Paternabidea (11,1%). Sin embargo, en las poblaciones neolíticas de la bibliografía, encontramos que la frecuencia del haplogrupo U es aún más baja, observando un valor de un 9,1% en una población neolítica catalana (SAMPIETRO *et al.*, 2007) y de un 4% los neolíticos de Europa central (HAAK *et al.*, 2005).

Los linajes pertenecientes al subhaplogrupo U5 (ht12, ht19, ht20 y ht22) requieren una mención aparte, ya que este subhaplogrupo es uno de los más antiguos encontrado en Europa. Dada su edad de coalescencia, estimada en torno a 36,9 kya, se asocia a la colonización de Europa por HSAM durante el Paleolítico Superior (RICHARDS *et al.*, 2000; ACHILLI *et al.* 2005; SOARES *et al.*, 2009, 2010). Su frecuencia en las muestras analizadas es de un 12% y está presente tanto en individuos cazadores-recolectores, como del Neolítico, o de la Edad del Bronce. El haplogrupo U5 y sus subclados, el U5a y el U5b, presentan las máximas frecuencias en las poblaciones del extremo norte de Europa (Finlandia, Estonia y los Saami) (40%). En el resto de Europa presentan una distribución amplia, aunque con una frecuencia más baja (5-20%) (ROEHL *et al.*, 2001).

La presencia del subhaplogrupo U5 en la muestra de cazadores-recolectores del norte de la Península Ibérica (50%, aunque n=4),

concuerta con los valores obtenidos por BRAMANTI *et al.* (2009) y MALMSTRÖM *et al.* (2009), los cuales observan frecuencias elevadas para este subhaplogrupo en los cazadores-recolectores de Escandinavia (31,6%) y Europa central (74%).

En cuanto a los valores de las frecuencias del U5 en las poblaciones neolíticas del presente estudio, no son tan elevados, detectando una frecuencia del 4,3% en Los Cascajos y un 25% en NEO_OTROS (n=4); siendo inexistente en la población de Paternanbidea

Haplogrupo K

El haplogrupo K es un subclado del haplogrupo U8 y presenta una edad de coalescencia estimada en torno a 20-31,6 kya (SOARES *et al.*, 2010), siendo compatible su presencia en las muestras prehistóricas analizadas, las cuales presentan una frecuencia del 16,7% para este haplogrupo.

Este valor es muy semejante al observado en las poblaciones calcolíticas del País Vasco (SJaPL, Pico Ramos y Longar) (23-16,7%) (IZAGIRRE y DE LA RÚA, 1999) y superior al observado en las poblaciones actuales tanto europeas (8-5%) (RICHARDS *et al.*, 2000), como vascas (4-3%) (RICHARDS *et al.*, 2000, LARRUGA *et al.*, 2001; ALFONSO-SÁNCHEZ *et al.*, 2008). Existen tres linajes pertenecientes a este haplogrupo (ht7, ht14 y ht21), todos ellos se encuentran ampliamente distribuidos por toda la Península Ibérica (CRESPILO *et al.*, 2000; LARRUGA *et al.*, 2001; GONZALEZ *et al.*, 2003), las Islas Canarias (MACA-MEYER *et al.*, 2003), Europa (RICHARDS *et al.*, 2000) y norte de África (RANDO *et al.*, 1998).

Este haplogrupo no se ha encontrado en los cazadores-recolectores de Escandinavia y de Europa central, ni en la población neolítica catalana. Sin embargo, en los primeros grupos de agricultores de Europa central, presenta una frecuencia elevada (16%).

Haplogrupo J

En los individuos prehistóricos, se han encontrado dos secuencias pertenecientes al haplogrupo J, el ht6 y el ht11, que corresponden a dos individuos del yacimiento neolítico de Los Cascajos, siendo su frecuencia en esta población de un 8,5%. La frecuencia del haplogrupo J en las poblaciones vascas actuales es de un 15% en una muestra de Navarra (datos no publicados), un 14,5 % en una muestra general del País Vasco (Gohierri y Arratia) (ALFONSO-SÁNCHEZ *et al.*, 2008) y un 2,4% en otra muestra general del País Vasco (RICHARDS *et al.*, 2000). Su frecuencia en el resto de Europa oscila entre 8-10% y en las poblaciones del Próximo Oriente entre 9-15% (RICHARDS *et al.*, 2000).

Haplogrupo HV

El haplogrupo HV está representado por una única secuencia, el ht17, presente en un sujeto del yacimiento neolítico de Paternanbidea. Este haplogrupo se encuentra representado, tanto en Europa (más frecuente en Europa occidental), como el norte de África, con una frecuencia promedio de un 4%. Su edad de coalescencia se estima en 30 kya (RICHARDS *et al.*, 2000; LARRUGA *et al.*, 2001).

En las muestras prehistóricas recopiladas de la bibliografía, este haplogrupo solo se ha encontrado en los neolíticos (8%) y los cazadores-recolectores (4,5%) de Europa central.

Haplogrupo I

El haplogrupo I está representado por una sola secuencia, el haplotipo ht18, presente en un sujeto del yacimiento neolítico de Paternanbidea. Este haplogrupo se encuentra tanto en la Europa Atlántica (RICHARDS *et al.*, 2000), como en la Península Ibérica (GONZÁLEZ *et al.*, 2002). En las poblaciones actuales su frecuencia no es muy elevada (2%) y su representación es ligeramente mayor en la Europa septentrional y occidental, presentando una antigüedad de 24,7 kya (RICHARDS *et al.*, 2000). En las muestras prehistóricas recopiladas de la bibliografía, este haplogrupo solo se ha encontrado en la población neolítica de Cataluña (~9%), con una frecuencia superior a la encontrada en la población europea actual.

V.3.3.2. Análisis de la variabilidad de los haplogrupos mitocondriales en las poblaciones prehistóricas y actuales.

Las poblaciones prehistóricas y actuales analizadas en este estudio, se han comparado con otras poblaciones actuales y prehistóricas, de la Península Ibérica, Europa y el Próximo Oriente recopiladas de la bibliografía (Tabla V.3.10).

Los grupos de cazadores-recolectores considerados en este análisis, están representados por la muestra denominada CR_CANTÁBRICO, donde se han incluido las muestras procedentes de los yacimientos de La Pasiega, La Chora, Erralla y Aizpea. Asimismo se han incluido otras dos muestras tomadas de la bibliografía: la muestra denominada CR_CE procedente de Europa central y la muestra denominada CR_SCA, procedente de Escandinavia (Tabla V.3.10a).

El periodo Neolítico está representado, por un lado, por las dos poblaciones neolíticas navarras analizadas en el presente estudio, Los Cascajos y Paternanbidea, denominadas NEO_CAS y NEO_PAT respectivamente y, por otro lado, por dos muestras tomadas de la literatura: la población neolítica del yacimiento catalán “*Cami de Can Grau*” (Granollers, Cataluña), denominada NEO_CAT y la muestra de los primeros agricultores procedentes de yacimientos del centro y norte de Europa, denominada NEO_CE (Tabla V.3.10a).

También existen estudios de yacimientos neolíticos de la Península Ibérica, muy importantes dada su antigüedad y localización, como es el caso del yacimiento de “*Mas d’en Boixos*” (Pacs, Alt Penedes) (GARCÍA SIVOLI *et al*, 2004), los de la gruta de Caldeirao (Portugal), de “*Sant Pau*” (Barcelona) y de la Cueva de Nerja (Málaga) (FERNÁNDEZ, 2005), entre otros. Sin embargo, no se han incluido en el análisis, ya que no se dispone de información publicada sobre las frecuencias de los haplogrupos mitocondriales.

El periodo Calcolítico está representado por tres poblaciones prehistóricas del País Vasco: Longar, SJaPL y Pico Ramos. Asimismo, se ha incluido la población histórica de Aldaieta. Todas ellas localizadas en la misma región geográfica que las muestras del presente estudio, con el fin de poder interpretar la variabilidad genético-temporal de la región del País Vasco y Navarra (Tabla V.3.10a).

El periodo actual está representado por diversas poblaciones europeas y del Próximo Oriente (Tabla V.3.10b). En los análisis estadísticos, estas poblaciones actuales, se agrupan en seis categorías diferentes, de la región geográfica de la que pertenecen: 1) vascos, 2) Península Ibérica, 3) Europa mediterránea, 4) Europa central, 5) noreste de Europa y 6) Próximo Oriente.

Se han realizado dos análisis estadísticos de diferenciación poblacional (*el Test estadístico F_{ST}* (Tabla V.3.11) y el *Test exacto de diferenciación poblacional*, (Tabla V.3.12), mediante el programa *Arlequín 3.11*, con el fin de valorar si existen diferencias estadísticamente significativas entre las poblaciones comparadas. Los resultados de estos dos análisis estadísticos son prácticamente similares. Las comparaciones realizadas indican los mismos valores de significación. A partir de estos análisis podemos ir desggranando las relaciones entre las poblaciones comparadas.

Tabla V.3.10. Poblaciones actuales y prehistóricas recopiladas de la bibliografía. Se indican los agrupamientos realizados en función de la zona de Europa de la que proceden, así como las poblaciones que se incluyen en cada agrupamiento, el tamaño muestral analizado y las referencias bibliográficas.

a) Poblaciones prehistóricas

| Abrev. | Poblaciones | Cronología | Nt | REF BIBLIO |
|------------|-----------------------|------------|----|---|
| NEO_CAT | Cataluña (Granollers) | 5.500 BP | 11 | SAMPIETRO <i>et al.</i> , 2007 |
| NEO_CE | Europa central y este | 7.500 BP | 24 | HAAK <i>et al.</i> , 2005 |
| CR_SCA | Escandinavia | 6.000 BP | 19 | MALMASTRÖM <i>et al.</i> , 2009 |
| CR_CE | Europa central y este | 11.000 BP | 22 | BRAMANTI <i>et al.</i> , 2009 |
| SJaPL* | Laguardia, Alava | 5.000 BP | 61 | IZAGIRRE y DE LA RÚA, 1999 |
| Longar | Navarra | 4.500 BP | 27 | IZAGIRRE y DE LA RÚA, 1999 |
| Pico Ramos | Vizcaya | 4.500 BP | 24 | IZAGIRRE y DE LA RÚA, 1999 |
| Aldaieta | Álava | VI-VII AD | 63 | ALZUALDE <i>et al.</i> , 2005, 2006, 2007 |

* San Juan ante Portam Latinam

b) Poblaciones actuales

| Abrev. | Poblaciones | N | Nt | REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA |
|--------------------|--------------------------------|-----|-----|--|
| SE | Bulgaria | 141 | 233 | CALAFELL <i>et al.</i> , 1996; RICHARDS <i>et al.</i> , 2000 |
| | Rumania | 92 | | |
| ME | Grecia | 65 | 107 | BELLEDI <i>et al.</i> , 2000; RICHARDS <i>et al.</i> , 2000 |
| | Albania | 42 | | |
| MC | Italia | 49 | 214 | FRANCALACCI <i>et al.</i> , 1996; TORRONI <i>et al.</i> , 1998; DI RIENZO y WILSON 1999; RICHARDS <i>et al.</i> , 2000 |
| | Roma | 48 | | |
| | Sicilia | 2 | | |
| | Cerdeña | 115 | | |
| Vascos | Guipúzcoa | 214 | 407 | BERTRANPETIT <i>et al.</i> , 1995; CORTE-REAL <i>et al.</i> , 1996; ALVAREZ <i>et al.</i> , 2007; RICHARDS <i>et al.</i> , 2000; GARCÍA <i>et al.</i> , 2010 |
| | Vizcaya | 112 | | |
| | Álava | 51 | | |
| | Muestra general del País Vasco | 30 | | |
| Cornisa Cantábrica | Galicia | 185 | 372 | SALAS <i>et al.</i> , 1998; ALVAREZ <i>et al.</i> , 2007; MACAMEYER <i>et al.</i> , 2003; GARCÍA <i>et al.</i> , 2010 |
| | Asturias | 82 | | |
| | Cantabria | 105 | | |
| Alpes | Suiza | 70 | 218 | PULT <i>et al.</i> , 1994; RICHARDS <i>et al.</i> , 1996 |
| | Alemania Sur | 49 | | |
| NC | Australia | 99 | 332 | POETSECH <i>et al.</i> , 2003; RICHARDS <i>et al.</i> , 1996, 2000 |
| | Polonia | 238 | | |
| | Checoslovaquia | 83 | | |
| | Alemania | 474 | | |
| | Dinamarca | 38 | | |
| SCA | Suiza | 32 | 478 | RICHARDS <i>et al.</i> , 1996, 2000; OPDAL <i>et al.</i> , 1998 |
| | Noruega | 231 | | |
| | Irlanda | 215 | | |
| NW | Francia | 71 | 361 | HELGASON <i>et al.</i> , 2001; PIERCY <i>et al.</i> , 1993; RICHARDS <i>et al.</i> , 1996, 2000 |
| | Inglaterra | 100 | | |
| | Escocia | 190 | | |
| NE | Irlanda oeste | 101 | 544 | MALYARCHUCK <i>et al.</i> , 2002, 2003; SAJANTILA <i>et al.</i> , 1995, 1996; RICHARDS <i>et al.</i> , 1996, 2000 |
| | Rusia | 462 | | |
| | Finlandia | 163 | | |
| | Estonia | 149 | | |
| | Checos | 106 | | |
| PI | Andalucía | 114 | 627 | GONZÁLEZ <i>et al.</i> , 2003; LARRUGA <i>et al.</i> , 2001; CORTE-REAL <i>et al.</i> , 1996; PLAZA <i>et al.</i> , 2003 |
| | Castilla-León | 99 | | |
| | Portugal | 353 | | |
| | Cataluña | 61 | | |
| N Cáucaso | Norte del Cáucaso | 208 | | MACAULAY <i>et al.</i> , 1999; RICHARDS <i>et al.</i> , 2000 |
| Iraq | | 116 | | RICHARDS <i>et al.</i> , 2000 |
| Siria | | 69 | | RICHARDS <i>et al.</i> , 2000 |
| Palestina | | 117 | | DI RIENZO y WILSON, 1991; RICHARDS <i>et al.</i> , 2000 |
| Turquía | | 218 | | CALAFELL <i>et al.</i> , 1996; COMAS <i>et al.</i> , 1996; RICHARDS <i>et al.</i> , 2000 |
| Kurdekistan | | 53 | | RICHARDS <i>et al.</i> , 2000 |
| Armenia | | 191 | | RICHARDS <i>et al.</i> , 2000 |

Los tres grupos de cazadores-recolectores no muestran diferencias estadísticamente significativas entre si; sin embargo, los cazadores-recolectores de Escandinavia (CR_SCA) y de Europa central (CR_CE), presentan diferencias estadísticamente significativas con el resto de las poblaciones, tanto actuales, neolíticas, como calcolíticas. Los cazadores-recolectores parecen presentar un sustrato genético común entre ellos, pero diferente al resto de las poblaciones.

Aunque, los cazadores-recolectores del norte de la Península Ibérica (CR_CANT), no presentan diferencias estadísticamente significativas con el resto de las poblaciones comparadas, creemos que esto puede ser debido a su pequeño tamaño muestral (n=4).

En el caso de las poblaciones neolíticas, tanto de la Península Ibérica (NEO_CAT, NEO_CAS y NEO_PAT), como de Europa central (NEO_CE), observamos que no muestran el mismo grado de diferenciación con respecto al resto de las poblaciones. Las poblaciones neolíticas de la Península Ibérica (NEO_CAT, NEO_CAS y NEO_PAT) no muestran diferencias estadísticamente significativas entre si, ni con las poblaciones actuales comparadas (tanto europeas como del Próximo Oriente), indicando que comparten un sustrato genético común.

Sin embargo, la población neolítica de Europa central (NEO_CE), muestra diferencias estadísticamente significativas con las poblaciones actuales tanto de Europa, como del Próximo Oriente, así como con la

población neolítica de Los Casajos y las poblaciones calcolíticas del País Vasco (SJaPL y Longar).

Las tres poblaciones calcolíticas del País Vasco (SJaPL, Pico Ramos y Longar), se comportan de una forma semejante. Todas ellas muestran diferencias estadísticamente significativas con la población del País Vasco, así como con las poblaciones de la Península Ibérica, del mediterráneo europeo y del Próximo Oriente.

Variación temporal del ADNmt en poblaciones de la C. Cantábrica

Tabla V.3.11. Resultados del Test F_{ST} y su desviación estándar ($p \pm de$) (en color amarillo, $P < 0,0035$) (REYNOLDS *et al.*, 1983; SLATKIN *et al.*, 1995).

| | CR_SCA | CR_CE | CR_CANT | NEO_CAT | NEO_CE | NEO_PAT | NEO_CAS | SJaPL | Pico Ramos | Longar | País Vasco | PI | Europa mediterranea | Europa central | Europa noreste |
|---------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| CR_CE | 0,99099 $\pm 0,0030$ | | | | | | | | | | | | | | |
| CR_CANT | 0,0991 $\pm 0,0286$ | 0,09009 $\pm 0,0303$ | | | | | | | | | | | | | |
| NEO_CAT | 0,00000 $\pm 0,00000$ | 0,00000 $\pm 0,00000$ | 0,32432 $\pm 0,0562$ | | | | | | | | | | | | |
| NEO_CE | 0,00000 $\pm 0,00000$ | 0,00000 $\pm 0,00000$ | 0,20721 $\pm 0,0385$ | 0,12613 $\pm 0,0337$ | | | | | | | | | | | |
| NEO_PAT | 0,00000 $\pm 0,00000$ | 0,00000 $\pm 0,00000$ | 0,36937 $\pm 0,0533$ | 0,53153 $\pm 0,0459$ | 0,01802 $\pm 0,0121$ | | | | | | | | | | |
| NEO_CAS | 0,00000 $\pm 0,00000$ | 0,00000 $\pm 0,00000$ | 0,65766 $\pm 0,0430$ | 0,23423 $\pm 0,0411$ | 0,00000 $\pm 0,00000$ | 0,60360 $\pm 0,0360$ | | | | | | | | | |
| SJaPL | 0,00000 $\pm 0,00000$ | 0,00000 $\pm 0,00000$ | 0,13514 $\pm 0,0455$ | 0,27928 $\pm 0,0394$ | 0,00000 $\pm 0,00000$ | 0,17117 $\pm 0,0344$ | 0,09009 $\pm 0,0303$ | | | | | | | | |
| Pico Ramos | 0,00000 $\pm 0,00000$ | 0,00000 $\pm 0,00000$ | 0,29730 $\pm 0,0385$ | 0,80180 $\pm 0,0498$ | 0,08108 $\pm 0,0370$ | 0,23423 $\pm 0,0364$ | 0,13514 $\pm 0,0203$ | 0,74775 $\pm 0,0560$ | | | | | | | |
| Longar | 0,00000 $\pm 0,00000$ | 0,00000 $\pm 0,00000$ | 0,14414 $\pm 0,0242$ | 0,24324 $\pm 0,0451$ | 0,03604 $\pm 0,0148$ | 0,28829 $\pm 0,0402$ | 0,05405 $\pm 0,0201$ | 0,32432 $\pm 0,0492$ | 0,62162 $\pm 0,0438$ | | | | | | |
| País Vasco | 0,00000 $\pm 0,00000$ | 0,00000 $\pm 0,00000$ | 0,06306 $\pm 0,0194$ | 0,18018 $\pm 0,0383$ | 0,00000 $\pm 0,00000$ | 0,59459 $\pm 0,0433$ | 0,23423 $\pm 0,0309$ | 0,00000 $\pm 0,00000$ | 0,04505 $\pm 0,0512$ | 0,0901 $\pm 0,0091$ | | | | | |
| PI | 0,00000 $\pm 0,00000$ | 0,00000 $\pm 0,00000$ | 0,08108 $\pm 0,0286$ | 0,27027 $\pm 0,0429$ | 0,00000 $\pm 0,00000$ | 0,64865 $\pm 0,0425$ | 0,13514 $\pm 0,0279$ | 0,00000 $\pm 0,00000$ | 0,00901 $\pm 0,0011$ | 0,0901 $\pm 0,0091$ | 0,82883 $\pm 0,0298$ | | | | |
| Europa mediterranea | 0,00000 $\pm 0,00000$ | 0,00000 $\pm 0,00000$ | 0,34234 $\pm 0,0504$ | 0,78378 $\pm 0,0592$ | 0,00000 $\pm 0,00000$ | 0,58559 $\pm 0,0512$ | 0,27928 $\pm 0,0316$ | 0,00000 $\pm 0,00000$ | 0,27928 $\pm 0,0252$ | 0,05405 $\pm 0,0242$ | 0,00000 $\pm 0,00000$ | 0,00000 $\pm 0,00000$ | | | |
| Europa central | 0,00000 $\pm 0,00000$ | 0,00000 $\pm 0,00000$ | 0,21622 $\pm 0,0454$ | 0,04505 $\pm 0,0152$ | 0,06306 $\pm 0,0273$ | 0,13514 $\pm 0,0339$ | 0,00000 $\pm 0,00000$ | 0,04505 $\pm 0,0244$ | 0,25225 $\pm 0,0503$ | 0,20721 $\pm 0,0430$ | 0,00000 $\pm 0,00000$ | 0,00000 $\pm 0,00000$ | 0,00000 $\pm 0,00000$ | | |
| Europa noreste | 0,00000 $\pm 0,00000$ | 0,00000 $\pm 0,00000$ | 0,24324 $\pm 0,0526$ | 0,36937 $\pm 0,0438$ | 0,01802 $\pm 0,0121$ | 0,25225 $\pm 0,0424$ | 0,04505 $\pm 0,0152$ | 0,21622 $\pm 0,0364$ | 0,71171 $\pm 0,0395$ | 0,5757 $\pm 0,0408$ | 0,00000 $\pm 0,00000$ | 0,00000 $\pm 0,00000$ | 0,00000 $\pm 0,00000$ | 0,00000 $\pm 0,00000$ | |
| PO | 0,00000 $\pm 0,00000$ | 0,00000 $\pm 0,00000$ | 0,53153 $\pm 0,0286$ | 0,72072 $\pm 0,0508$ | 0,00000 $\pm 0,00000$ | 0,20721 $\pm 0,0526$ | 0,07207 $\pm 0,0227$ | 0,00000 $\pm 0,00000$ | 0,07207 $\pm 0,0182$ | 0,00000 $\pm 0,00000$ |

Tabla V.3.12. Resultados del Test exacto de diferenciación poblacional y su desviación estándar ($p \pm de$) (RAYMOND y ROUSSET, 1995) (en color amarillo, $P < 0,0035$).

| | CR_SCA | CR_CE | CR_CANT | NEO_CAT | NEO_CE | NEO_PAT | NEO_CAS | SJaPL | Pico Ramos | Longar | País Vasco | PI | Europa mediterranea | Europa central | Europa noreste |
|----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| CR_CE | 0,93512 $\pm 0,0022$ | | | | | | | | | | | | | | |
| CR_CANT | 0,19789 $\pm 0,0094$ | 0,10096 $\pm 0,0027$ | | | | | | | | | | | | | |
| NEO_CAT | 0,00011 $\pm 0,0001$ | 0,00012 $\pm 0,0001$ | 0,38583 $\pm 0,0075$ | | | | | | | | | | | | |
| NEO_CE | 0,00000 $\pm 0,0000$ | 0,00000 $\pm 0,0000$ | 0,33546 $\pm 0,0063$ | 0,14852 $\pm 0,0057$ | | | | | | | | | | | |
| NEO_PAT | 0,00002 $\pm 0,0000$ | 0,00008 $\pm 0,0001$ | 0,54119 $\pm 0,0041$ | 0,68141 $\pm 0,0045$ | 0,12457 $\pm 0,0050$ | | | | | | | | | | |
| NEO_CAS | 0,00001 $\pm 0,0000$ | 0,00000 $\pm 0,0000$ | 0,64594 $\pm 0,0049$ | 0,04239 $\pm 0,0012$ | 0,00070 $\pm 0,0004$ | 0,31359 $\pm 0,0051$ | | | | | | | | | |
| SJaPL | 0,00001 $\pm 0,0001$ | 0,00000 $\pm 0,0001$ | 0,04256 $\pm 0,0026$ | 0,01632 $\pm 0,0019$ | 0,00000 $\pm 0,0000$ | 0,00634 $\pm 0,0009$ | 0,00178 $\pm 0,0003$ | | | | | | | | |
| Pico Ramos | 0,00001 $\pm 0,0002$ | 0,00000 $\pm 0,0002$ | 0,09338 $\pm 0,0026$ | 0,48937 $\pm 0,0067$ | 0,0912 $\pm 0,0040$ | 0,05274 $\pm 0,0026$ | 0,01015 $\pm 0,0004$ | 0,52104 $\pm 0,0052$ | | | | | | | |
| Longar | 0,00001 $\pm 0,0003$ | 0,00000 $\pm 0,0003$ | 0,06492 $\pm 0,0017$ | 0,037977 $\pm 0,0039$ | 0,002741 $\pm 0,0020$ | 0,04261 $\pm 0,0035$ | 0,00316 $\pm 0,0004$ | 0,09674 $\pm 0,0029$ | 0,33161 $\pm 0,0046$ | | | | | | |
| País Vasco | 0,00000 $\pm 0,0000$ | 0,00000 $\pm 0,0000$ | 0,16854 $\pm 0,0098$ | 0,01297 $\pm 0,0016$ | 0,00000 $\pm 0,0000$ | 0,02960 $\pm 0,0040$ | 0,10729 $\pm 0,0054$ | 0,00000 $\pm 0,0000$ | 0,00013 $\pm 0,0001$ | 0,00004 $\pm 0,0002$ | | | | | |
| PI | 0,00000 $\pm 0,0000$ | 0,00000 $\pm 0,0000$ | 0,20209 $\pm 0,0091$ | 0,06078 $\pm 0,0026$ | 0,00000 $\pm 0,0000$ | 0,05583 $\pm 0,0058$ | 0,15944 $\pm 0,0077$ | 0,00000 $\pm 0,0000$ | 0,00000 $\pm 0,0000$ | 0,00000 $\pm 0,0000$ | 0,54528 $\pm 0,0144$ | | | | |
| Europa mediterranea. | 0,00000 $\pm 0,0000$ | 0,00000 $\pm 0,0000$ | 0,39864 $\pm 0,0084$ | 0,36325 $\pm 0,0116$ | 0,00000 $\pm 0,0000$ | 0,40842 $\pm 0,0070$ | 0,25149 $\pm 0,0119$ | 0,00000 $\pm 0,0000$ | | | |
| Europa central | 0,00000 $\pm 0,0000$ | 0,00000 $\pm 0,0000$ | 0,15162 $\pm 0,0073$ | 0,02598 $\pm 0,0025$ | 0,00236 $\pm 0,0006$ | 0,02634 $\pm 0,0028$ | 0,00076 $\pm 0,0005$ | 0,02708 $\pm 0,0051$ | 0,4026 $\pm 0,0117$ | 0,06949 $\pm 0,0064$ | 0,00000 $\pm 0,0000$ | 0,00000 $\pm 0,0000$ | 0,00000 $\pm 0,0000$ | | |
| Europa noreste | 0,00000 $\pm 0,0000$ | 0,00000 $\pm 0,0000$ | 0,26390 $\pm 0,0099$ | 0,11963 $\pm 0,0055$ | 0,00025 $\pm 0,0001$ | 0,06293 $\pm 0,0042$ | 0,02192 $\pm 0,0035$ | 0,11989 $\pm 0,0128$ | 0,78616 $\pm 0,0094$ | 0,79515 $\pm 0,0075$ | 0,00000 $\pm 0,0000$ | 0,00000 $\pm 0,0000$ | 0,00000 $\pm 0,0000$ | 0,00000 $\pm 0,0000$ | |
| PO | 0,00000 $\pm 0,0000$ | 0,00000 $\pm 0,0000$ | 0,62201 $\pm 0,0069$ | 0,23236 $\pm 0,0075$ | 0,00000 $\pm 0,0000$ | 0,21776 $\pm 0,0081$ | 0,09962 $\pm 0,0053$ | 0,00000 $\pm 0,0000$ |

Las muestras actuales del País Vasco, no presentan diferencias estadísticamente significativas entre si, ni con las poblaciones de la Península Ibérica; sin embargo, presentan diferencias significativas con las poblaciones tanto de Europa, como del Próximo Oriente.

Las poblaciones actuales localizadas en el Próximo Oriente, presentan diferencias estadísticamente significativas con todas las poblaciones actuales de Europa, indicando una diferenciación a nivel genético entre estas dos localizaciones geográficas.

Del análisis de diferenciación poblacional (Tabla V.3.11 y V.3.12), podemos destacar por un lado, la diferenciación genética existente de los cazadores-recolectores respecto al resto (neolíticas, calcolíticas y actuales). Y por otro lado, las poblaciones neolíticas de la Península Ibérica (NEO_CAT, NEO_CAS, NEO_PAT), a diferencia de las neolíticas de Europa central (NEO_CE), no muestran diferencias significativas con las poblaciones actuales comparadas (Europa y el Próximo Oriente).

Se han realizado diversos análisis multivariantes, basados en la distribución de las frecuencias de los haplogrupos mitocondriales en las poblaciones comparadas. Dos análisis de PCA (Figura V.3.2 y V.3.3) y un análisis de MDS (Figura V.3.4), con el fin de poder representar las diferencias y similitudes genéticas de las poblaciones comparadas.

En el caso de los datos obtenidos de los yacimientos de Los Cascajos y de Paternanbidea, al no mostrar diferencias estadísticamente

significativas y tratándose de yacimientos de igual cronología y localización, se han reunido en un solo grupo (NEO_CAS_PAT), a fin de dar una mayor robustez a los resultados.

En primer lugar se ha realizado un PCA (Figura V.3.2), teniendo en cuenta la distribución de los linajes mitocondriales de una antigüedad superior a los 10.000 años (pre-neolíticos), presentes en todos los grupos poblacionales comparados, con el fin de poder estimar la distribución de estas poblaciones en base a la variabilidad mitocondrial pre-neolítica.

En la Figura V.3.2, podemos observar los resultados de este primer análisis de componentes principales, que presenta una varianza total del 67%. La representación de las poblaciones respecto al primer eje, con una varianza del 47%, muestra en un extremo a las poblaciones europeas actuales y en el extremo opuesto a un grupo de poblaciones actuales del Próximo Oriente (Iraq, Siria, Armenia, Palestina y Kurdistan), quedando distribuidas el resto de las poblaciones comparadas entre estas dos posiciones extremas.

La representación de las poblaciones respecto al primer eje, se explica por la distribución de la frecuencia de aquellos haplogrupos con una mayor correlación para dicho eje, en concreto los haplogrupos H (-0,755), V (0,653) e I (0,646) (Figura V.3.2b). Las poblaciones europeas actuales están representadas en uno de los extremos del primer eje, debido a que presentan frecuencias más altas para los haplogrupos (60-55%), V (8-4%) e I (9-4%). Asimismo, debido a una menor frecuencia de estos haplogrupos en las poblaciones actuales del Próximo Oriente (33-

27% para el H, 3-1% para el V y 0% para el I), éstos se sitúan en el extremo opuesto.

Las poblaciones neolíticas muestran un comportamiento heterogéneo para el primer eje, debido a que no presentan la misma distribución para los haplogrupos pre-neolíticos con una mayor correlación para dicho eje.

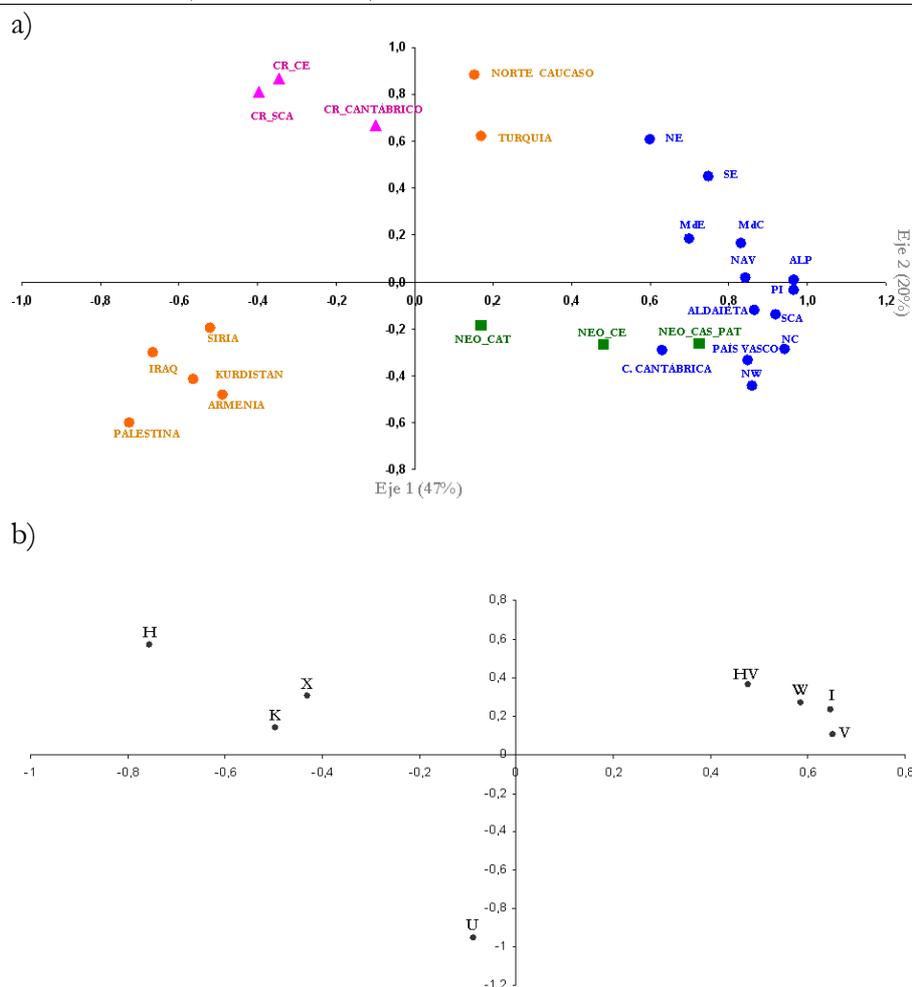
La población neolítica NEO_CAS_PAT, presenta una distribución de los haplogrupos con mayor correlación para el primer eje (H, V e I), similar al de las poblaciones actuales de Europa (frecuencias altas). Sin embargo, NEO_CE y NEO_CAT, presentan frecuencias más bajas para estos linajes.

En un extremo del segundo eje, con una varianza total del 20% (Figura V.3.2a), en un extremo se observan los cazadores-recolectores junto con la población de Turquía y el norte del Cáucaso, diferenciándose del resto de las poblaciones, tanto prehistóricas como actuales.

Esta distribución tan polarizada viene determinada fundamentalmente, por el haplogrupo U, que presenta una elevada correlación con el segundo eje (-0,949). Los cazadores-recolectores de Escandinavia (CR_SCA) y de Europa central (CR_CE) presentan el valor más elevado para este haplogrupo.

Figura V.3.2. Análisis de Componentes Principales de las poblaciones prehistóricas y actuales, teniendo en cuenta los haplogrupos con un origen pre-neolítico. a), Se ha considerado la distribución de las frecuencias de los haplogrupos mitocondriales de las poblaciones cazadoras-recolectoras (rosas), neolíticas (verde), europeas actuales (azul), del Próximo Oriente y norte del Cáucaso (naranja) b) Correlación de los haplogrupos de ADNmt con los ejes.

Abreviaturas de las poblaciones. Grupos cazadores-recolectores: escandinavos (CR_SCA), del centro de Europa (CR_CE) y de la zona cantábrica (CR_CANTÁBRICO). **Poblaciones neolíticas:** de Cataluña (NEO_CAT), del centro de Europa (NEO_CE) y de Los Cascajos y Paternanbidea (NEO_CAS_PAT). **Poblaciones actuales de Europa:** del este del Mediterráneo (MdE), Mediterráneo centro (MdC), Mediterráneo oeste (MdE), Noreste de Europa (NE), centro-norte de Europa (NC), noroeste de Europa (NW), sudeste europeo (SE), Escandinavia (SCA), Alpes (ALP), Península Ibérica (PI), País Vasco (PAIS VASCO) y poblaciones de la cornisa cantábrica (C. CANTÁBRICA)



Finalmente, respecto a las poblaciones neolíticas (NEO_CAT, NEO_CE y NEO_CAS_PAT), la variabilidad genética pre-neolítica presenta distintos grados de similitud con las poblaciones europeas actuales, siendo la población neolítica de NEO_CAS_PAT, la que presenta un mayor grado de similitud, que va disminuyendo en los grupos de NEO_CE. La población más dispar de las tres es NEO_CAT, lo cual podría ser debido a que el sustrato pre-neolítico conservado en estas poblaciones haya sido distinto.

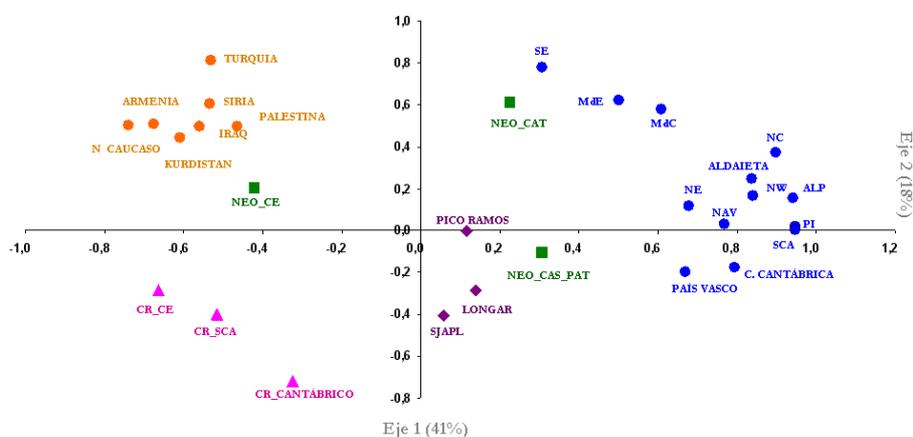
El segundo análisis de componentes principales (Figura V.3.3), en el que se han tenido en cuenta todos los haplogrupos mitocondriales, independientemente de su antigüedad, recoge un valor de la varianza total del 59%. El primer eje de este segundo PCA, con una varianza del 41%, establece una diferenciación entre las poblaciones actuales del Próximo Oriente y las europeas. Asimismo, también se observa una diferenciación temporal entre los cazadores-recolectores y el resto de las poblaciones prehistóricas incluidas en este análisis, neolíticas y calcolíticas, situándose estas últimas entre las poblaciones actuales del Próximo Oriente y Europa.

El comportamiento de las poblaciones neolíticas (NEO_CE, NEO_CAT, NEO_CAS_PAT) es heterogéneo respecto al primer eje, tal como ya apuntaban los resultados de los test estadísticos de diferenciación poblacional (Tabla V.3.11 y V.3.12). Las poblaciones neolíticas de la Península Ibérica (NEO_CAT y NEO_CAS_PAT), se sitúan más próximas a las poblaciones europeas actuales que los grupos neolíticos de Europa central (NEO_CE), situándose estos últimos próximos a la variabilidad actual de las poblaciones del Próximo Oriente.

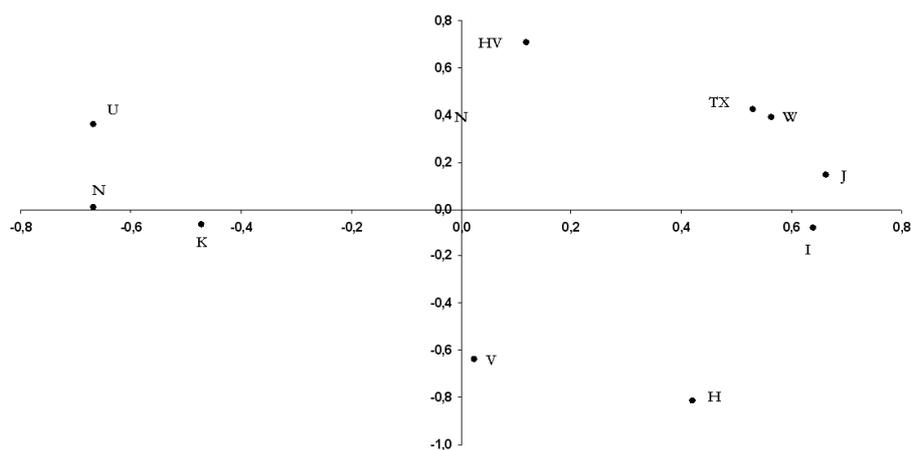
Figura V.3.3. Análisis de Componentes Principales de las poblaciones prehistóricas y actuales, a) considerando la distribución de todos los haplogrupos del ADNmt. Poblaciones cazadoras-recolectoras (rosas), neolíticas (verde), calcólicas del País Vasco (morado), europeas actuales (azul), del Próximo Oriente y norte del Cáucaso (naranja) b) Correlación de los haplogrupos de ADNmt con los ejes principales del análisis.

Abreviaturas de las poblaciones. Grupos cazadores-recolectores: escandinavos (CR_SCA), del centro de Europa (CR_CE) y de la zona cantábrica (CR_CANTÁBRICO). **Poblaciones neolíticas:** de Cataluña (NEO_CAT), del centro de Europa (NEO_CE) y de Los Cascajos y Paternanbidea (NEO_CAS_PAT). **Poblaciones calcólicas:** LONGAR, SJAPL y PICO RAMOS. **Poblaciones actuales de Europa:** del este del Mediterráneo (MdE), Mediterráneo centro (MdC), Noreste de Europa (NE), centro-norte de Europa (NC), noroeste de Europa (NW), sudeste europeo (SE), Escandinavia (SCA), Alpes (ALP), Península Ibérica (PI), País Vasco (PAIS VASCO) y poblaciones de la cornisa cantábrica (C. CANTABRICA)

a)



b)



Las poblaciones calcolíticas del País Vasco (Longar, SJaPL y Pico Ramos), se encuentran dentro del mismo rango de variabilidad que las poblaciones del neolítico de la misma zona geográfica (NEO_CAS_PAT).

El segundo eje del PCA, con una varianza del 18%, no se observa una clara diferenciación entre las poblaciones incluidas en el análisis. Sin embargo, se muestra una diferenciación entre las poblaciones neolíticas la Península Ibérica (NEO_CAS_PAT, NEO_CAT). La variabilidad de NEO_CAT se engloba dentro de las poblaciones del este y centro del mediterráneo (MdE y MdC), y las del sureste europeo (SE) y la población de NEO_CAS_PAT, con las poblaciones calcolíticas del País Vasco y las poblaciones actuales de la cornisa cantábrica.

Los haplogrupos que presentan una mayor correlación con el primer eje, y por lo tanto, son los que explican en mayor grado la variabilidad recogida por el mismo, son los haplogrupos U (-0,667), N (-0,666), J (0,6663) e I (0,640), siendo muy próximos a estos el W (0,563) y TX (0,529). La distribución de las poblaciones en este eje viene determinada por una diferente combinación de las frecuencias de estos haplogrupos.

En el caso del haplogrupo U, las poblaciones actuales del Próximo Oriente presentan un frecuencia entre el 27-21%, mientras que en las europeas los valores disminuyen hasta el 18-10,5%. Asimismo, el haplogrupo U presenta valores muy elevados en los cazadores-recolectores (entre 80-50%), siendo éste uno de los motivos por los que se sitúan estas poblaciones en un extremo del primer eje. En los grupos neolíticos la frecuencia del haplogrupo U es muy variable, 4% en

NEO_CE, 9% en NEO_CAT y 21% en NEO_CAS_PAT, siendo los valores de NEO_CAS_PAT similares a los obtenidos en las poblaciones calcolíticas del País Vasco (SJaPL, Pico Ramos y Longar) (15-18%).

En relación a los haplogrupo I y J, no se observan unas diferencias tan acusadas. El haplogrupo I presenta una frecuencia baja o nula en la mayoría de las poblaciones incluidas en el análisis. Los valores más elevados corresponden a las poblaciones europeas actuales (4-1%), estando ausente en las poblaciones cazadoras-recolectoras. En las poblaciones neolíticas, los valores del haplogrupo I son variables, la población NEO_CE no presenta ningún individuo perteneciente a este haplogrupo, mientras que la población NEO_CAT presenta un valor del 9,1% y la población de NEO_CAS_PAT de un 3,12%.

En las muestras prehistóricas los valores más altos para el haplogrupo J se encuentran en la población NEO_CAT (18%), en las poblaciones calcolíticas del País Vasco (SJaPL, Longar y Picos Ramos) (~16%) y la población NEO_CAS_PAT (6,25%). El aporte del haplogrupo J es mayor en estas regiones, comparado con el grupo NEO_CE (4%).

El superhaplogrupo N viene representado principalmente por el haplogrupo N1a, que muestra una elevada frecuencia en NEO_CE (25%) y siendo inexistente en el resto de las poblaciones prehistóricas. En las poblaciones europeas actuales presenta una frecuencia muy baja (0,2%), siendo las poblaciones del Próximo Oriente las que muestran un valor mayor (0,9%).

En este primer eje se observa una disposición heterogénea de los grupos neolíticos incluidos en el análisis. Los grupos neolíticos de Europa central (NEO_CE) se sitúan próximos a los cazadores-recolectores y los del Próximo Oriente, debido principalmente a la baja frecuencia del haplogrupo J (4%), ausencia del haplogrupo I y una elevada frecuencia para N1a (25%). En el lado opuesto, se encontrarían las poblaciones neolíticas de la Península Ibérica (NEO_CAT y NEO_CAS_PAT) ya que presentan fundamentalmente, valores mayores del los haplogrupos J e I.

En cuanto a la representación de la variabilidad observada en el segundo eje, son los haplogrupos HV (0,718), H (-0,666) y próximos a éstos el V (-0,54), los que presentan la correlación más alta. La población actual del Próximo Oriente presenta los valores más altos para el haplogrupo HV (17,5-4%), siendo los valores de las poblaciones europeas más bajos (6-1%).

La distribución del haplogrupo HV en las poblaciones prehistóricas sigue un patrón heterogéneo. En los cazadores-recolectores solo se encuentra en CR_CE (4,5%) y en los neolíticos en la población de Europa central (8%). En los neolíticos analizados en este trabajo, NEO_CAS_PAT, presenta una frecuencia del 5,5% y las poblaciones calcolíticas del País Vasco (Longar, SJAPL y Pico Ramos), no han proporcionado ningún individuo perteneciente a este haplogrupo.

La frecuencia del haplogrupo H alcanza los valores más elevados en las poblaciones europeas (45-50%), mientras que en las poblaciones del Próximo Oriente este valor es más bajo (~29%). En los cazadores

recolectores, solo se encuentran representantes de este haplogrupo en CR_CANTÁBRICO (25%, 1 de los cuatro individuos). Las poblaciones neolíticas presentan unos valores para el haplogrupo H muy heterogéneas: NEO_CE los valores más bajos (16%), NEO_CAT un valor intermedio (36,3%) y, por último, la población NEO_CAS_PAT, el valor más elevado (52%). El valor hallado en NEO_CAS_PAT es el más próximo al observado en las poblaciones calcolíticas del País Vasco (Longar, SJAPL y Pico Ramos) (46-37%) y en las poblaciones actuales del País Vasco y de la cornisa cantábrica (49-51%).

En cuanto al haplogrupo V, es inexistente en la mayoría de las poblaciones prehistóricas, a excepción de NEO_CAT (4%) y CR_CE (5,8%). La frecuencia del haplogrupo V presenta valores más altos en las poblaciones europeas actuales (12-4%), mientras que en el Próximo Oriente únicamente aparece en Siria (2,3%), Turquía (1%) y Norte del Cáucaso (3,2%).

Este análisis de componentes principales, donde se han incluido todos los haplogrupo obtenidos (Figura V.3.3), completa la información que se mostraba en el anterior análisis, donde únicamente se incluían los haplogrupos con un origen pre-neolítico (Figura V.3.2). El resultado más claro es el hiato que se observa entre los cazadores-recolectores (CR_SCA, CR_CE y CR-CANTÁBRICO) y las poblaciones actuales, mientras que las poblaciones neolíticas (NEO_CAT, NEO_CE y NEO_CAS_PAT) y calcolíticas (Longar, SJAPL y Pico Ramos), se sitúan entre ambas.

Los grupos neolíticos tienen un comportamiento heterogéneo, los neolíticos de Europa central (NEO_CE) son los más dispares, se encuentran más próximos a las poblaciones actuales del Próximo Oriente que al resto de poblaciones neolíticas (NEO_CAT y NEO_CAS_PAT). La razón de ello se debe en gran medida a la ausencia del haplogrupo I, la baja frecuencia del haplogrupo J (4%) y la elevada frecuencia del N1a (25%). La población neolítica catalana se aproxima a la variabilidad de las poblaciones actuales de la zona del mediterráneo (MdE, MdC) y el sur este de Europa. En cambio la población neolítica de Los Cascajos y Paternanbidea, se sitúa entre los grupos de cazadores-recolectores del cantábrico y las poblaciones actuales del norte de la Península Ibérica junto con las poblaciones calcolíticas de esta región.

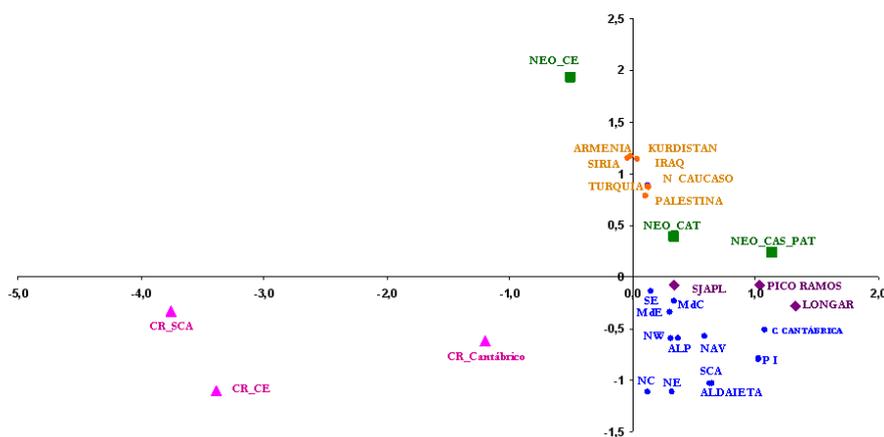
Finalmente, se ha realizado un análisis de escalamiento multidimensional (MDS) (Figura V.3.4), en el cual se obtiene una representación en dos dimensiones de una matriz de distancias genéticas F_{ST} , valores calculados en función de la frecuencia de los haplogrupos mitocondriales. El resultado de este análisis se muestra en la Figura V.3.4, con un RSQ de 0,98 y un estrés del 0,10. En este análisis se corroboran y se aclaran los resultados obtenidos previamente con los análisis estadísticos y los dos PCAs.

Se verifica la diferenciación de los cazadores-recolectores (CR_SCA y CR_CE) respecto al resto de las poblaciones comparadas. El comportamiento diferente de los cazadores-recolectores del cantábrico puede ser debido al pequeño tamaño muestral. Los neolíticos de centro Europa se diferencian de los cazadores-recolectores y se sitúan más cerca de las poblaciones actuales del Próximo Oriente, ya que NEO_CE

presenta similitudes en la frecuencia de los haplogrupos con las poblaciones del Próximo Oriente (valores semejantes para los haplogrupos V [$\sim 4\%$], HV [11-7%] e I [1-3%]).

Figura V.3.4. Análisis de Escalamiento Multidimensional (MDS) considerando las distancias genéticas F_{st} calculadas a partir de la distribución de las frecuencias de los haplogrupos del ADNmt de las poblaciones de Calcolítico del País Vasco (morado), poblaciones del Neolítico (verde), Norte del Cáucaso y del Próximo Oriente (naranja) y las poblaciones europeas actuales (azul)

Abreviaturas de las poblaciones. Grupos cazadores-recolectores: escandinavos (CR_SCA), del centro de Europa (CR_CE) y de la zona cantábrica (CR_CANTÁBRICO). **Poblaciones neolíticas:** de Cataluña (NEO_CAT), del centro de Europa (NEO_CE) y de Los Cascajos y Paternambidea (NEO_CAS_PAT). **Poblaciones calcolíticas:** LONGAR, SJAPL y PICO RAMOS. **Poblaciones actuales de Europa:** del este del Mediterráneo (MdE), Mediterráneo centro (MdC), Mediterráneo oeste (MdO), Noreste de Europa (NE), centro-norte de Europa (NC), noroeste de Europa (NW), sudeste europeo (SE), Escandinavia (SCA), Alpes (ALP), Península Ibérica (PI) y poblaciones de la cornisa cantábrica en donde se incluye el País Vasco (C. CANTÁBRICA)



Asimismo, la población de NEO_CE también se presenta distante con las poblaciones actuales de la misma región. Sin embargo, las poblaciones neolíticas de la Península Ibérica, se sitúan entre la variabilidad de las poblaciones europeas actuales y las del Próximo Oriente, de un modo

similar al comportamiento de las poblaciones calcolíticas del País Vasco (Longar, SJaPL y Pico Ramos).

V.3.4. DISCUSIÓN

En el presente estudio se ha llevado a cabo la caracterización genética de los individuos recuperados en nueve yacimientos arqueológicos del norte de la Península Ibérica (Navarra, País Vasco y Cantabria). La cronología de estos yacimientos abarca desde el periodo Magdaleniense hasta la Edad del Bronce.

De los 42 individuos analizados, se han obtenido un total de 22 haplotipos mitocondriales diferentes, siendo estos resultados excepcionales y muy útiles, ya que permiten conocer la transición acontecida en la franja cantábrica de la Península Ibérica, desde una economía cazadora-recolectora a una economía productora, asociada al Neolítico. La interpretación de estos datos se realiza a la luz de las hipótesis planteadas hasta el momento sobre el origen de la variabilidad genética actual y sobre la influencia de la neolitización en las poblaciones cazadoras-recolectoras (ver apartado V.3.1).

Los resultados del ADNmt nos indican la existencia de una elevada variabilidad genética tanto en las poblaciones neolíticas como en los grupos de cazadores-recolectores analizados en este estudio. Si observamos los haplotipos mitocondriales existentes durante este rango de tiempo (desde el periodo Magdaleniense hasta la actualidad), podemos apreciar la presencia de los mismos haplotipos tanto en individuos de la

época Magdaleniense, como en las poblaciones neolíticas y en la población actual, aunque con una distribución de frecuencias diferente.

La variabilidad haplotípica resultante de los yacimientos estudiados, nos ha proporcionado dos haplotipos mitocondriales únicos, denominados ht12 y ht15 (Tabla V.2.2 y V.2.3), que solo se han encontrado en sendos individuos recuperados del yacimiento de Los Cascajos. En el resto de las poblaciones prehistóricas y actuales publicadas en la bibliografía, no se han encontrado estas secuencias haplotípicas. Este hecho puede deberse a que estos haplotipos, que se encontraban en poblaciones neolíticas del norte de la Península Ibérica, se han extinguido a lo largo de las sucesivas generaciones debido a diversos fenómenos demográficos (cuello de botella, deriva génica, ausencia de descendientes femeninos).

Los grupos de cazadores-recolectores analizados en este estudio (La Pasiega, La Chora, Aizpea y Erralla), presentan haplotipos mitocondriales que se encuentran dentro de la variabilidad de la población actual europea, aunque con diferentes frecuencias. Mientras que algunos haplotipos han mantenido o aumentado su frecuencia desde su origen hasta la actualidad (haplogrupo H), otros han disminuido (haplogrupo U, I e HV), sea por efecto del flujo génico, deriva genética u otro fenómeno demográfico. En las poblaciones neolíticas analizadas en el presente estudio, también se observa una gran variabilidad de haplotipos mitocondriales. Todos los haplotipos hallados en las poblaciones neolíticas han persistido hasta la actualidad (excepto el ht12 y ht15), aunque no en todos los casos coincide la distribución de sus frecuencias en ambos periodos.

Tal como se observa en las Tablas V.3.2 y V.3.3, toda la variabilidad de haplotipos mitocondriales resultante se puede clasificar en seis haplogrupos: H, I, J, K, U y HV, los cuales se encuentran entre los haplogrupos mitocondriales más frecuentes de Europa. Los haplogrupos mitocondriales presentes en Europa fueron introducidos tras la primera colonización de Europa por los HSAM hace ~45-40 kya, así como en posteriores colonizaciones ocurridas a lo largo del Paleolítico, el Neolítico y en contactos más recientes (TORRONI *et al.*, 1998; RICHARDS *et al.*, 2000).

La mayoría de los haplogrupos están ampliamente distribuidos entre las poblaciones euroasiáticas, tal es el caso de los haplogrupos H, I, J, K, T y W. El haplogrupo X, es un haplogrupo compartido tanto por europeos, como por amerindios. El haplogrupo U5 y V presentan un origen *in situ* en Europa. El superhaplogrupo asiático M, tan sólo tiene unos pocos representantes en Europa, al igual que los haplogrupos africanos L1 y L2 (TORRONI *et al.*, 1998).

Entre los haplogrupos mitocondriales europeos, el haplogrupo H muestra dos características únicas: una distribución geográfica extensa y una alta frecuencia en la mayor parte de su área de distribución. Es, sin duda alguna, el haplogrupo más frecuente en las poblaciones europeas actuales (exceptuando a los Saami), y también es común en el Norte de África, Oriente Medio, Norte de la India y en Asia Central, lugares donde presenta frecuencias entre el 5-10% (RICHARDS *et al.*, 2002).

Se ha propuesto que el haplogrupo H se originó en el Próximo Oriente hace 17,5 kya (SOARES *et al.*, 2010), extendiéndose por Europa posiblemente asociado a la difusión de la tecnología gravetiense durante el Paleolítico y, asimismo, estuvo implicado en las expansiones ocurridas desde los refugios glaciales tras el LGM (TORRONI *et al.*, 1998; RICHARDS *et al.*, 2000; SOARES *et al.*, 2010).

ACHILLI *et al.*, (2004) muestran la disección del haplogrupo H, en al menos 15 subhaplogrupos (H1-H15) definidos mediante mutaciones características existentes tanto en la región control, como en la región codificante. Los dos subhaplogrupos que presentan las frecuencias más elevadas son el H1 y el H3.

El subhaplogrupo H1 engloba una gran proporción de la variabilidad del haplogrupo H en la parte occidental de su distribución y muestra picos de mayor frecuencia en la población vasca (27,8%), Marruecos (19,2%) y Cerdeña (17,9%). Comparado con H1, el subhaplogrupo H3 representa una fracción menor del haplogrupo H. Sin embargo, tiene sus frecuencias más altas en la Península Ibérica (ENNAFAA *et al.*, 2009), presentando la población vasca una frecuencia del 13,9% y los gallegos del 8,3%. Se observa por tanto, una coincidencia entre las áreas geográficas que presentan las frecuencias más altas tanto para el haplogrupo H1, como para el H3 (ACHILLI *et al.*, 2004).

La edad de coalescencia del haplogrupo H es de 17,5 kya y las edades de coalescencia para el H1 y el H3, son algo menores, 11,1 y 11,5 kya respectivamente (SOARES *et al.*, 2010). Estas edades de coalescencia se

solapan con la del haplogrupo V ($11,2\pm 2,7$ kya), por lo que se ha propuesto un origen conjunto para H1, H3 y V, con una edad de coalescencia de $11,3\pm 0,9$ kya.

Aunque la distribución del haplogrupo H es uniforme prácticamente en toda Europa, los subhaplogrupos H1 y H3 muestran un gradiente casi idéntico, muy acusado y no homogéneo, es decir, un pico central en el suroeste de Europa (Norte de la Península Ibérica y Sudoeste de Francia) y unas frecuencias que van disminuyendo desde este núcleo central hacia el nordeste y sudeste (ACHILLI *et al.*, 2004).

Este planteamiento ha sido cuestionado en un reciente artículo (GARCÍA *et al.*, 2010), en el que al analizar la frecuencias de estos haplogrupos en la cornisa cantábrica, se observa una tendencia clinal más longitudinal que latitudinal para estos haplogrupos, siendo los valores de diversidad más elevados en la zona mediterránea, donde se han incluido Cataluña y el sureste de Francia.

En el presente estudio se ha obtenido una elevada frecuencia de los haplotipos pertenecientes al haplogrupo H (45%). De los nueve yacimientos analizados, el haplogrupo H está presente en individuos recuperados de los yacimientos de La Pasiega, Fuente Hoz, Urtiaga, Los Cascajos y Paternanbidea; mostrándose evidencias de que este haplogrupo ha subsistido en esta región, desde el periodo Magdaleniense hasta la actualidad. La frecuencia de este haplogrupo en los yacimientos analizados (45%), es similar a la que se observa actualmente en la población europea y vasca.

También cabe destacar la presencia de individuos pertenecientes al subhaplogrupo H3, que está representado de forma exclusiva en dos individuos del yacimiento neolítico de Paternanbidea. Este haplogrupo estaba presente en el norte de la Península Ibérica al menos desde el Neolítico, lo cual es compatible con la edad de coalescencia estimada para este subclado del H (11,5 kya, SOARES *et al.*, 2010).

El haplogrupo V fue propuesto como un marcador de la recolonización post-glacial desde el refugio franco-cantábrico hacia el norte de Europa (TORRONI *et al.*, 1998), dada la elevada frecuencia y diversidad encontrada en una muestra de vascos (20%) y otra de catalanes actuales (24%). Estos datos pueden haber estado influidos por un error de muestreo, ya que en posteriores estudios, con muestras de mayor tamaño, disminuyó su frecuencia en los vascos a un ~10-12% (TORRONI *et al.*, 2001 y LARRUGA *et al.*, 2001) y a un ~5,5-4% (ALFONSO-SANCHEZ *et al.*, 2008 y datos no publicados respectivamente).

La hipótesis propuesta por TORRONI *et al.*, (1998) fue rebatida con datos de ADN_a por IZAGIRRE y DE LA RÚA (1999), ya que no encontraron ningún individuo perteneciente al haplogrupo V en un centenar de muestras calcolíticas del País Vasco y señalaron una heterogeneidad en las frecuencias del haplogrupo V en las distintas muestras de vascos actuales. En IZAGIRRE y DE LA RÚA (1999), se concluía que la mutación que define el haplogrupo V pudo aparecer en refugios glaciares de la cornisa cantábrica, en un momento en el que el tamaño efectivo de la población era lo suficientemente pequeño como para permitir que la deriva génica diferenciara los distintos grupos poblacionales de esta

región, pudiendo ser ésta la razón de la heterogeneidad observada en las muestras vascas actuales.

En un reciente estudio GARCÍA *et al.*, (2010), analizaron la variabilidad del ADNmt en el norte de la Península Ibérica, obteniendo una frecuencia para el haplogrupo V que muestra un pico central en Cantabria (19%), que disminuye hacia el oeste de la franja cantábrica (5,6% en Asturias y 3,8% en Galicia), presentando en la población vasca un rango entre 11,7-5,9%. Los valores de diversidad obtenidos en la franja cantábrica para este haplogrupo, son menores a los observados en el lado mediterráneo, que incluye Cataluña y el sureste de Francia.

Por lo tanto, GARCÍA *et al.*, (2010) proponen que la reexpansión post-glacial desde los refugios de la cornisa cantábrica, siguió una tendencia clinal longitudinal, en lugar de latitudinal, donde se considera también como posible foco de origen, la región de Cataluña y el sureste de Francia.

En el presente trabajo, en las 42 muestras prehistóricas analizadas, no se ha encontrado ningún individuo perteneciente al haplogrupo V, mientras que en la muestra de navarros actuales este haplogrupo alcanza una frecuencia de 3% (valor semejante al que hemos obtenido en una muestra de vascos actuales (4%; datos no publicados). Este haplogrupo, tampoco se ha encontrado en los neolíticos catalanes, habiéndose descrito, únicamente en los neolíticos de Europa central (4%).

La interpretación de estos datos de ADN_a, en el contexto de las hipótesis existentes sobre el origen y difusión del haplogrupo V en Europa, parece indicar que la subestructuración detectada en las poblaciones actuales de la franja cantábrica y el noreste de la Península Ibérica, también pudo haber existido en el pasado, de forma que las frecuencias de este haplogrupo pudieran presentar grandes variaciones en el área mencionada, debido a la deriva genética.

La presencia de los haplotipos pertenecientes al haplogrupo U en las poblaciones analizadas, merece una mención especial, ya que éste es uno de los haplogrupos más antiguos existentes en Europa. Su origen se asocia a la aparición y expansión en Europa de los HSAM, estimándose su edad en 45-50 kya (RICHARDS *et al.*, 2000). Se subdivide en al menos 8 subhaplogrupos y éstos a su vez se clasifican en decenas de subclados. Los subhaplogrupos del U menos frecuentes en la población europea actual son el U1, U2, U3 y U7, sin embargo muestran frecuencias elevadas en el Próximo Oriente y el oeste de Asia (METSVALU *et al.*, 2004).

La frecuencia obtenida para el haplogrupo U en las poblaciones prehistóricas analizadas (28%), es mayor a la que presentan las poblaciones actuales europeas (17%) y del País Vasco (18,2-14,5%) (RICHARDS *et al.*, 2000; ALFONSO-SÁNCHEZ *et al.*, 2007).

El haplogrupo U, que es el segundo más frecuente en las poblaciones estudiadas en el presente trabajo (28%), está presente en los yacimientos de Erralla, Aizpea, Paternabidea, Los Cascajos, Fuente Hoz y Urtiaga

(Figura V.3.2 y V.3.3), lo que indica la pervivencia de este haplogrupo en yacimientos de diferente cronología, desde la época Magdaleniense hasta la actualidad. La frecuencia del haplogrupo U en las muestras prehistóricas está más próxima a la hallada en las poblaciones actuales del Próximo Oriente (21,7%) (RICHARDS *et al.*, 2000). Sin embargo, hay que tener en cuenta que en el Próximo Oriente los subhaplogrupos U1, U2, U3 y U7 presentan frecuencias elevadas y sin embargo en las poblaciones prehistóricas analizadas no se ha encontrado ningún individuo perteneciente a estos subhaplogrupos del U.

Los grupos poblacionales de cazadores-recolectores (CR_SCA, CR_CANTÁBRICO y CR_CE) presentan elevadas frecuencias del haplogrupo U5 (40%, 50% y 64%, respectivamente), frecuencia muy superior a la encontrada en las poblaciones actuales de Europa (10,1%) y País Vasco (12%). En los yacimientos neolíticos del País Vasco, el haplogrupo U5 se ha encontrado en un individuo de Fuente Hoz y en otro de Los Cascajos, estando sin embargo ausente en las poblaciones neolíticas de Europa central y Cataluña.

La variación en la frecuencia del haplogrupo U5 entre los diferentes grupos de cazadores-recolectores, es coherente con la dispersión y el tamaño poblacional de los grupos paleolíticos. La disminución de la frecuencia del haplogrupo U5 que muestran los grupos neolíticos analizados hasta el momento, podría deberse al influjo genético de otros grupos humanos durante el Neolítico. Por otro lado, la presencia de este haplogrupo en poblaciones actuales, con una frecuencia de 10-25%,

permite sugerir que parte de la variabilidad del *pool génico* actual procede del Paleolítico, al menos para este subclado del U.

El haplogrupo U8 se divide entre otros, en el U8a, U8b y el haplogrupo K, siendo la población vasca actual la que presenta la filogenia más ancestral en Europa para el U8a, con una frecuencia del 1,1%. Por ello se ha sugerido que este haplogrupo se habría originado en este área, durante el Paleolítico Superior (GONZALEZ *et al.*, 2006).

En las muestras prehistóricas analizadas en el presenta estudio (42 individuos) no se ha encontrado ningún individuo perteneciente al haplogrupo U8. Tampoco se ha encontrado ningún individuo perteneciente a este haplogrupo en las muestras prehistóricas europeas analizadas hasta el momento. Creemos que la ausencia de este haplogrupo en las poblaciones antiguas, puede ser debida a un error de muestreo, en el que influye la frecuencia de este haplogrupo en el pasado, que pudo ser baja (al igual que en la actualidad).

El haplogrupo K presenta un origen más reciente comparado con el resto de subhaplogrupos del U, con una edad de coalescencia de hace 31,6 kya (SOARES *et al.*, 2010). Las poblaciones neolíticas de Los Cascajos y Paternanbidea y la población neolítica de Europa central presentan frecuencias similares para el haplogrupo K (14% y 16%, respectivamente).

Sin embargo, en la población neolítica de Cataluña no se ha encontrado ningún individuo perteneciente al haplogrupo K. En cuanto a los

cazadores-recolectores europeos (CR_CE, CR_SCA, CR_CANTABRICO), no se ha encontrado ningún representante del haplogrupo K, a excepción de un individuo del yacimiento de La Chora analizado en este trabajo.

La frecuencia del haplogrupo K en las poblaciones calcolíticas vascas analizadas por nuestro grupo de investigación (Longar, SJaPL y Pico Ramos) (23-16,7%), tiene valores elevados, semejantes a las poblaciones neolíticas. Actualmente, la frecuencia de este haplogrupo presenta valores más bajos, tanto en las poblaciones europeas (8-5%) como del Próximo Oriente (10-8%), habiéndose obtenido los valores más bajos en la población vasca actual (4%) y en la muestra de navarros que hemos analizado en el presente estudio (3%). Éste sería un caso de pervivencia de los linajes pre-neolíticos hasta la actualidad, pero donde su frecuencia ha disminuido a lo largo de las sucesivas generaciones.

El haplogrupo J ha sido propuesto como marcador de la expansión de los agricultores neolíticos, debido a su distribución en las poblaciones euroasiáticas actuales y a su edad de coalescencia (7-6,6 kya) (RICHARDS *et al.*, 2000). La baja frecuencia hallada para el haplogrupo J en una muestra de vascos actuales (2,4%) (RICHARDS *et al.*, 2000), apoyó la idea de que la población vasca habría sufrido un menor impacto de la expansión de los agricultores neolíticos que otras poblaciones europeas (BERTRANPETIT *et al.*, 1995; CAVALLI-SFORZA y MINCH, 1997; GONZÁLEZ *et al.*, 2003).

Sin embargo, datos recientes sobre una muestra de la población vasca actual, indican una frecuencia del 14,5% para el haplogrupo J (ALFONSO-

SÁNCHEZ *et al.*, 2008). Este valor, a su vez, son muy semejante a los hallados en las poblaciones calcolíticas e histórica vascas estudiadas por nuestro grupo de investigación (~16,7% y un 14% respectivamente) (IZAGIRRE y DE LA RÚA, 1999; ALZUALDE *et al.*, 2005, 2006).

Las muestras neolíticas de Los Cascajos y Paternanbidea presentan un valor del 6,25% para el haplogrupo J, que es algo superior al que muestran los neolíticos de centro Europa (4%) e inferior al hallado en los neolíticos catalanes (18%).

Si aceptamos la propuesta realizada por RICHARDS *et al.*, (2000), según la cual el haplogrupo J sería un marcador de la difusión del neolítico, y teniendo en cuenta las frecuencias del haplogrupo J en las poblaciones prehistóricas analizadas en este trabajo (Tabla V.3.3), podemos decir que la influencia cultural neolítica observada en los yacimientos vascos ha ido acompañada de aporte genético, el cual también se observa en las demás poblaciones neolíticas estudiadas hasta ahora. Por otro lado, la heterogeneidad observada en la frecuencia del haplogrupo J en las diferentes poblaciones neolíticas analizadas, sugiere que el proceso de neolitización fue diferente en las diferentes regiones geográficas.

El haplogrupo HV, se originó hace ~30 kya, y alcanza su valor máximo en el Próximo Oriente (9,45%), presentando en Europa frecuencias más bajas (2,6%) (RICHARDS *et al.*, 2000). El yacimiento neolítico de Paternanbidea ha proporcionado un individuo perteneciente al haplogrupo HV, siendo éste el único caso que se ha encontrado en las

muestras prehistóricas analizada en el presente estudio (3,12% en NEO_CAS-PAT).

El haplogrupo I que tiene una antigüedad de ~24,7 kya (SOARES *et al.*, 2010), presenta muy bajas frecuencias en las poblaciones de Eurasia occidental, con una representación ligeramente mayor en el noroeste de Europa. Al igual que en el caso del haplogrupo HV, solo se ha encontrado un individuo perteneciente a este haplogrupo en la población de Paternabidea (3,12% NEO_CAS_PAT). Si analizamos los datos publicados en muestras prehistóricas, se observa una frecuencia elevada en la población neolítica de Cataluña (9%), estando ausente en los neolíticos de Europa central.

La distribución de los haplogrupos HV e I, es heterogénea en las poblaciones prehistóricas de Europa. En los cazadores-recolectores, sólo se ha detectado el haplogrupo HV, que tiene una frecuencia del 4% en NEO_CE. Los NEO_CAT solo presentan el haplogrupo I (9%) y los NEO_CE el haplogrupo HV (3%), mientras que en NEO_CAS_PAT, tanto el haplogrupo HV como el I presentan una frecuencia de 3,12%. La heterogeneidad en la frecuencia de estos haplogrupos, puede ser el reflejo de diferencias en la composición genética de las poblaciones neolíticas de Europa, debidas a la influencia diferencial de los grupos neolíticos originarios del Próximo Oriente en las distintas regiones geográficas de Europa.

Una consideración aparte requiere el haplogrupo N1a, propuesto por HAAK *et al.*, (2005), como un posible marcador genético de los primeros

agricultores neolíticos, que vivieron en el centro de Europa hace 7.500 años. La frecuencia del haplogrupo N1a es elevada (25%) en las muestras neolíticas de esta zona, 150 veces superior a la que presenta la población europea actual de la misma zona, 0,2%. Teniendo en cuenta la elevada frecuencia del haplogrupo N1a en los primeros neolíticos y su posterior dilución, hasta llegar a valores muy bajos en la población actual (0,2%), se propuso que estos primeros agricultores neolíticos no habrían contribuido al *pool* génico de los Europeos actuales (HAAK *et al.*, 2005).

Sin embargo, recientemente el mismo grupo de investigación incorporó datos de cazadores-recolectores de esta misma región, y no encontraron ningún representante del haplogrupo N1a, aunque si un valor muy elevado del haplogrupo U, principalmente del U5 y U4 (BRAMANTI *et al.*, 2009). Estos datos fueron interpretados como prueba de la existencia de una discontinuidad genética entre los cazadores-recolectores y los grupos neolíticos. Esta discontinuidad podría ser el reflejo del influjo genético de grupos neolíticos provenientes de otras regiones (BRAMANTI *et al.*, 2009). En las muestras prehistóricas analizadas en el presente estudio, y en los NEO_CAT (SAMPIETRO *et al.*, 2007), el haplogrupo N1a está ausente, lo que podría indicar que de existir una influencia genética proveniente de grupos neolíticos del Próximo Oriente en estos yacimientos de la Península Ibérica, ésta no sería semejante a la de Europa central

A la vista de estos resultados, podemos concluir que las muestras prehistóricas analizadas en este trabajo, pertenecientes a distintas cronologías, comparten los mismos haplotipos, que también están

presentes en la población actual. En los yacimientos neolíticos se observa la presencia de linajes mitocondriales cuyas edades de coalescencia se sitúan tanto en el periodo Paleolítico como en el Neolítico. Estos datos nos indican que los linajes mitocondriales se han mantenido en la región norte de la Península Ibérica desde los grupos de cazadores-recolectores hasta la actualidad. Además, si comparamos los datos obtenidos en la muestra analizada con el resto de poblaciones prehistóricas de la bibliografía, observamos, que las frecuencias de los haplogrupos de los cazadores-recolectores son bastante homogéneas, principalmente dada la elevada frecuencia del haplogrupo U en todos ellos.

Los yacimientos neolíticos de Fuente Hoz y Marizulo, así como el yacimiento de la Edad del Bronce de Uritaga, analizados en este estudio, no se incluyen en los diferentes análisis estadísticos y multivariantes, debido a su reducido tamaño muestral. Sin embargo, podemos señalar que en estos yacimientos se han encontrado individuos pertenecientes a los haplogrupos, U, U5, K y H (Tabla V.3.2 y V.3.3). Las edades de coalescencia de estos haplogrupos se engloban en el periodo preneolítico. Además, comparten haplotipos con otras poblaciones de la misma región geográfica, tanto de cazadores-recolectores, neolíticos, como actuales.

Por lo tanto, los individuos de los yacimientos de Fuente Hoz, Marizulo y Urtiaga entran en el rango de variabilidad del ADNmt de otros grupos neolíticos del País Vasco.

A partir de las frecuencias de los haplogrupos mitocondriales obtenidos en el presente estudio, se ha realizado una comparación entre las

poblaciones prehistóricas y actuales tanto de Europa como del Próximo Oriente, mediante diferentes tests de diferenciación poblacional (Tabla V.3.11 y V.3.12). De este análisis, podemos destacar, que los grupos de cazadores-recolectores presentan diferencias estadísticamente significativas respecto a las poblaciones neolíticas y actuales, a excepción de los cazadores-recolectores de la zona cantábrica, lo que atribuimos al pequeño tamaño muestral de estos últimos. Asimismo, hemos observado una diferenciación estadísticamente significativa entre las poblaciones actuales del Próximo Oriente y de Europa.

Las poblaciones neolíticas de la Península Ibérica (NEO_CAT, NEO_CAS_PAT) y de Europa central (NEO_CE), no muestran el mismo grado de diferenciación respecto a las poblaciones actuales comparadas (Europa y el Próximo Oriente). Sólo NEO_CE muestra diferencias estadísticamente significativas con las poblaciones actuales y con los neolíticos de NEO_CAS. Estos resultados señalan la diferenciación genética de los neolíticos de Europa central.

Con el fin de poder representar e interpretar la variabilidad del ADNmt de las diferentes poblaciones, se han realizado diversos análisis multivariantes.

El primero de ellos es un PCA (Figura V.3.2), donde solo se han considerado las frecuencias de los haplogrupos mitocondriales con una edad de coalescencia anterior al periodo neolítico (HV, H, U, V, I, W, X, K).

El primer eje de este PCA, que tiene una varianza del 47%, muestra una diferenciación entre las poblaciones actuales europeas y algunas del Próximo Oriente (Iraq, Siria, Armenia, Palestina y Kurdistan), quedando el resto de las poblaciones comparadas distribuidas entre estos dos grupos. Teniendo en cuenta los linajes que muestran una mayor correlación con este eje (H, V e I), se observa que las poblaciones de Europa, respecto a las del Próximo Oriente, presentan altas frecuencias para los haplogrupos H y V, y bajas del I (Figura V.3.2b).

Las poblaciones actuales europeas son las que muestran una mejor representación de la variabilidad incluida en este análisis, dada su posición en el extremo del primer eje. Dentro de las poblaciones europeas, ninguna de ellas presenta una posición diferenciada para el primer eje. En el caso de las poblaciones actuales del Próximo Oriente, se observan dos grupos, por un lado, las poblaciones de Turquía y del Norte del Cáucaso y por otro lado, el resto de poblaciones de esta área.

Las poblaciones neolíticas muestran un comportamiento heterogéneo en el primer eje. La población de NEO_CAS_PAT, entra dentro de la variabilidad europea actual. En cambio, la variabilidad de las muestras de NEO_CAT y NEO_CE, se encuentra mal explicada por este eje, sobre todo la muestra NEO_CAT.

En el segundo eje, que tiene una varianza total del 20% (Figura V.3.2), se observa la diferenciación de los cazadores-recolectores del resto de las poblaciones, tanto prehistóricas como actuales (a excepción de Turquía y el norte del Cáucaso). Esta distribución viene explicada fundamentalmente por el haplogrupo U, que presenta un valor de

correlación muy elevada para este segundo eje (-0,939), lo que polariza la distribución de las poblaciones para este eje.

La variabilidad mitocondrial de los cazadores-recolectores para los linajes de origen pre-neolítico (39 individuos), está explicada fundamentalmente por el segundo eje, debido a la elevada frecuencia del linaje U (50-90%). Sin embargo, para el primer eje los cazadores-recolectores no presentan una posición diferenciada, ya que tienen una escasa representación de los linajes H (2,2%), V (0%) e I (0%). Esta posición de los cazadores-recolectores en el primer eje, que es el eje que explica la mayor variabilidad (47%) de las poblaciones incluidas en el PCA, es coherente con la escasa diversidad de linajes mitocondriales que presentan estos grupos ($0,667 \pm 0,0744$ CR_SCA; $0,5931 \pm 0,1162$ CR_CE).

Hemos realizado un segundo análisis de PCA, considerando la variabilidad de todos los linajes mitocondriales (Figura V.3.3). Éste confirma algunas tendencias observadas en el anterior PCA y en los test estadísticos de diferenciación poblacional (Figura V.3.11 y V.3.12).

El primer eje, que explica una varianza total del 41% (Figura V.3.3), muestra una dicotomía entre las poblaciones del Próximo Oriente y las europeas actuales, que ya se observaba en el anterior PCA (Figura V.3.2), pero en este caso hay una separación clara del conjunto de las poblaciones europeas y del Próximo Oriente (estas últimas, en el anterior PCA estaban en dos grupos).

Este primer eje se explica por la correlación de muchas variables, es decir hay muchos linajes mitocondriales que tienen valores de correlación entre 0,6 y 0,7: [U (-0,667), N (-0,666), J (0,663) e I, (0,64)]. Cada grupo de poblaciones, presenta una combinación diferente de este conjunto de linajes mitocondriales.

Hay que destacar que tras la incorporación en el PCA de linajes más recientes, la variabilidad de las poblaciones actuales se homogeneiza. Esta homogenización es más evidente en las poblaciones del Próximo Oriente, ya que todas ellas aparecen agrupadas (a diferencia del anterior PCA). En cuanto a las poblaciones de la franja-cantábrica incluidas en este análisis (País Vasco y Cornisa cantábrica), observamos que se engloban dentro de la variabilidad actual europea, sin una clara diferenciación entre ellas.

Si tenemos en cuenta únicamente la variabilidad de los grupos poblacionales prehistóricos, el primer eje presenta una dicotomía entre los grupos cazadores-recolectores y el resto de las poblaciones prehistóricas, a excepción de los neolíticos de Europa central. Esta diferenciación, es debida principalmente a la elevada frecuencia del haplogrupo U en los grupos cazadores-recolectores y a la elevada frecuencia del haplogrupo N1a en los grupos neolíticos de Europa central.

El resto de poblaciones prehistóricas carecen del haplogrupo N1a y aunque presentan una frecuencia alta del haplogrupo U, no alcanzan los valores hallados en los grupos cazadores-recolectores (superiores al 50%).

La principal diferencia entre el primer eje de este PCA, donde se tiene en cuenta toda la variabilidad mitocondrial (Figura V.3.3), respecto al anterior PCA, donde solo se habrían incluido los linajes con un origen pre-neolítico (Figura V.3.2), es la separación de los neolíticos de Europa central respecto a los de la Península Ibérica (NEO_CAT y NEO_CAS_PAT).

Los NEO_CE tienen una elevada frecuencia del haplogrupo N1a (25%), una baja frecuencia para el haplogrupo J (4%) y ausencia del haplogrupo I. En este segundo PCA los NEO_CE aparecen junto a las poblaciones actuales del Próximo Oriente, por la presencia del linaje N1a, cuya frecuencia es del 0,9% en el Próximo Oriente y de prácticamente 0% en el resto de las poblaciones.

En el segundo eje de este análisis (Figura V.3.3), con una varianza total del 18%, los haplogrupos que presentan una mayor correlación son el H (-0,82), el HV (0,7), y en menor medida el V (-0,639). En este segundo eje, resulta apreciable la diferenciación de los NEO_CAT respecto a NEO_CAS_PAT. Pudiendo ser éste el reflejo de las diferencias existentes en la distribución de las frecuencias de los haplogrupos mitocondriales en ambos grupos.

Las dos poblaciones neolíticas de la Península Ibérica se diferencian fundamentalmente por presentar NEO_CAT menor frecuencia del haplogrupo H (36%), mayor frecuencia del haplogrupo J (18%) y ausencia del haplogrupo U. Estos valores muestran que NEO_CAT conserva una menor frecuencia de linajes pre-neolíticos, cuestión que ya

se observaba en el primer PCA (en donde la variabilidad de la población NEO_CAT aparecía poco explicada por los linajes pre-neolíticos) (Figura V.3.2). Por tanto, NEO_CAT y NEO_CAS_PAT se diferencian en la composición de los linajes tanto de origen pre-neolítico como post-neolítico.

Si comparamos los dos PCA realizados (Figura V.3.2 y V.3.3), los grupos cazadores-recolectores, se encuentran diferenciados del resto de las poblaciones, lo que puede atribuirse principalmente a la importancia del haplogrupo U en ambos PCAs. En cuanto a las poblaciones neolíticas, se comportan de forma heterogénea, en ambos análisis. En la población de NEO_CE, los linajes N1a marcan su diferenciación de otros grupos neolíticos y establecen una posición más próxima a las poblaciones del Próximo Oriente (Figura V.3.3). Estos resultados, parecen indicar que el flujo genético asociado a la difusión de la agricultura, fue en Europa central diferente al resto de poblaciones neolíticas europeas, pero sin existir un reemplazamiento como indicaba BRAMANTI *et al.* (2009). Cuando se analizan únicamente los linajes pre-neolíticos (Figura V.3.2), NEO_CE está más próximo de NEO_CAS_PAT, ya que ambos grupos presentan una frecuencia semejante de los linajes H, V e I.

En la Península Ibérica, tampoco fue homogénea la influencia genética asociada a la difusión del neolítico. Cuando analizamos toda la variabilidad mitocondrial, se observa que estos dos grupos neolíticos (NEO_CAS-PAT y NEO_CAT), presentan una distribución diferente de las frecuencias de los haplogrupos mitocondriales, razón por la cual aparecen distantes en el PCA.

Los NEO_CAT presentan por un lado, una mayor similitud con las poblaciones de la región mediterránea de Europa y por otro lado, tienen mayor frecuencia del haplogrupo J (18%) y ausencia de N1a. Los neolíticos de NEO_CAS_PAT, tiene una mayor representación de linajes pre-neolíticos (H, V e I), moderada del haplogrupo J (6,25%) y ausencia de N1a.

Por último, se ha realizado un análisis de *Multidimensional Scaling* (MDS), a partir de las distancias genéticas F_{ST} (Figura V.3.4). En el MDS se mantiene la diferenciación entre los cazadores-recolectores y el resto de las poblaciones, situándose los cazadores-recolectores de la zona cantábrica en una posición ambigua en el MDS, lo que se atribuye a su pequeño tamaño muestral. También se mantiene la diferenciación entre las poblaciones actuales de Europa y del Próximo Oriente.

Las poblaciones neolíticas muestran el comportamiento heterogéneo, observado en los PCAs, diferenciándose los NEO_CE respecto a los neolíticos de la Península Ibérica y situándose los neolíticos de la Península Ibérica en una posición intermedia entre las poblaciones actuales del Próximo Oriente y de Europa.

Los neolíticos de Europa central se sitúan a una menor distancia de las poblaciones actuales del Próximo Oriente, como ya se observaba en el PCA (Figura V.3.3).

NEO_CAT, NEO_CAS_PAT y las poblaciones calcolíticas presentan una posición intermedia entre las poblaciones actuales de Europa y del

Próximo oriente. NEO_CAT se encuentra más próximo a las poblaciones del mediterráneo europeo, mientras que NEO_CAS_PAT, están más próximos a las poblaciones del norte de la Península Ibérica y algo más alejados de las poblaciones del Próximo Oriente. La distancia entre NEO_CAT y NEO_CAS_PAT, puede reflejar un cambio en la distribución de las frecuencias de los haplogrupos en NEO_CAT, por efecto del flujo génico proveniente de grupos neolíticos originarios del Próximo Oriente.

La posición de las poblaciones calcolíticas del País Vasco, es intermedia entre las poblaciones neolíticas de la Península Ibérica y las poblaciones actuales de Europa. SJaPL, está más próximo a la región mediterránea, sin embargo, Pico Ramos y Longar, se sitúan más próximos a las poblaciones actuales de la cornisa cantábrica. Existen por tanto, diferencias entre las poblaciones calcolíticas, siendo llamativas las existentes entre SJaPL y Longar, enclaves muy próximos geográfica y temporalmente.

La disposición de las poblaciones en el MDS, indica menores distancias de las poblaciones calcolíticas con las actuales, lo que puede ser debido al aumento del tamaño poblacional a partir del Neolítico, lo que atenuaría las variaciones debidas al azar.

La difusión de la economía productora dejó una huella genética diferente en los grupos indígenas del centro de Europa y de la Península Ibérica. Además, la influencia genética de la neolitización tampoco fue uniforme en la Península Ibérica, ya que los grupos neolíticos presentan diferencias en la distribución de las frecuencias de los haplogrupos mitocondriales.

Todos los resultados discutidos en el presente trabajo hacen referencia a los linajes genéticos transmitidos vía materna, siendo posible que los linajes paternos hayan tenido diferente contribución en el proceso de la neolitización.

La heterogeneidad genética observada en los tres grupos neolíticos indica que el proceso de la neolitización no fue homogéneo. Posiblemente porque los grupos que se dispersaron en las distintas regiones de Europa presentaban algunas diferencias en su composición genética. Estos datos apoyarían un modelo de dispersión aleatoria de los agricultores neolíticos, no clinal, con diferente influencia genética en las distintas regiones geográficas, desestimándose los modelos de reemplazamiento y aculturación total, propuestos para explicar el fenómeno de la neolitización.

VI. RESUMEN Y CONCLUSIONES

RESUMEN

El proyecto de la presente tesis doctoral, se inició con el análisis genético (mediante técnicas de ADN_a), de los individuos inhumados en dos yacimientos neolíticos de Navarra, Los Cascajos (6.435-5.100BP) y Paternanbidea (6.090-5.960BP). Estos yacimientos constituyen una referencia fundamental sobre el mundo funerario de las primeras comunidades campesinas, siendo los únicos enclaves al aire libre conocidos en Navarra.

En Los Cascajos se han recuperado evidencias de prácticas ganaderas y agrícolas, así como otras evidencias arqueológicas que corresponden a un poblado neolítico al aire libre. Este dato resulta novedoso en el contexto de los yacimientos coetáneos de esta región, los cuales, están dispuestos mayoritariamente en cuevas y abrigos, y de los que se carece de evidencias de poblado.

El yacimiento de Paternanbidea también es excepcional, ya que aunque no se han recuperado evidencias de prácticas ganaderas y agrícolas, se han encontrado cerámicas y ajuares, propios de la época neolítica. En este yacimiento se ha localizado también un espacio funerario, con la presencia de enterramientos dobles y múltiples.

Se ha realizado un análisis de la variabilidad del ADN_{mt} de los individuos de estas dos poblaciones neolíticas de Navarra y su interpretación dentro del contexto de las poblaciones actuales y prehistóricas de Europa y del Próximo Oriente, con el fin de aportar una

nueva visión sobre el proceso de neolitización en la región norte de la Península Ibérica.

Además, se ha buscado dar respuesta a cuestiones sobre el comportamiento biosocial de los sujetos enterrados en estos dos yacimientos neolíticos, dada la diversidad de las prácticas funerarias registrada en ambas necrópolis.

La comprensión del proceso de neolitización en la cornisa cantábrica, requiere analizar la transición genético-temporal de los grupos humanos de esta región desde el periodo Magdaleniense hasta la actualidad. Para ello, se vió necesario conocer la composición genética tanto de grupos humanos cazadores-recolectores como de productores, así como muestras de la Edad del Bronce y de la época actual de esta región. Se escogieron yacimientos con dataciones fiables y que hubieran proporcionado restos antropológicos.

La época pre-neolítica se encuentra representada por las muestras recuperadas de cuatro yacimientos: *Aizpea* (Navarra), *Erralla*, (Guipúzcoa), *La Chora* y *La Pasiéga* (Cantabria). La época neolítica se encuentra representada por los yacimientos de *Los Cascajos* y *Paternalbidea* (Navarra), *Fuente Hoz* (Álava) y *Marizulo* (Guipúzcoa). También se han incluido los restos del yacimiento de *Urtiaga* (Guipúzcoa), perteneciente a la Edad del Bronce.

El diseño metodológico utilizado para este estudio, se ha adaptado al análisis de ADN altamente degradado. En primer lugar se seleccionaron

un total de 112 piezas dentarias y 14 muestras de tejido óseo pertenecientes a 47 individuos de los nueve yacimientos analizados (Tabla A1 y A2; Anexo I). Se han recogido al menos dos muestras por individuo, con el fin de realizar el análisis de cada individuo por *duplicado* en nuestro laboratorio y de *replicarlo* en un laboratorio independiente. A partir de estas muestras se ha seguido una metodología, que en muchos casos ha sido adaptada a cada muestra, debido al deficiente estado de preservación del ADN (Tabla V.3.1).

Durante todo el proceso de análisis de las muestras, se han seguido una serie de precauciones y criterios de autenticación propuestos por la comunidad científica para dar una mayor fiabilidad a los resultados. Además, se han incluido *controles de contaminación* durante la extracción y la amplificación de las muestras. Sólo se han considerado las muestras cuyos controles de extracción y amplificación estuviesen libres de ADN, es decir, sin rastro de contaminación.

Se ha estimado la *cantidad del ADN* mediante qPCR. La cuantificación ha dado resultados muy variables, entre 30-12.000 moléculas de ADN molde por extracto (Tabla V.3.2). En algún caso ha habido que desestimar la muestra por no cumplir con lo todos los criterios de autenticación.

Se ha realizado el análisis por *duplicado* en un 66% de las muestras analizadas, siendo estos resultados coincidentes. También se ha realizado *la replicación* del 60% de las muestras en un laboratorio independiente (grupo del Dr. Vicente Cabrera, Área de Genética de la Facultad de

Biología, Universidad de La Laguna). La replicación de los resultados ha sido coincidente en un 75% de los casos. Por lo tanto un 25% de las muestras han sido eliminadas del estudio por presentar resultados no reproducibles.

Se ha realizado la *clonación*, de un total de 54 fragmentos del HVS-I de 42 de los individuos analizados, con el fin de autentificar los resultados de la secuenciación y detectar los errores debidos a las modificaciones presentes en la secuencia de los extractos antiguos. La secuencia consenso de entre ocho y diez clones ha sido coincidente con las secuencias obtenidas mediante secuenciación directa. También ha habido coincidencia entre el *haplogrupo* mitocondrial determinado mediante los marcadores de la región codificante (RFLPs) y la secuencia del HVS-I.

El mayor problema al que se enfrentan los trabajos sobre ADN, es la posible contaminación de las muestras con ADN humano actual. En este estudio, se ha tipado a los investigadores y arqueólogos que han manipulado las muestras y no se han encontrado haplotipos coincidentes con los resultados obtenidos en las muestras antiguas. Exceptuando, el haplotipo más frecuente en la mayoría de las poblaciones europeas (CRS) y el ht14 (92-224-311), que presenta una amplia distribución por toda la Península Ibérica (CRESPILO *et al.*, 2000; LARRUGA *et al.*, 2001; GONZALEZ *et al.*, 2002), las Islas Canarias (MACA-MEYER *et al.*, 2002), Europa (RICHARDS *et al.*, 1996, 1998, 2000) y el norte de África (RANDO *et al.*, 1998).

Para descartar una posible contaminación de aquellas muestras en las que el haplotipo mitocondrial coincide con el de los investigadores, se ha

secuenciado el HVS-II para completar el haplotipo mitocondrial y comprobar la ausencia de coincidencia para este segundo segmento. Los polimorfismos del HVS-II obtenidos de las muestras antiguas, no coinciden con los polimorfismos de los investigadores. Además estas muestras han sido clonadas, replicadas y duplicadas, siendo en todos los casos los resultados coincidentes.

Significado y comportamiento biosocial de los individuos de Los Cascajos (Los Arcos, Navarra)

El yacimiento de Los Cascajos representa un poblado plenamente Neolítico, tanto desde el punto de vista cronológico como cultural, en el que se han encontrado tanto evidencias del lugar de habitación (*poblado*), como de la zona de enterramiento (*necrópolis*).

Este yacimiento ha sido habitado durante un periodo de tiempo de aproximadamente un milenio, periodo en el que se ha practicado un variado ritual funerario. Existen dos ubicaciones para albergar a las inhumaciones: la *necrópolis* (donde se encuentran la mayoría de las inhumaciones), y el *poblado* (donde las fosas se encuentran dispersas y con una gran distancia entre ellas). Asimismo, algunas fosas pueden presentar a modo de cobertura una gran losa de arenisca o estar cubiertas con tierra compuesta de material pétreo (cereal carbonizado y fragmentos de molinos de mano), mientras que la mayoría no presentan ningún tipo de cobertura.

Las inhumaciones también pueden presentar un ajuar asociado variado, normalmente escaso y consistente sobre todo en vasijas de cerámica,

molinos de mano, cuchillos de sílex y elementos de adorno (cuentas discordes o colgantes de hueso y concha).

Se han obtenido resultados correspondientes a 23 individuos recuperados del yacimiento de Los Cascajos, lo que ha permitido describir 14 haplotipos mitocondriales diferentes (Tabla V.1.1). Estos 14 haplotipos indican que la población de Los Cascajos presentaba una elevada variabilidad genética, siendo raros los casos en los que dos o más individuos comparten el mismo haplotipo mitocondrial.

Si tenemos en cuenta los haplotipos que se encuentran compartidos por más de un individuo (ht2, ht3, ht4, ht7 y ht10) y las características culturales que presentan los mismos, observamos que en su mayoría no existe una correlación entre la composición biológica y el ritual de enterramiento. Solamente, en el caso del ht10 se pudo sugerir una correlación, ya que este haplotipo presenta una frecuencia muy baja o nula en la población actual y se ha encontrado en dos individuos que presentan características culturales comunes.

La elevada diversidad genética obtenida en el yacimiento de Los Cascajos ($0,9486 \pm 0,0248$), sugiere que este yacimiento no representa a una población aislada y de tamaño efectivo reducido, ya que en este caso la endogamia hubiera producido un aumento en la frecuencia de determinados linajes, es decir habríamos encontrado un mayor número de haplotipos compartidos.

El hecho de que este yacimiento presente dos ubicaciones para las inhumaciones, la necrópolis y el poblado, podría ser el reflejo de la

existencia de una diferenciación genética. Sin embargo, el test exacto de diferenciación poblacional, no ha detectado diferencias estadísticamente significativas en la composición genética de los inhumados en la necrópolis y el poblado. Tampoco existe una diferenciación cultural, ya que los individuos recuperados de ambas ubicaciones comparten las mismas características culturales (tipo de ajuar, presencia/ausencia cobertura, fase cronológica, orientación y posición del inhumado).

Se ha descrito en Los Cascajos, dos tipos particulares de *fosas asociadas*: dos *fosas adyacentes* (CAS-202/CAS-203 y CAS-257/CAS-258) y una *fosa superpuesta* (CAS-193S/CAS-193I). La fosa adyacente CAS-202/CAS-203, es el único caso en el que se han podido determinar los linajes mitocondriales de ambos individuos, siendo éstos diferentes (ht7 y ht11, respectivamente), lo que nos permite descartar una relación de parentesco materno entre estos individuos. Pero no podríamos descartar, dada la edad y el sexo de estos individuos (masculino adulto joven, y femenino juvenil), que haya otro tipo de relación biológica o social entre ellos, que pudiera explicarse con otro tipo de marcadores genéticos.

La casuística de las características culturales asociadas a los individuos de Los Cascajos es muy diversa, encontrándose individuos: con ajuar y cobertura de la fosa, con ajuar y sin cobertura, sin ajuar y con cobertura y sin ajuar ni cobertura. Al comparar mediante el test exacto de diferenciación poblacional los haplotipos mitocondriales de estos grupos (Tabla V.1.3), no se encuentran diferencias estadísticamente significativas, por lo que los rasgos culturales no parecen implicar una diferenciación biológica.

Los análisis multivariantes realizados en el yacimiento de Los Cascajos, no muestran una relación entre el ritual funerario y los datos del ADNmt obtenidos, siendo el hecho de presentar cobertura de la fosa el rasgo diferencial más destacable, ya que el hecho de inhumarse en la necrópolis o el poblado y la presencia/ausencia de ajuar, resulta ser secundario.

Sin embargo, no se observan diferencias estadísticamente significativas al comparar la distribución de los haplotipos mitocondriales entre los individuos que presentan cobertura y los que no la presentan. Por lo tanto, con los datos recuperados en este yacimiento, se deduce que esta diferenciación cultural no se corresponde con una diferenciación biológica.

La cronología neolítica antigua del yacimiento junto con su vigencia durante aproximadamente un milenio, permiten pensar que las innovaciones culturales propias de este periodo, podrían constituir el germen de un proceso de diferenciación social en el grupo humano que habitó en Los Cascajos. Sin embargo, el presente estudio no apoya esta idea y por tanto cuestiona los planteamientos que asocian la neolitización con el origen de la complejidad social de los grupos humanos.

Significado y comportamiento biosocial de los individuos de Paternanbidea (Ibero, Navarra)

En el yacimiento neolítico de Paternanbidea, se han encontrado cuatro fosas muy próximas entre sí, donde se localizan al menos trece individuos. Estas cuatro fosas merecen una mención especial, debido a que se trata de dos fosas dobles simultáneas (fosa 2 y fosa 4) y de dos fosas acumulativas (fosa 1 y fosa 3), de las cuales una es doble y la otra es múltiple. Además, en las fosas 1 y 2, se ha recuperado un ajuar destacable, tanto por su significado, como por su variedad y abundancia.

Sin embargo, analizando la variación genética del conjunto de la necrópolis, encontramos dos haplotipos (ht8 y ht16) presentes cada uno en dos individuos, todos ellos inhumados en fosas diferentes (ht8, en las fosas 1 y 2; ht16, en las fosas 1 y 4). Dada la elevada frecuencia del ht8 (perteneciente al haplogrupo H) en la población europea actual, el hecho de que dos individuos de distinta fosa compartan este haplogrupo, no indica necesariamente que exista una relación de parentesco materno entre ellos (ya que la probabilidad de que dos individuos escogidos al azar de la población compartan el mismo haplotipo, es proporcional a la frecuencia del haplotipo).

El caso del ht16, corresponde al subhaplogrupo H3, el cual presenta bajas frecuencias en la población actual (el valor más elevado se encuentra en una muestra de la población vasca actual, 13,9%) (ENNAFAA *et al.*, 2009). Teniendo en cuenta el tamaño reducido de la muestra analizada, la presencia de dos sujetos pertenecientes al

subhaplogrupo H3, aunque podría deberse a variaciones aleatorias, también podría explicarse por la existencia de una relación de parentesco vía materna entre ambos sujetos.

En el yacimiento de Paternanbidea, se observa una alta diversidad genética ($0,944 \pm 0,0702$), lo que indica que los individuos inhumados en este yacimiento, no serían representativos de una población aislada, ni de tamaño reducido. Ya que de ser así, se darían cruzamientos endógamos, lo que incrementaría la posibilidad de que se repitieran uno o varios linajes en un mayor número de casos. También hay que destacar que aunque se ha analizado un tamaño muestral reducido, éste parece ser representativo de la población original, dada su variabilidad mitocondrial (U, H, HV, I y H3).

Teniendo en cuenta las evidencias arqueológicas de este yacimiento, se ha planteado la posibilidad de que existiera algún tipo de relación familiar entre los individuos inhumados en cada fosa. Sin embargo, con los datos obtenidos a partir del ADNmt podemos descartar la existencia de cualquier tipo de relación familiar vía materna entre los individuos de la misma fosa. Además, se puede deducir que el patrón de enterramiento del yacimiento de Paternanbidea, no se basa en relaciones familiares vía materna.

Interpretación del significado biológico de la variabilidad genética de los yacimientos prehistóricos de la cornisa cantábrica.

Con el fin de interpretar el significado biológico de los yacimientos neolíticos de Paternabidea y Los Cascajos, estudiados en el presente trabajo, se ha abordado el análisis genético de los individuos recuperados de nueve yacimientos localizados en la franja cantábrica (País Vasco, Navarra y Cantabria), cuya cronología abarca desde el periodo Magdaleniense hasta la Edad del Bronce (Figura III.1 y Tabla III.1).

La interpretación de los datos genéticos obtenidos en este estudio, se realiza a la luz de las hipótesis planteadas hasta el momento sobre el origen de la variabilidad genética actual y sobre la influencia de la neolitización en las poblaciones cazadoras-recolectoras indígenas (ver apartado V.3.1).

De los 42 individuos prehistóricos analizados, se han obtenido un total de 22 haplotipos mitocondriales diferentes. Estos resultados, nos indican la existencia de una elevada variabilidad genética, pudiendo detectar la presencia de los mismos haplotipos tanto en individuos de época Magdaleniense como del Neolítico y en la población actual, aunque con una distribución de frecuencias diferente. Mientras algunos haplotipos han mantenido o aumentado su frecuencia a lo largo del tiempo (haplogrupo H), otros la han disminuido (haplogrupo U, I e HV), sea por efecto del flujo génico, deriva genética u otro fenómeno demográfico.

Toda la variabilidad de los haplotipos mitocondriales resultante se puede clasificar en seis haplogrupos: H, I, J, K, U y HV (Tabla V.3.2 y V.3.3), los cuales se encuentran entre los haplogrupos mitocondriales más frecuentes en Europa. En los yacimientos neolíticos se observa la presencia de linajes mitocondriales cuyas edades de coalescencia se sitúan tanto en el periodo Paleolítico como en el Neolítico.

En el presente estudio se ha obtenido una elevada frecuencia de haplotipos pertenecientes al haplogrupo H (45%). De los nueve yacimientos analizados, el haplogrupo H está presente en los individuos recuperados de los yacimientos de La Pasiega, Fuente Hoz, Urtiaga, Los Cascajos y Paternanbidea (Tabla V.3.2 y V.3.3), mostrándose evidencias de que este haplogrupo ha subsistido en esta región desde la época magdaleniense a la actualidad.

El haplogrupo V fue propuesto como marcador de la recolonización post-glacial desde refugios franco-cantábricos hacia el norte de Europa, dada la elevada frecuencia y variabilidad encontrada para este haplogrupo en diferentes muestras de la población vasca actual (TORRONI *et al.*, 1999). En un reciente estudio, GARCÍA *et al.* (2010) proponen una tendencia clinal longitudinal, en lugar de latitudinal, para la reexpansión post-glacial desde los refugios de la cornisa cantábrica, considerando también como posible foco de origen, la región de Cataluña y el sureste de Francia.

En cuanto a las muestras actuales del País Vasco, presentan una cierta heterogeneidad para este haplogrupo (12-3%). Un dato destacable de los resultados obtenidos, es la ausencia del haplogrupo V en el total de las

muestras prehistóricas analizadas. Estos resultados coinciden con un estudio previo realizado por nuestro grupo, en el que se analizaron un centenar de muestras calcolíticas.

La interpretación de los datos de ADN_a obtenidos en este estudio, en el contexto de las hipótesis existentes sobre el origen y difusión del haplogrupo V en Europa, parece indicar que en el pasado también pudo haber existido la subestructuración que se detecta actualmente en las poblaciones de la cornisa cantábrica y el noreste de la Península Ibérica, de forma que las frecuencias de este haplogrupo pudieran presentar grandes diferencias en el área mencionada, debido a la deriva genética.

Teniendo en cuenta la edad de coalescencia y el origen del haplogrupo J (7-6,6 kya) (RICHARDS *et al.*, 2000), se ha propuesto como marcador de la expansión de los agricultores neolíticos. El haplogrupo J ofreció una frecuencia muy baja en una muestra de vascos actuales (2,4%), lo que se interpretó como resultado de un menor impacto de los agricultores neolíticos en el País Vasco (RICHARDS *et al.*, 2000). Sin embargo, se ha descrito una frecuencia del haplogrupo J en una muestra de vascos actuales del 14,5% (ALFONSO-SÁNCHEZ *et al.*, 2008) y un 15% para la muestra de navarros actuales analizada en este estudio. Estos valores, son muy semejantes a los hallados en las poblaciones calcolíticas e histórica vascas (IZAGIRRE y DE LA RUA, 1999; ALZUALDE *et al.*, 2005, 2006).

Los neolíticos de Los Cascajos y Paternanbidea presentan una frecuencia del 6,25% para el haplogrupo J, que es algo superior a la que muestra un grupo neolítico de centro Europa (4%) e inferior a la hallada en los

neolíticos catalanes (18%). Si aceptamos que el haplogrupo J es un marcador de la dispersión de una economía productora, podemos decir que la influencia cultural neolítica observada en los yacimientos vascos de cronología neolítica, habría ido acompañada de cierto aporte genético, al igual que ocurre en las demás poblaciones neolíticas estudiadas hasta ahora (SAMPIETRO *et al.*, 2007; HAAK *et al.*, 2005). Por otro lado, la heterogeneidad observada en la frecuencia del haplogrupo J en las diferentes poblaciones neolíticas comparadas, sugiere que el proceso de neolitización fue diferente en las distintas regiones geográficas.

Otro haplogrupo relevante en el presente estudio es el haplogrupo U, que es el segundo más frecuente en las poblaciones estudiadas (28%). Está presente en los yacimientos de Erralla, Aizpea, Paternanbidea, Los Cascajos, Fuente Hoz y Urtiaga (Tabla V.3.3), lo que indica la pervivencia de este haplogrupo en poblaciones de diferente cronología, desde la época Magdaleniense hasta la actualidad.

Cabe resaltar la presencia del subhaplogrupo U5 en los cazadores-recolectores de la cornisa cantábrica, con una frecuencia semejante a la encontrada en otros cazadores-recolectores europeos (CR_SCA y CR_CE) (valores superiores al 40%). También se han encontrado representantes de este haplogrupo en los yacimientos neolíticos de Fuente Hoz y Los Cascajos, aunque con una frecuencia muy inferior, siendo inexistente en otros grupos neolíticos de Europa (NEO_CE y NEO_CAT). La variación de la frecuencia del haplogrupo U5 que muestran los grupos neolíticos europeos analizados hasta el momento, podría ser el reflejo de un influjo genético de otros grupos humanos durante el Neolítico.

El haplogrupo K presenta frecuencias similares en las poblaciones neolíticas de Los Cascajos y Paternambidea (14%) y en NEO_CE (16%). Sin embargo, en la población neolítica de NEO_CAT, no se ha encontrado ningún individuo perteneciente a este haplogrupo. Los haplogrupos HV e I se encuentran en el grupo NEO_CAS_PAT, con la misma frecuencia (3,12%). Sin embargo, en el resto de las poblaciones prehistóricas de Europa, la distribución de los haplogrupos HV e I es heterogénea. En los CR_CE, sólo se ha detectado el haplogrupo HV (4%). Los NEO_CAT solo presentan el haplogrupo I (9%) y los NEO_CE el haplogrupo HV (3%). La heterogeneidad que presentan estos haplogrupos en las muestras prehistóricas, puede ser el reflejo de diferencias en la composición genética de las poblaciones neolíticas de Europa, debidas al efecto diferencial de los grupos neolíticos originarios del Próximo Oriente en las distintas regiones geográficas de Europa.

El haplogrupo N1a fue propuesto por HAAK *et al.* (2005), como un posible marcador genético de los primeros agricultores neolíticos que vivieron en el centro y norte de Europa hace 7.500 años. Sin embargo, no se ha encontrado ningún individuo perteneciente a este haplogrupo, en ninguna de las muestras neolíticas de Europa analizadas hasta el presente. Esto indica que existen diferencias en la composición genética de los distintos grupos neolíticos de Europa.

La variabilidad genética de las muestras prehistóricas y actuales analizadas en el presente estudio, se ha comparado con la de poblaciones de Europa y del Próximo Oriente, mediante distintos tests de diferenciación poblacional (Tabla V.3.11 y V.3.12). En estos tests se

observa que los cazadores-recolectores europeos, presentan diferencias estadísticamente significativas con todas las poblaciones comparadas, tanto actuales como antiguas (a excepción de los cazadores-recolectores de la zona cantábrica, lo que hemos atribuido al pequeño tamaño muestral de este grupo). También se observan diferencias entre las poblaciones neolíticas (NEO_CAT NEO_CE y NEO_CAS_PAT) y las poblaciones actuales comparadas (Europa y el Próximo Oriente). Entre las poblaciones neolíticas, sólo NEO_CE muestra diferencias estadísticamente significativas con las poblaciones actuales y con los NEO_CAS, lo que nos estaría indicando la diferenciación genética de los neolíticos de Europa central.

Se han realizado dos PCAs, en los que se ha podido interpretar y representar la variabilidad del ADNmt de las poblaciones estudiadas en el contexto de otras poblaciones actuales y prehistóricas de Europa y del Próximo Oriente. En uno de los PCAs, sólo se han tenido en cuenta los haplogrupos mitocondriales con una edad de coalescencia anterior al periodo neolítico (HV, H, U, V, I, W, X, K) (Figura V.3.2). Mientras que en el segundo PCA se han tenido en cuenta todos los haplogrupos mitocondriales, independientemente de su edad de coalescencia (Figura V.3.3). Al comparar los dos PCAs (Figura V.3.2 y V.3.3), podemos observar que los cazadores-recolectores se diferencian del resto de las poblaciones, lo que puede atribuirse principalmente a la elevada frecuencia del haplogrupo U encontrada en los cazadores-recolectores, teniendo este haplogrupo elevados valores de correlación en los dos PCAs.

Las poblaciones neolíticas, se comportan de forma heterogénea en los PCAs. El linaje N1a marca la diferenciación de NEO_CE, respecto a otros grupos neolíticos, situándolos más próximos a las poblaciones del Próximo Oriente (Figura V.3.3). Este resultado, parece indicar que el flujo génico asociado a la difusión de la agricultura, fue en Europa central diferente al resto de poblaciones neolíticas europeas.

En la Península Ibérica, la influencia genética asociada a la difusión del Neolítico tampoco fue homogénea. Cuando analizamos toda la variabilidad mitocondrial (Figura V.3.3), los grupos neolíticos de la Península Ibérica (NEO_CAS_PAT y NEO_CAT), presentan una distribución diferente de los haplogrupos mitocondriales, razón por la cual aparecen distantes en el PCA. Los NEO_CAT presentan por un lado, una mayor similitud con las poblaciones de la región mediterránea de Europa y por otro lado, tienen mayor frecuencia del haplogrupo J (18%) y menor representación de haplogrupos pre-neolíticos (H, V e I). Los neolíticos de NEO_CAS_PAT, presentan una mayor semejanza con las poblaciones de la cornisa cantábrica y tienen una mayor representación de linajes pre-neolíticos (H, V e I) y valores moderados para el haplogrupo J (6,25%).

Finalmente, el análisis de *Multidimensional Scaling* (MDS) (Figura V.3.4), reafirma la diferenciación entre los cazadores-recolectores y el resto de las poblaciones. Asimismo se mantiene la diferenciación entre las poblaciones actuales de Europa y del Próximo Oriente. Las poblaciones neolíticas muestran un comportamiento heterogéneo, semejante al observado en los PCAs, diferenciándose los NEO_CE de los neolíticos de

la Península Ibérica. Los NEO_CE se sitúan a una menor distancia de las poblaciones actuales del Próximo Oriente (Figura V.3.3).

Los NEO_CAT y NEO_CAS_PAT presentan una posición intermedia entre las poblaciones actuales de Europa y del Próximo Oriente. NEO_CAT se encuentra más próximo a las poblaciones del mediterráneo europeo, mientras que NEO_CAS_PAT, está más próximo a las poblaciones del norte de la Península Ibérica y algo más alejado de las poblaciones del Próximo Oriente. La distancia entre NEO_CAT y NEO_CAS_PAT, puede reflejar un cambio en la distribución de las frecuencias de los haplogrupos en NEO_CAT, por efecto del flujo génico proveniente de grupos neolíticos originarios del Próximo Oriente. Por otro lado, la disposición de las poblaciones calcolíticas en el MDS, indica menores distancias de estas poblaciones con las actuales, lo que puede ser debido al aumento del tamaño poblacional a partir del Neolítico, lo que atenuaría las variaciones debidas al azar.

Por lo tanto, los distintos grupos poblacionales analizados en este estudio (cazadores-recolectores, neolíticos y la población actual), presentan un gran número de haplotipos mitocondriales europeos, con diferentes edades de coalescencia. Los haplotipos propuestos como marcadores genéticos de la expansión neolítica hacia Europa desde el Próximo Oriente (especialmente el haplogrupo J), se encuentran presentes en las poblaciones neolíticas analizadas, indicando una llegada temprana del neolítico a la Península Ibérica y a la zona actual del País Vasco.

A la luz de los resultados obtenidos, podemos indicar que la difusión de la economía productora pudo haber producido un impacto genético diferente en los grupos indígenas de Europa central y de la Península Ibérica. Por otro lado, la influencia genética de la neolitización tampoco fue uniforme en la Península Ibérica, ya que los grupos neolíticos de esta región (NEO_CAT y NEO_CAS_PAT) presentan diferencias en la distribución de las frecuencias de los haplogrupos mitocondriales.

La heterogeneidad genética observada en los grupos neolíticos de Europa, indica que el proceso de la neolitización no fue homogéneo. Posiblemente esto sería debido a que los grupos que se dispersaron en las distintas regiones de Europa presentaban algunas diferencias en su composición genética. Los resultados obtenidos no serían compatibles con los modelos de reemplazamiento y aculturación total propuestos para explicar el fenómeno de la neolitización en Europa. Estos datos apoyarían un modelo de dispersión aleatoria de los agricultores neolíticos, con diferente influencia genética en las distintas regiones geográficas.

CONCLUSIONES

Comportamiento biosocial de los individuos recuperados de los yacimientos neolíticos de Paternanbidea y Los Cascajos:

1. El análisis conjunto de los datos genéticos y las características culturales, asociadas a los individuos recuperados en el yacimiento neolítico de Paternanbidea, no apoya la existencia de relaciones de parentesco vía materna entre los individuos de la misma fosa. Asimismo, la distribución del ajuar asociado a estas fosas, no parece tener una base biológica.
2. La alta diversidad de haplotipos mitocondriales proporcionada por el yacimiento de Paternanbidea, a pesar de su pequeño tamaño muestral, indica que no se trata de una población aislada ni de tamaño reducido, lo que sugiere la existencia de un incremento demográfico desde las primeras fases del Neolítico.
3. El análisis de los yacimientos de Los Cascajos y Paternanbidea (los más representativos de la muestra analizada), indica que en estas poblaciones del Neolítico antiguo, no se sigue un patrón funerario que pueda explicarse con los datos del ADNmt, desestimándose además, la existencia de estructuración social, atribuida al Neolítico, a pesar de la complejidad del ritual de enterramiento.

Variabilidad genética de los yacimientos prehistóricos de la Cornisa Cantábrica:

4. Los linajes mitocondriales descritos en las poblaciones prehistóricas de la Cornisa Cantábrica, han persistido desde el periodo Magdaleniense hasta la actualidad, aunque con una distribución de frecuencias diferente. Los resultados del ADN antiguo validan las edades de coalescencia estimadas para algunos haplogrupos y atestiguan la persistencia de linajes antiguos en las poblaciones actuales.

5. Sobre el origen y difusión del haplogrupo V en Europa, la ausencia de este haplogrupo en los yacimientos prehistóricos de la Cornisa Cantábrica estudiados (magdalenienses y neolíticos), sugiere la existencia de una subestructuración poblacional en el pasado y posiblemente grandes variaciones en las frecuencias del haplogrupo V en este área. Por tanto, los datos de ADN antiguo no sustentan la hipótesis de TORRONI *et al.*, (1998) sobre la difusión del haplogrupo V a partir del refugio franco cantábrico.

6. Los grupos de cazadores-recolectores europeos presentan una gran diferenciación respecto a las poblaciones neolíticas y actuales, debido a la escasa diversidad de linajes mitocondriales que presentan. Las diferencias con los grupos neolíticos se han atribuido a la reestructuración de su composición genética debida al flujo génico procedente del Próximo Oriente.

7. Las poblaciones neolíticas europeas presentan gran heterogeneidad. La diferenciación entre los grupos de centro Europa y de la Península Ibérica, puede deberse a que los grupos que se dispersaron en las distintas regiones de Europa presentaban algunas diferencias en su composición genética.
8. La influencia genética de la neolitización tampoco fue uniforme en la Península Ibérica, ya que los grupos neolíticos de Los Cascajos y Paternanbidea se diferencian de un grupo neolítico de Cataluña, lo que indicaría que la difusión de la economía productora dejó una huella genética diferente en los grupos indígenas de las distintas regiones.
9. La variabilidad mitocondrial de los yacimientos navarros de Los Cascajos y Paternanbidea, indica que estos grupos no solo recibieron una fuerte influencia cultural neolítica, sino también cierto aporte genético, que es diferente al sufrido por otras poblaciones europeas.
10. Los datos genéticos obtenidos en el presente estudio de ADNmt, apoyan un modelo de dispersión aleatoria de los agricultores neolíticos, no clinal, con diferente influencia en las distintas regiones geográficas; desestimándose los modelos de reemplazamiento y aculturación total, propuestos para explicar el fenómeno de la neolitización.

VII. BIBLIOGRAFÍA

ACHILLI A, RENGO C, MAGRI C, BATTAGLIA V, OLIVIERI A, SCOZZARI R, CRUCIANI F, ZEVIANI M, BRIEM E, CARELLI V, MORAL P, DUGOUJON JM, ROOSTALU U, LOOGVALI EL, KIVISILD T, BANDELT HJ, RICHARDS M, VILLEMS R, SANTACHIARA-BENERECETTI AS, SEMINO O, TORRONI A (2004). The molecular dissection of mtDNA haplogroup H confirms that the Franco-Cantabrian glacial refuge was a major source for the European gene pool. *Am. J. Hum. Genet.*, 75: 910-918.

ACHILLI A, RENGO C, MAGRI C, BATTAGLIA V, OLIVIERI A, SCOZZARI R, CRUCIANI F, ZEVIANI M, BRIEM E, CARELLI V, MORAL P, DUGOUJON JM, ROOSTALU U, LOOGVALI E L, KIVISILD T, BANDELT HJ, RICHARDS M, VILLEMS R, SANTACHIARA-BENERECETTI AS, SEMINO O, TORRONI A (2005). Saami and Berbers-an unexpected mitochondrial DNA link. *Am J Hum Genet.*, 76:883-886.

ACHILLI A, OLIVIERI A, PALA M, METSPALU E, FORNARINO S, BATTAGLIA V, ACCETTURO M, KUTUEV I, KHUSNUTDINOVA E, PENNARUN E, CERUTTI N, DI GAETANO C, CROBU F, PALLI D, MATULLO G, SANTACHIARA-BENERECETTI AS, CAVALLI-SFORZA LL, SEMINO O, VILLEMS R, BANDELT HJ, PIAZZA A, TORRONI A (2007). Mitochondrial DNA Variation of Modern Tuscans Supports the Near Eastern Origin of Etruscans. *Am. J. Hum. Genet.*, 80: 759-68.

ADAMS SM, BOSCH E, BALARESQUE PL, BALLEREAU SJ, LEE AC, ARROYO E, LÓPEZ-PARRA AM, ALER M, GRIFO MS, BRION M, CARRACEDO A, LAVINHA J, MARTÍNEZ-JARRETA B, QUINTANA-MURCI L, PICORNELL A, RAMON M, SKORECKI K, BEHAR DM, CALAFELL F, JOBLING MA (2008). The genetic legacy of religious diversity and intolerance: paternal lineages of Christians, Jews and Muslims in the Iberian Peninsula. *Am. J. Hum. Genet.*, 83: 725-736

AGUADO M (2001). El desarrollo de la complejidad social en el tránsito del Neolítico al Calcolítico: reflexiones acerca del concepto de sociedad compleja y de origen de las élites. *Boletín de la Asociación Española de Amigos de la Arqueología*, 41: 9-36

AGUIRRE A, VICARIO A, MAZON LI, ESTOMBA A, MARTINEZ DE PM, ARRIETA P, V, PEREZ EF, LOSTAO CM (1991). Are the Basques a single and a unique population? *Am. J. Hum. Genet.*, 49: 450-458.

ALDAY A, CAVA A Y MUJICA JA (1995). El IV milenio en el País Vasco: transformaciones culturales. *I congrés del Neolític a la península Ibérica. Rubicatum I, Gavá-Bellaterra*, 745-756.

ALDAY A (2009). El final del Mesolítico y los inicios del Neolítico en la Peínsula Ibérica: cronología y fases. *Munibe Antropologia-Arkeologia*, 60; 157-173

ALFONSO-SÁNCHEZ MA, CARDOSO S, MARTÍNEZ-BOUZAS C, PEÑA JA, HERRERA RJ, CASTRO A, FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ I, MTZ DE PANCORBO MA (2008). Mitochondrial DNA haplogroup diversity in Basques: A reassessment based on HVI and HVII polymorphisms. *Am. J. Hum. Biol.*, 20: 154-156.

ALONSO A, ALBARRÁN C, MARTÍN P, GARCÍA P, GARCÍA O, DE LA RÚA C, ALZUALDE A, FERNÁNDEZ DE SIMÓN L, SANCHO M, FERNÁNDEZ-PIQUERAS J (2003). Multiplex-PCR of short amplicons for mtDNA sequencing from ancient DNA. *Congres. Series.*, 1239:585-588.

ALONSO S y ARMOUR JA (1998). MS205 minisatellite diversity in Basques: evidence for a pre-Neolithic component. *Genom. Res.*, 8: 1289-1298.

ALONSO S y ARMOUR JA (2001). A highly variable segment of human subterminal 16p reveals a history of population growth for modern humans outside Africa. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 98:864-9.

ALONSO S, FLORES C, CABRERA V, ALONSO A, MARTIN P, ALBARRAN C, IZAGIRRE N, DE LA RÚA C, GARCIA O (2005). The place of the Basques in the European Y-chromosome diversity landscape. *Eur. J. Hum. Genet.*, 13: 1293-1302.

ALTUNA J, BALDEÓN A y MARIEZKURRENA K (1984). Depôts rituels Magdaleniens de la grotte d'Erralla (Pays Basque). *Munibe*, 36: 3-10.

ALTUNA J, BALDEÓN A y MARIEZKURRENA K (1985). Cazadores magdalenienses en la cueva de Erralla (Cestona, País Vasco). *Munibe*, 37: 199-206.

ALTUNA J y DE LA RÚA C (1989). Dataciones absolutas de los cráneos del yacimiento prehistórico de Urtiaga. *Munibe*, 41:23-28.

ALVAREZ-IGLESIAS JC, JOHNSON DL, LORENTE JA, MARTINEZ-ESPIN E, MARTINEZ-GONZALEZ LJ, ALLARD M, WILSON MR, BUDOWLE B (2007). Characterization of human control region sequences for Spanish individuals in a forensic mtDNA data set. *Leg. Med.*, 9: 293-304.

ALZUALDE A, IZAGIRRE N, ALONSO S, ALONSO A, DE LA RÚA C (2005). Temporal mitochondrial DNA variation in the Basque Country: influence of post-Neolithic events. *Ann. Hum. Genet.*, 69: 665-679.

ALZUALDE A, IZAGIRRE N, ALONSO S, ALONSO A, ALBARRAN C, AZKARATE A, DE LA RÚA C (2006). Insights into the "isolation" of the Basques: mtDNA lineages from the historical site of Aldaieta (6th-7th centuries AD). *Am. J. Phys. Anthropol.*, 130: 394-404.

ALZUALDE A, IZAGIRRE N, ALONSO S, ALONSO A, AZKARATE A, DE LA RÚA, C (2007). Influences of the European Kingdoms of Late Antiquity on the Basque Country: An Ancient DNA Study. *Curr. Anthropol.*, 48: 155-162.

AMMERMAN AJ y CAVALLI-SFORZA LL (1984). *Neolithic transmission and the genetics of population*. Princeton University Press.

AMMERMAN AJ, PINHASI R y BÁNFFY E (2006). Comment on "Ancient DNA from the first European farmers in 7500-year-old Neolithic sites". *Science*, 312: 1875.

ANDERSON MJ (2003). PCO: a Frontran computer program for principal coordinate analysis. Department of Statistics, University of Auckland, New Zealand.

ANDERSON S, BANKIER AT, BARRELL BG, DE BRUIJN MH, COULSON AR, DROUIN J, EPERON IC, NIERLICH DP, ROE BA, SANGER F, SCHREIER PH, SMITH AJ, STADEN R, YOUNG IG (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290: 457-465.

ANDREWS RM, KUBACKA I, CHINNERY PF, LIGHTOWLERS RN, TURNBULL DM, HOWELL N (1999). Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat. Genet.*, 23: 147.

ARANZADI T y BARANDIARÁN JM (1948). Explotación de la cueva de Urtiaga (Itziar, Guipúzcoa). II estudio de los cráneos vascos prehistóricos de Vasconia. *Eusko Jakintza*, 2: 307-330.

ARMENDÁRIZ A y ETXEBERRIA F (1983). Las cuevas sepulcrales de la Edad de Bronce en Guipúzcoa. *Munibe*, 35: 247-354.

ARRIAZA BT, SALO W, AUFDERHEIDE AC, HOLCOMB TA (1995). Pre-Columbian tuberculosis in northern Chile: molecular and skeletal evidence. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 98: 37-45.

ARRIBAS A, GALAN E, MARTIN POZAS JM, NICOLAU J, SALVADOR P (1971). Estudio mineralógico de la variscita de Palazuleos de la Cuevas, Zamora (España). *Studia. Geol.*, (Acta Salmantinacensis).

BALARESQUE P, BOWDEN GR, ADAMS SM, LEUNG HY, KING TE, ROSSER ZH, GOODWIN J, MOISAN JP, RICHARD C, MILLWARD A, DEMAINE AG, BARBUJANI G, PREVIDERÈ C, WILSON IJ, TYLER-SMITH C, JOBLING MA (2010). A predominantly neolithic origin for European paternal lineages. *PLOS Biol.*, 19: 8(1).

BALDEÓN A, (1983). Excavaciones en el yacimiento de Fuente Hoz (Anúcita, Álava). *Estudios de Arqueología Alavesa*, 11: 7-77.

BALDEÓN A, (1984). Fuente Hoz (Anúcita, Álava): V campaña de excavaciones. *Arkeoikuska: Investigación arqueológica*, 1984: 14-15

BALDEÓN A, (1986). Fuente Hoz (Anúcita, Álava): VI campaña de excavaciones. *Arkeoikuska: Investigación arqueológica*, 1986: 9-12.

BALTER M (2005). Ancient DNA yields clues to the puzzle of European origins. *Science*, 10:964-965.

BANDELT H J, FORSTER P y ROHL A (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.*, 16: 37-48.

BANDELT HJ (2005). Mosaics of ancient mitochondrial DNA: positive indicators of nonauthenticity. *Eur. J. Hum. Genet.*, 13: 1106-1112.

BARANDIARÁN I (1948). Exploración de la cueva de Urtiaga (Itziar, Guipúzcoa). *Eusko Jakintza*, 2: 285-306.

BARANDIARÁN I (2001). Deposito funerario. Cazadores recolectores en el Pirineo Navarro. El sitio de Aizpea entre 8.000 y 6.000 años antes de ahora. *Anejos de Veleia, Serie Maior*, 10: 431-443.

BARBERO MC, IRIONDO M, DURÁN LM, MANZANO C (2000). Análisis de seis sistemas polimórficos de ADN en Navarra. *Tendencias actuales de investigación en la Antropología Física Española*, (eds. L Caro Dobón, H Rodríguez Otero, E Sánchez Compadre, B López Martínez MJ Blanco), León, 491-496.

BARBUJANI G, SOKAL RR y ODEN NL (1995). Indo-European origins: a computer-simulation test of five hypotheses. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 96: 109-132.

- BASABE JM (1971). Restos humanos del yacimiento de Marizulo (Urnieta, Guipúzcoa). *Munibe*, 23: 105-124.
- BASABE JM y BENNASSAR I (1983). Estudio antropológico del yacimiento de Fuente Hoz (Anúcita, Álava). *Estudios de arqueología alavesa*, 11: 77-119.
- BELLEDI M, POLONI ES, CASALOTTI R, CONTERIO F, MIKEREZI I, TAGLIAVINI J, EXCOFFIER L (2000). Maternal and paternal lineages in Albania and the genetic structure of Indo-European populations. *Eur. J. Hum. Genet.*, 8: 480-486.
- BERTRANPETIT J y CAVALLI-SFORZA LL (1991). A genetic reconstruction of the history of the population of the Iberian Peninsula. *Ann. Hum. Genet.*, 55: 51-67.
- BERTRANPETIT J, SALA J, CALAFELL F, UNDERHILL PA, MORAL P, COMAS D (1995). Human mitochondrial DNA variation and the origin of Basques. *Ann. Hum. Genet.*, 59: 63-81.
- BLASCO A, EDO M y VILLALBA MJ (1995). Intercambio de bienes de prestigio en Catalunya durante el neolítico. El desarrollo de la desigualdad social. I congreso del neolítico a la Península Ibérica; Gavà-Bellaterra 2: 549-556.
- BOSCH E, CALAFELL F, COMAS D, OEFNER PJ, UNDERHILL PA, BERTRANPETIT J (2001). High-resolution analysis of human Y-chromosome variation shows a sharp discontinuity and limited gene flow between northwestern Africa and the Iberian Peninsula. *Am. J. Hum. Genet.*, 68: 1019-1029.
- BOYD WC y BOYD LG (1937). New data on blood groups and other inherited factors in Europe and Egypt. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 93: 201-215.
- BRAMANTI B, THOMAS MG, HAAK W, UNTERLAENDER M, JORES P, TAMBETS K, NTANAITIS-JACOBS I, HAIDLE MN, JANKAUSKAS R, KIND CJ, LUETH F, TERBERGER T, HILLER J, MATSUMURA S, FORSTER P, BURGER J (2009). Genetic Discontinuity Between Local Hunter-Gatherers and Central Europe's First Farmers. *Science*, 326: 137-140.
- BROWN WM (1980). Polymorphism in mitochondrial DNA of humans as revealed by restriction endonuclease analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 77: 3605-3609.

BURGER J, HUMMEL S, HERMANN B, HENKE W (1999). DNA preservation: a microsatellite-DNA study on ancient skeletal remains. *Electrophoresis*, 20: 1722-1728.

CALAFELL F y BERTRANPETIT J (1994a). Mountains and genes: population history of the Pyrenees. *Hum. Biol.*, 66: 823-842.

CALAFELL F y BERTRANPETIT J. (1994b). Principal component analysis of gene frequencies and the origin of Basques. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 93: 201-215.

CALAFELL F, UNDERHILL P, TOLUN A, KALAYDJIEVA LD (1996). From Asia to Europe: mitochondrial DNA sequence variability in Bulgarians and Turks. *Ann. Hum. Genet.*, 60: 35-49.

CALDERÓN R, PÉREZ MIRANDA A, PEÑA JA, VIDALES C, ARESTI U, DOUGOUJON JM (2000) The genetic position of the autochthonous subpopulation of Northern Navarra (Spain) in relation to other Basque subpopulations. A study based on GM and KM immunoglobulin allotypes. *Hum. Biol.*, 72: 619-640.

CALDERÓN R, CARRION M, PEREZ-MIRANDAA, PEÑA JA, DUGOUJON J. M, CROUAU-ROY B (2003). Allele variation of DYS19 and Y-Alu insertion (YAP) polymorphisms in Basques: an insight into the peopling of Europe and the Mediterranean region. *Hum. Biol.*, 75: 117-127.

CALLOWAY CD, REYNOLDS RL, HERRIN GL JR, ANDERSON WW(2000) The frequency of heteroplasmy in the HVII region of mtDNA differs across tissue types and increases with age. *Am. J. Hum. Genet.*, 66: 1384-1397.

CANN RL, STONEKING M, WILSON AC (1987). Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature*, 325: 31-36.

CANO RJ, POINAR HN, PIENIAZEK NJ, ACRA A, POINAR JR. (1993). Amplification and sequencing of DNA from a 120-135 million-year-old weevil. *Nature*, 363: 536-538.

CARAMELLI D, LALUEZA-FOX C, VERNESI C, LARI M, CASOLI A, MALLEGNI F, CHIARELLI B, DUPANLOUP I, BERTRANPETIT J, BARBUJANI G, BERTORELLE G (2003). Evidence for a genetic discontinuity between Neandertals and 24,000-year-old anatomically modern Europeans. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 100: 6593-65937.

CARAMELLI D, LALUEZA-FOX C, CONDEMI S, LONGO L, MILANI L, MANFREDINI A, DE SAINT PIERRE M, ADONI F, LARI M, GIUNTI P, RICCI S, CASOLI A, CALAFELL F, MALLEGGNI F, BERTRANPETIT J, STANYON R, BERTORELLE G, BARBUJANI G (2006). A highly divergent mtDNA sequence in a Neandertal individual from Italy. *Curr. Biol.*, 16: 630-632.

CASAS MJ, HAGELBERG E, FREGEL R, LARRUGA JM, GONZALEZ AM (2006). Human mitochondrial DNA diversity in an archaeological site in al-Andalus: Genetic impact of migrations from North Africa in medieval Spain. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 131: 539-551.

CAVALLI-SFORZA LL y PIAZZA A (1993). Human genomic diversity in Europe: a summary of recent research and prospects for the future. *Eur. J. Hum. Genet.*, 1: 3-18.

CAVALLI-SFORZA LL, MENOZZI P y PIAZZA A (1993). Demic expansions and human evolution. *Science*, 259: 639-646.

CAVALLI-SFORZA LL y MINCH E (1997). Paleolithic and Neolithic lineages in the European mitochondrial gene pool. *Am. J. Hum. Genet.*, 61: 247-254.

CHEN S, LIN BZ, BAIG M, MITRA B, LOPES RJ, SANTOS AM, MAGEE DA, AZEVEDO M, TARROSO P, SASAZAKI S, OSTROWSKI S, MAHGOUB O, CHAUDHURI TK, ZHANG YP, COSTA V, ROYO LJ, GOYACHE F, LUIKART G, BOIVIN N, FULLER DQ, MANNEN H, BRADLEY DG, BEJA-PEREIRA A (2010). Zebu cattle are an exclusive legacy of the South Asia neolithic. *Mol. Biol. Evol.*, 27: 1-6.

CHIKHI L, DESTRO-BISOL G, BERTORELLE G, PASCALI V, BARBUJANI G (1998). Clines of nuclear DNA markers suggest a largely neolithic ancestry of the European gene pool. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 95: 9053-9058.

CHIKHI L, NICHOLS RA, BARBUJANI G y BEAUMONT MA (2002). Y genetic data support the Neolithic demic diffusion model. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 99: 11008-11013.

CLARK JGD (1965). Radiocarbon dating and the spread of farming economy, *Antiquity*, 39, 45-48.

CLARK KM, TAYLOR RW, JOHNSON MA, CHINNERY PF, CHRZANOWSKA-LIGHTOWLERS ZM, ANDREWS RM, NELSON IP, WOOD NW, LAMONT PJ, HANNA MG, LIGHTOWLERS RN, TURNBULL DM (1999). An mtDNA mutation in the initiation codon of the cytochrome C oxidase subunit II gene

results in lower levels of the protein and a mitochondrial encephalomyopathy. *Am. J. Hum. Genet.*, 64: 1330-1339.

COLLURA RV y STEWART CB (1995). Insertions and duplications of mtDNA in the nuclear genomes of Old World monkeys and hominoids. *Nature*, 378: 485-489.

COMAS D, PÄÄBO S y BERTRANPETT J (1995). Heteroplasmy in the control region of human mitochondrial DNA. *Genome Res.*, 5: 89-90

COMAS D, CALAFELL F, MATEU E, PEREZ-LEZAUN A, BERTRANPETT J (1996). Geographic variation in human mitochondrial DNA control region sequence: the population history of Turkey and its relationship to the European populations. *Mol. Bio. Evol.*, 13: 1067-1077.

COOPER A (1994). Contamination and negative results in ancient DNA studies and amber research. *Ancient DNA Newsletter*, 2: 5-7.

COOPER A y POINAR HN (2000). Ancient DNA: do it right or not at all. *Science*, 289: 1139.

CORTE-REAL HB, MACAULAY VA, RICHARDS MB, HARITI G, ISSAD MS, CAMBON-THOMSEN A, PAPIHA S, BERTRANPETT J, SYKES BC (1996). Genetic diversity in the Iberian Peninsula determined from mitochondrial sequence analysis. *Ann. Hum. Genet.*, 60: 331-350.

CURRAT M y EXCOFFIER L (2005). The effect of the Neolithic expansion on European molecular diversity. *Proc. Biol. Sci.*, 272: 679-688.

DALTON R (2006). Neanderthal genome sees first light. *Nature*, 444: 254.

DE LA RÚA C (1985). Restos humanos de Erralla. Cazadores recolectores en la cueva de Erralla (Cestona, País Vasco). *Munibe*, 37: 195-198.

DE LA RÚA C (1988). Revisión de los cráneos de Urtiaga (Guipúzcoa, País Vasco). *Munibe*, 40: 269-280.

DE LA RÚA C, BARAYBAR J, IRIONDO M, IZAGIRRE N (2001). Estudio antropológico del esqueleto mesolítico del yacimiento de Aizpea. *Anejos de Veleia*, Series maior 10; 363-429.

DELSON E y HARVATI K (2006). Palaeoanthropology: Return of the last Neanderthal. *Nature*, 443: 762-763.

- DENNELL RW (1985). Neolithic Advances: The Neolithic Transition and the Genetics of Populations in Europe. *Science* 227: 1331.
- DESALLE R, GATESY J, WHEELER W y GRIMALDI D (1992). DNA sequences from a fossil termite in Oligo-Miocene amber and their phylogenetic implications. *Science*, 25:1933-1936.
- DI RIENZO A, y WILSON AC (1991). Branching pattern in the evolutionary tree for human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 88: 1597-1601.
- DRANCOURT M, ABOUDHARAM G, SIGNOLI M, DUTOUR O, RAOULT D (1998). Detection of 400-year-old *Yersinia pestis* DNA in human dental pulp: an approach to the diagnosis of ancient septicemia. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 95: 12637-12640.
- ELSON JL, ANDREWS RM, CHINNERY PF, LIGHTOWLERS RN, TURNBULL DM, HOWELL N (2001). Analysis of European mtDNAs for recombination. *Am. J. Hum. Genet.*, 68: 145-153.
- ENNAFAA H, CABRERA VM, BU-AMERO KK, GONZALEZ AM, AMOR MB, BOUHAHA R, DZIMIRI N, ELGAAIED AB, LARRUGA JM (2009). Mitochondrial DNA haplogroup H structure in North Africa. *BMC Genetics*, 10: 8.
- ESTEBAN E, DUGOUJON JM, GUITARD E, SENEGAS MT, MANZANO C, DE LA RÚA C, VALVENY N, MORAL P (1998). Genetic diversity in northern Spain (Basque Country and Cantabria): GM and KM variation related to demographic histories. *Eur. J. Hum. Genet.*, 6: 315-324.
- EXCOFFIER L y YANG Z (1999). Substitution rate variation among sites in mitochondrial hypervariable region I of humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.*, 16: 1357-1368.
- EYRE-WALKER A, SMITH NH y SMITH JM (1999). How clonal are human mitochondria? *Proc Biol Sci.*, 266: 477-483.
- FELSENSTEIN J (1993). PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5. Department of Genetics. University of Washington. Seattle.
- FERNANDEZ E (2005) Polimorfismos de DNA mitocondrial en poblaciones antiguas de la cuenca mediterránea. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. <http://www.tdx.cat/TDX-0123106-084234>

FERNANDEZ E, ORTIZ JE, TORRES T, PÉREZ PÉREZ A, GAMBA C, TIRADO M, BAEZA C, LÓPEZ-PARRA AM, TURBÓN D, ANFRUNS J, MOLIST M, ARROYO-PARDO E (2008). Mitochondrial DNA genetic relationships at the ancient Neolithic site of Tell Halula. *Genetics Supplement Series*, 1: 271-273.

FINLAYSON C, GILES PACHECO F, RODRIGUEZ-VIDAL J, FA DA, GUTIERREZ LOPEZ M J, SANTIAGO PEREZ A, FINLAYSON G, ALLUE E, BAENA PREYSLER J, CACERES I, CARRION JS, FERNANDEZ JALVO Y, GLEED-OWEN CP, JIMENEZ ESPEJO FJ, LOPEZ P, LOPEZ SAEZ JA, ANTONIO RIQUELME CANTAL J, SANCHEZ MARCO A, GILES GUZMAN F, BROWN K, FUENTES N, VALARINO CA, VILLALPANDO A, STRINGER CB, MARTINEZ RUIZ F, SAKAMOTO T (2006). Late survival of Neanderthals at the southernmost extreme of Europe. *Nature*, 443: 850-853.

FINNILÄ S, LEHTONEN MS y MAJAMAA K (2001). Phylogenetic network for European mtDNA. *Am. J. Hum. Genet.*, 68:1475-84.

FLORES C, MACA-MEYER N, GONZALEZ AM, OEFNER PJ, SHEN P, PEREZ JA, ROJAS A, LARRUGA JM y UNDERHILL PA (2004). Reduced genetic structure of the Iberian peninsula revealed by Y-chromosome analysis: implications for population demography. *Eur. J. Hum. Genet.*, 12: 855-863.

FORHAN G, MARTIEL JL y BLUM MG (2008). A deterministic model of admixture and genetic introgression: The case of Neanderthal and Cro-Magnon. *Math. Biosci.*, 216: 71-76.

FORSTER P (2004). Ice Ages and the mitochondrial DNA chronology of human dispersals: a review. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 359: 255-264.

FRANCALACCI P, BERTRANPETTIT J, CALAFELL F, UNDERHILL PA (1996). Sequence diversity of the control region of mitochondrial DNA in Tuscany and its implications for the peopling of Europe. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 100: 443-460.

FREGEL R, GOMES V, GUSMAO L, GONZALEZ AM, CABRERA VM, AMORIM A, LARRUGA JM (2009a). Demographic history of Canary Islands male gene-pool: replacement of native lineages by European. *BMC Evol. Biol.*, 9: 181.

FREGEL R, PESTANO J, ARNAY M, CABRERA VM, LARRUGA JM, GONZALEZ AM (2009b). The maternal aborigine colonization of La Palma (Canary Islands). *Eur. J. Hum. Genet.*, 17: 1314-1324.

GALLAGHER A, GUNTHER MM y BRUCHHAUS H (2009). Population continuity, demic diffusion and Neolithic origins in central-southern Germany: The evidence from body proportions. *Homo*, 60: 95-126.

GAMBLE C (1999). *The Palaeolithic Societies of Europe*. Cambridge: Cambridge University Press.

GAMBLE C, DAVIES W, PETTTTT P y RICHARDS M. (2004). Climate change and evolving human diversity in Europe during the last glacial. *Phil. Trans.R. Soc. B.*, 359: 243-253.

GAMBLE C, DAVIES W, PETTTTT P, HAZELWOOD L, RICHARDS M. (2005). The archaeological and genetic foundations of the European population during the Late Glacial: implications for 'agricultural thinking'. *Camb. Archaeol. J.*, 15: 193-223.

GARAGNANI P, LAAYOUNI H, GONZALEZ-NEIRA A, SIKORA M, LUISELLI D, BERTRANPETTT J, CALAFELL F (2009) Isolated populations as treasure troves in genetic epidemiology: the case of the Basques. *Eur. J. Hum. Genet.*, 17: 1490-1494.

GARCÍA-GAZÓLAZ J (1998). Paternanbidea (Ibero Navarra): Un yacimiento al aire libre de la prehistoria reciente de Navarra. *Cuadernos de Arqueología*, 6: 33-48.

GARCÍA-GAZÓLAZ J y SESMA J (1999). Talleres de sílex versus lugares de habitación. Los Cascajos (Los Arcos, Navarra) un ejemplo de neolitización en el Alto Valle del Ebro. II Congreso del Neolítico a la Península Ibérica. *Saguntum extr.* 2; Ed. Bernabeu Auban y Orozco Köhler, 343-350.

GARCÍA-GAZÓLAZ J y SESMA J (2001). Los Cascajos (Los Arcos Navarra) Intervenciones 1996-1999. *Trabajos de Arqueología Navarra*, 13: 299-306

GARCÍA-GAZÓLAZ J y SESMA J (2007a). Los enterramientos en el poblado Neolítico de Los Cascajos (Los Arcos). En *La tierra te sea leve. Arqueología de la muerte en Navarra Pamplona. Hispania Deorum*, 49-58.

GARCÍA-GAZÓLAZ J y SESMA J (2007b). Los enterramientos neolíticos del yacimiento de Paternanbidea (Ibero). En *La tierra te sea leve Arqueología de la muerte en Navarra Pamplona, Hispania Deorum*, 59-65.

GARCÍA O, FREGEL R, LARRUGA JM, ÁLVAREZ V, YURREBASO I, CABRERA VM, GONZÁLEZ AM (2010). Using mitochondrial DNA to test the hypothesis of a European post-glacial human recolonization from the Franco-Cantabrian refuge. *Heredity*, (in press).

GARCÍA SIVOLI C, MONTIEL R Y MALGOSA A (2003/4) Análisis de haplogrupos de DNAMT en restos dentales del Neolítico y Bronce catalán. *Rev. Esp. Antrop. Fis.*, 24: 109-122.

GARCÍA-MARTINEZ I (2008). La cuestión de la complejidad socioeconómica en las comunidades de cazadores-recolectores mesolíticos de la cuenca Alta y Media del Ebro. *Trabajos de prehistoria* 65: 49-71.

GHIROTTI S, MONA S, BENAZZO A, PAPAARAZZO F, CARAMELLI D, BARBUJANI G (2010). Inferring Genealogical Processes from Patterns of Bronze-Age and Modern DNA variation in Sardinia. *Mol. Biol. Evol.*, 27: 875-886.

GILBERT M T, WILLERSLEV E, HANSEN A J, BARNES I, RUDBECK L, LYNNERUP N, COOPER A (2003). Distribution patterns of postmortem damage in human mitochondrial DNA. *Am. J. Hum. Genet.*, 72: 32-47.

GILBERT MT (2005). Assessing ancient DNA studies. *Tren. Ecol. Evol.*, 10: 541-544.

GILBERT MT BANDELT HJ, HOFREITER M, BARNES I (2005). Assessing ancient DNA studies. *Tren. Ecol. Evol.*, 10: 541-544.

GILBERT MT y WILLERSLEV E (2006). Authenticity in ancient DNA studies. *Med. Secoli.*, 18: 701-723.

GIN'THER C, ISSEL-TARVER L y KING MC (1992). Identifying individuals by sequencing mitochondrial DNA from teeth. *Nat. Genet.*, 2: 135-138.

GIRALDO MP, ESTEBAN E, ALUJA MP, NOGUES RM, BACKES-DURO, C, DUGOUJON JM, MORAL P (2001). Gm and Km alleles in two Spanish Pyrenean populations (Andorra and Pallars Sobira): a review of Gm variation in the Western Mediterranean basin. *Ann. Hum. Genet.*, 65: 537-548

GOLENBERG EM, GIANNASI DE, CLEGG MT, SMILEY CJ, DURBIN M, HENDERSON D, ZURAWSKI G (1990). Chloroplast DNA sequence from a miocene Magnolia species. *Nature.*, 344: 656-658.

- GONZÁLEZ AM, BREHM A, PÉREZ JA, MACA-MEYER N, FLORES C, CABRERA VM (2003). Mitochondrial DNA Affinities at the Atlantic Fringe of Europe. *Am J Phys Anthropol.*, 120: 391-404.
- GONZÁLEZ AM, GARCIA O, LARRUGA JM, CABRERA VM (2006). The mitochondrial lineage U8a reveals a Paleolithic settlement in the Basque country. *BMC Genom.*, 7: 124.
- GONZÁLEZ ECHEGARAY PJ y GARCÍA-GUINEA MA y GEGINES A (1963). Cueva de La Chora. *Excavaciones Arqueológicas de España* (Madrid), 26: 43-65
- GONZÁLEZ ECHEGARAY PJ y RIPOLL E (1952). Hallazgos en la cueva de La Pasiega. *Ampurias XV-XVI* (Barcelona):43-65
- GREEN RE, KRAUSE J, PTAK SE, BRIGGS AW, RONAN MT, SIMONS JF, DU L, EGHOLM M, ROTHBERG JM, PAUNOVIC M, PÄÄBO S (2006). Analysis of one million base pairs of Neanderthal DNA. *Nature*, 444: 330-336.
- GUIMARAES S, GHIROTTI S, BENAZZO A, MILANI L, LARI M, PILLI E, PECCHIOLE E, MALLEGN F, LIPPI B, BERTOLDI F, GELICHI S, CASOLI A, BELLE EM, CARAMELLI D, BARBUJANI G (2009). Genealogical discontinuities among Etruscan, Medieval and contemporary Tuscans. *Mol. Biol. Evol.*, 26: 2157-2166.
- GUO SW y THOMPSON EA (1992). A Monte Carlo method for combined segregation and linkage analysis. *Am. J. Hum. Genet.*, 51: 1111-11126.
- HAAK W, FORSTER P, BRAMANTI B, MATSUMURA S, BRANDT G, TANZER M, VILLEMS R, RENFREW C, GRONENBORN D, ALT KW, BURGER J (2005). Ancient DNA from the first European farmers in 7500-year-old Neolithic sites. *Science*, 310: 1016-1018.
- HAGELBERG E, SYKES B y HEDGES R (1989). Ancient bone DNA amplified. *Nature*, 342:485.
- HAGELBERG E y CLEGG JB (1991). Isolation and characterization of DNA from archaeological bone. *Proc Biol Sci.*, 244: 45-50.
- HAGELBERG E (2003). Recombination or mutation rate heterogeneity? Implications for Mitochondrial Eve. *Trends. Genet.*, 19: 84-90.
- HANDT O, HÖSS M, KRINGS M, PÄÄBO S (1994). Ancient DNA: methodological challenges. *Experientia*, 50: 524-529.

HANDT O, KRINGS M, WARD RH y PÄÄBO S (1996). The retrieval of ancient human DNA sequences. *Am. J. Hum. Genet.*, 59: 368-376.

HÄNNI C, LAUDET V, SAKKA M, BÈGUE A, STÉHELIN D (1990). Amplification of mitochondrial DNA fragments from ancient human teeth and bones. *C. R. Acad. Sci. III.*, 310: 365-370.

HEBSGAARD MB, PHILLIPS MJ y WILLERSLEV E (2005). Geologically ancient DNA: fact or artefact? *Trends. Microbiol.*, 13(5): 212-220.

HELGASON A, HICKEY E, GOODACRE S, BOSNES V, STEFANSSON K, WARD R, SYKES B (2001). mtDNA and the Islands of the North Atlantic: Estimating the Proportions of Norse and Gaelic Ancestry. *Am. J. Hum. Genet.*, 68: 723-737.

HIGUCHI R, BOWMAN B, FREIBERGER M, RYDER OA, WILSON AC (1984). DNA sequences from the *quagga*, an extinct member of the horse family. *Nature*, 312: 282-284.

HO SY, HEUPINK TH, RAMBAUT A, SHAPIRO B (2007). Bayesian estimation of sequence damage in ancient DNA. *Mol. Biol. Evol.*, 24(6): 1416-1422.

HOFREITER M, JAENICKE V, SERRE D, HAESLER AV A, PÄÄBO S (2001a). DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA. *Nucleic. Acids. Res.*, 29: 4793-4799.

HOFREITER M, SERRE D, POINAR N, KUCH M, PÄÄBO S. (2001b). Ancient DNA. *Nature Review*, 2: 353-359.

HORAI S y HAYASAKA K (1990). Intraspecific nucleotide sequence differences in the major noncoding region of human mitochondrial DNA. *Am. J. Hum. Genet.*, 46: 828-842.

HORAI S (1995). Evolution and the origins of man: clues from complete sequences of hominoid mitochondrial DNA. *Southeast. Asian. J. Trop. Med. Public. Health.*, 26 Suppl 1: 146-154.

HORAI S, HAYASAKA K, KONDO R, TSUGANE K, TAKAHATA N . (1995). Recent African origin of modern humans revealed by complete sequences of hominoid mitochondrial DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 532-536.

HÖSS M, KOHN M, PÄÄBO S, KNAUER F, SCHRODER W (1992). Excrement analysis by PCR. *Nature*, 359: 199.

- HÖSS M, PÄÄBO S y VERESHCHAGIN NK (1994). Mammoth DNA sequences. *Nature* 370: 333.
- HÖSS M, JARUGA P, ZASTAWNY TH, DIZDAROGLU M, PÄÄBO S (1996). DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. *Nucleic. Acids. Res.* 24: 1304-1307.
- HÖSS M (2000). Ancient DNA: Neanderthal population genetics. *Nature*, 404: 453-454.
- INGMAN M, KAESSMANN H, PÄÄBO S, GYLLENSTEN U (2000) Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. *Nature*, 408: 708-713.
- IRIONDO M, BARBERO MC y MANZANO C (2003). DNA polymorphisms detect ancient barriers to gene flow in Basques. *Am. J. Phys. Anthropol.* 122: 73-84.
- IZAGIRRE N y 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. *Am. J. Hum. Gene.*, 65: 199-207.
- IZAGIRRE N, ALZUALDE A, ALONSO S, PAZ L, ALONSO A y DE LA RÚA C (2005). Rare haplotypes in mtDNA: applications in the analysis of biosocial aspects of past human populations. *Hum. Biol.* 77: 443-456.
- JOBLING MA y TYLER-SMITH C (2003). The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age. *Nat. Rev. Genet.*, 4: 598-612.
- JOBLING MA, HURLES ME y TYLER-SMITH C (2004). *Human evolutionary Genetics. Origins, Peoples & Disease*. Garland Publishing, India.
- JOHNSON MJ, WALLACE DC, FERRIS SD, RATTAZZI MC, CAVALLI-SFORZA LL (1983). Radiation of human mitochondrial DNA types analyzed by restriction endonuclease cleavage patterns. *J. Mol. Evol.*, 19: 255-271.
- KIVISILD T, SHEN P, WALL DP, DO B, SUNG R, DAVIS K, PASSARINO G, UNDERHILL PA, SCHARFE C, TORRONI A, SCOZZARI R, MODIANO D, COPPA A, DE KNIJFF P, FELDMAN M, CAVALLI-SFORZA LL, OEFNER PJ (2006). The role of selection in the evolution of human mitochondrial genomes. *Genetics*, 172:373-87.

KRAUSE J, DEAR PH, POLLACK JL, SLATKIN M, SPRIGGS H, BARNES I, LISTER AM, EBERSBERGER I, PÄÄBO S, HOFREITER M (2006). Multiplex amplification of the mammoth mitochondrial genome and the evolution of Elephantidae. *Nature*, 439: 724-727.

KRINGS M, STONE A, SCHMITZ RW, KRAINITZKI H, STONEKING M, PÄÄBO S (1997) Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell*, 90: 19-30.

KRINGS M, CAPELLI C, TSCHENTSCHER F, GEISERT H, MEYER S, VON HA, GROSSCHMIDT K, POSSNERT G, PAUNOVIC M, PÄÄBO S (2000). A view of Neandertal genetic diversity. *Nat. Genet.*, 26: 144-146.

KRUSKAL JB (1964). Multidimensional scaling by optimizing goodness of fit to a nonmetric hypothesis. *Psychometrika*, 29: 1-27.

KUROSAKI K, MATSUSHITA T y UEDA S (1993). Individual DNA identification from ancient human remains. *Am. J. Hum. Genet.*, 53: 638-643.

LAAYOUNI H, CALAFELL F y BERTRANPETIT J (2010). A genome-wide survey does not show the genetic distinctiveness of Basques. *Hum. Genet.*, 127: 455-458.

LABORDE M, BARANDIARÁN JM, ATURI T y ALTUNA J (1966). Excavaciones de Marizulo (Urnieta). Campaña 1964. *Munibe*, 18: 33-36.

LABORDE M, BARANDIARÁN JM, ATURI T y ALTUNA J (1967). Excavaciones de Marizulo (Urnieta). Campañas 1.965 y 1.967. *Munibe*, 19: 261-281.

LALUEZA-FOX C (1996). Mitochondrial DNA Haplogroups in four tribes from Tierra del Fuego-Patagonia: Inferences about the peopling of the Americas. *Hum. Biol.*, 68: 853-871.

LALUEZA-FOX C, SAMPIETRO ML, CARAMELLI D, PUDER Y, LARI M, CALAFELL F, MARTINEZ-MAZA C, BASTIR M, FORTEA J, DE LA RASILLA M, BERTRANPETIT J, ROSAS A (2005). Neandertal evolutionary genetics: mitochondrial DNA data from the iberian peninsula. *Mol. Biol. Evol.*, 22: 1077-1081.

LALUEZA-FOX C, KRAUSE J, CARAMELLI D, CATALANO G, MILANI L, SAMPIETRO ML, CALAFELL F, MARTINEZ-MAZA C, BASTIR M, GARCIA-TABERNERO A, DE LA RASILLA M, FORTEA J, PÄÄBO S, BERTRANPETIT J, ROSAS A (2006). Mitochondrial DNA of an Iberian Neandertal suggests a population affinity with other European Neandertals. *Curr. Biol.*, 16: 629-630.

LALUEZA-FOX C, ROMPLER H, CARAMELLI D, STAUBERT C, CATALANO G, HUGHES D, ROHLAND N, PILLI E, LONGO L, CONDEMI S, DE LA RASILLA M, FORTEA J, ROSAS A, STONEKING M, SCHONEBERG T, BERTRANPETIT J, HOFREITER M (2007). A melanocortin 1 receptor allele suggests varying pigmentation among Neanderthals. *Science*, 318: 1453-1455.

LARRUGA JM, DIEZ F, PINTO FM, FLORES C, GONZALEZ AM (2001). Mitochondrial DNA characterisation of European isolates: the Maragatos from Spain. *Eur. J. Hum. Genet.*, 9: 708-716.

LEE HY, SONG I, HA E, CHO SB, YANG WI, SHIN KJ (2008). mtDNAManager: a web-based tool for the management and quality analysis of mitochondrial DNA control-region sequences. *BMC Bioinformatics*, 9: 483.

LI WH (1977). Distribution of nucleotide differences between two randomly chosen cistrons in a finite population. *Genetic.*, 85: 331-337.

LINDAHL T (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, 362: 709-715.

LIRA J, LINDERHOLM A, OLARIA C, BRANDSTROM DM, GILBERT MT, ELLEGREN H, WILLERSLEV E, LIDEN K, ARSUAGA JL, GOTHERSTROM A (2010). Ancient DNA reveals traces of Iberian Neolithic and Bronze Age lineages in modern Iberian horses. *Mol. Ecol.*, 19: 64-78.

LIU H, PRUGNOLLE F, MANICA A, BALLOUX F (2006). A geographically explicit genetic model of worldwide human-settlement history. *Am. J. Hum. Genet.*, 79: 230-237.

LÓPEZ-PARRA AM, GUSMÃO L, TAVARES L, BAEZA C, AMORIM A, MESA MS, PRATA MJ, ARROYO-PARDO E (2009) In search of the pre- and post-neolithic genetic substrates in Iberia: evidence from Y-chromosome in Pyrenean populations. *Ann. Hum. Genet.*, 73: 42-53.

MACA-MEYER N, CABRERA V, ARNAY M, FLORES C, FREGEL R, GONZALEZ AM, LARRUGA JM (2005). Mitochondrial DNA diversity in 17th-18th century remains from Tenerife (Canary Island). *Am. J. Phys. Anthropol.*, 127: 418-426.

MACA-MEYER N, GONZALEZ AM, PESTANO J, FLORES C, LARRUGA JM, CABRERA VM (2003). Mitochondrial DNA transit between West Asia and North Africa inferred from U6 phylogeography. *BMC Genetics*, 4: 15.

MACAULAY V, RICHARDS M, HICKEY E, VEGA E, CRUCIANI F, GUIDA V, SCOZZARI R, BONNÉ-TAMIR B, SYKES B, TORRONI A (1999). The emerging tree of west Eurasian mtDNAs: a synthesis of control-region sequences and RFLPs. *Am. J. Hum. Genet.*, 64: 232-249.

MACAULAY V y RICHARDS M (2008). Mitochondrial genome sequences and their phylogeographic interpretation. In *Encyclopedia of Life Science (ELS)*. John Wiley and Sons, Chichester.

MALMSTRÖM H, GILBERT MT, THOMAS MG, BRANDSTROM M, STORA J, MOLNAR P, ANDERSEN PK, BENDIXEN C, HOLMLUND G, GOTHERSTROM A, WILLERSLEV E (2009). Ancient DNA reveals lack of continuity between neolithic hunter-gatherers and contemporary Scandinavians. *Curr. Biol.*, 19: 1758-1762.

MALMSTRÖM H, STORA J, DALEN L, HOLMLUND G, GOTHERSTROM A (2005). Extensive human DNA contamination in extract ancient dog bones and teeth. *Mol. Biol. Evol.*, 22: 2040-2047.

MALYARCHUK BA, GRZYBOWSKI T, DERENKO MV, CZARNY J, WOZNIAK M, MISCICKA-SLIWKA D (2002). Mitochondrial DNA variability in Poles and Russians. *Ann. Hum. Genet.*, 66: 261-283.

MANICA A, AMOS W, BALLOUX F y HANIHARA T (2007). The effect of ancient population bottlenecks on human phenotypic variation. *Nature*, 448: 346-348.

MANZANO C, AGUIRRE AI, IRIONDO M, MARTIN M, OSABA L, DE LA RÚA C (1996a). Genetic polymorphisms of the Basques from Gipuzkoa: genetic heterogeneity of the Basque population. *Ann. Hum. Biol.*, 23: 285-296.

MANZANO C, ORUE JM y DE LA RÚA C (1996b). The "Basqueness" of the Basques of Alava: a reappraisal from a multidisciplinary perspective. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 99: 249-258.

MARJANOVIC D, FORNARINO S, MONTAGNA S, PRIMORAC D, HADZISELIMOVIC R, VIDOVIC S, POJSKIC N, BATTAGLIA V, ACHILLI A, DROBNIC K (2005). The peopling of modern Bosnia-Herzegovina: Y-chromosome haplogroups in the three main ethnic groups. *Ann. Hum. Genet.* 69, 757-763.

MENOZZI P, PIAZZA A y CAVALLI-SFORZA L (1978). Synthetic maps of human gene frequencies in Europeans. *Science*, 201: 786-792.

METSPALU M, KIVISILD T, METSPALU E, PARIK J, HUDJASHOV1 G, KALDMA K, SERK P, KARMIN M, BEHAR DM, GILBERT TM, ENDICOTT P, MASTANA S, PAPIHA SS, SKORECKI K, TORRONI A, RICHARD V (2004). Most of the extant mtDNA boundaries in south and southwest Asia were likely shaped during the initial settlement of Eurasia by anatomically modern humans. *BMC Genetics*, 5: 26

MISHMAR D, RUIZ-PESINI E, GOLIK P, MACAULAY V, CLARK AG, HOSSEINI S, BRANDON M, EASLEY K, CHEN E, BROWN MD, SUKERNIK RI, OLCKERS A, WALLACE DC (2003). Natural selection shaped regional mtDNA variation in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 100: 171-176.

MONNAT RJ y REAY DT (1986). Nucleotide sequence identity of mitochondrial DNA from different human tissues. *Genetics*, 43: 205-211.

MONTIEL R, MALGOSA A y FRANCALACCI P (2001). Authenticating ancient human mitochondrial DNA. *Hum. Biol.*, 73: 689-713

MONTIEL R, GARCÍA C, CAÑADAS MP, ISIDRO A, GUIJO JM, MALGOSA A (2003). DNA sequences of *Mycobacterium leprae* recovered from ancient bones. *F.E.M.S. Microbiol. Lett.*, 226: 413-414

MULLIS K, FALOONA F, SCHARF S, SAIKI R, HORN G, ERLICH H (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold. Spring. Harb. Symp. Quant. Biol.*, 51-1: 263-273.

MULLIS KB y FALOONA FA (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods. Enzymol.*, 155: 335-350.

NEI M (1987). *Molecular evolutionary Genetics*. New York: Columbia University Press.

NEI M y LI WH (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 76: 5269-5273.

NOONAN JP, COOP G, KUDARAVALLI S, SMITH D, KRAUSE J, ALESSI J, CHEN F, PLATT D, PÄÄBO S, PRITCHARD JK, RUBIN EM (2006). Sequencing and analysis of Neanderthal genomic DNA. *Science*, 314: 1113-1118.

OOTA H, SAITOU N, MATSUSHITA T y UEDA S (1995). A genetic study of 2,000-year-old human remains from Japan using mitochondrial DNA sequences. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 98: 133-145.

OPDAL SH, ROGNUM TO, VEGE A, STAVE AK, DUPUY BM, EGELAND T (1998). Increased number of substitutions in the D-loop of mitochondrial DNA in the sudden infant death syndrome. *Acta Paediatr.* 87: 1039-1044.

ORLANDO L, DARLU P, TOUSSAINT M, BONJEAN D, OTTE M, HÄNNI C (2006). Revisiting Neanderthal diversity with a 100,000 year old mtDNA sequence. *Curr. Biol.*, 16: 400-402.

OVCHINNIKOV IV, GOTHERSTROM A, ROMANOVA GP, KHARITONOV VM, LIDEN K, GOODWIN W (2000). Molecular analysis of Neanderthal DNA from the northern Caucasus. *Nature*, 404: 490-493.

PÄÄBO S (1985). Molecular cloning of Ancient Egyptian mummy DNA. *Nature*, 314: 644-645.

PÄÄBO S (1989). Ancient DNA: extraction, characterization molecular, cloning and enzymatic amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 86: 1939-1943.

PÄÄBO S, HIGUCHI RG y WILSON AC (1989). Ancient DNA and the polymerase chain reaction. The emerging field of molecular archaeology. *J. Biol. Chem.*, 264: 9709-9712.

PÄÄBO S y WILSON AC (1991). Miocene DNA sequences - a dream come true? *Curr. Biol.*, 1: 45-46.

PÄÄBO S, POINAR H, SERRE D, JAENICKE-DESPRES V, HEBLER J, ROHLAND N, KUCH M, KRAUSE J, VIGILANT L, HOFREITER M (2004). Genetic analyses from ancient DNA. *Annu. Rev. Genet.*, 38: 645-679.

PAKENDORF B y STONEKING M (2005). Mitochondrial DNA and human evolution. *Annu. Rev. Genomics. Hum. Genet.* 6:165-83.

PARSONS TJ e IRWIN JA (2000) Questioning evidence for recombination in human mitochondrial DNA. *Science*, 288: 1931

PEÑA JA, CALDERON R, PEREZ-MIRANDA A, VIDALES C, DUGOUJON JM, CARRION M, CROUAU-ROY B (200). Microsatellite DNA markers from HLA region (D6S105, D6S265 and TNFa) in autochthonous Basques from Northern Navarre (Spain). *Ann. Hum. Biol.*, 29: 176-191.

PEREGO UA, ACHILLI A, ANGERHOFER N, ACCETTURO M, PALA M, OLIVIERI A, KASHANI BH, RITCHIE KH, SCOZZARI R, KONG QP, MYRES NM, SALAS A, SEMINO O, BANDELT HJ, WOODWARD SR, TORRONI A (2009). Distinctive Paleo-Indian migration routes from Beringia marked by two rare mtDNA haplogroups. *Curr. Biol.*, 19: 1-8.

PEREIRA L, PRATA MJ y AMORIM A (2000). Diversity of mtDNA lineages in Portugal: not a genetic edge of European variation. *Ann. Hum. Genet.*, 64: 491-506.

PEREIRA L, RICHARDS M, GOIOS A, ALONSO A, ALBARRAN C, GARCIA O, BEHAR DM, GOLGE M, HATINA J, AL-GAZALI L, BRADLEY DG, MACAULAY V, AMORIM A (2006). Evaluating the forensic informativeness of mtDNA haplogroup H sub-typing on a Eurasian scale. *Forensic. Sci. Int.*, 159: 43-50.

PESOLE G, SBISA E, PREPARATA G y SACCONI C (1992). The evolution of the mitochondrial D-loop region and the origin of modern man. *Mol. Biol. Evol.*, 9: 587-598.

PIAZZA A, RENDINE S, MINCH E, MENOZZI P, MOUNTAIN J, CAVALLI-SFORZA LL (1995). Genetics and the origin of European languages. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 92: 5836-5840.

PIERCY R, SULLIVAN KM, BENSON N, GILL P (1993). The application of mitochondrial DNA typing to the study of white Caucasian genetic identification. *Int. J. Legal. Med.*, 106: 85-90.

PLAZA S, CALAFELL F, HELAL A, BOUZERNA N, LEFRANC G, BERTRANPETIT J, COMAS D (2003). Joining the Pillars of Hercules: mtDNA sequences show multidirectional gene flow in the western Mediterranean. *Ann. Hum. Genet.*, 67: 312-328.

POETSCH M, WITTING H, KRAUSE D, LIGNITZ E (2003). Mitochondrial diversity of a northeast German population sample. *For. Sci. Int.*, 137: 125-132.

POINAR HN, HOSS M, BADA JL, PÄÄBO S (1996). Amino acid racemization and the preservation of ancient DNA. *Science*, 272: 864-866.

PRICE TD (2000). Europe's first farmers: an introduction. En: PRICE T.D. (Ed.). Europe's first farmers. *Cambridge University Press*. Cambridge. 1-18.

PRUVOST M, GRANGE T y GEIGL EM (2005). Minimizing DNA contamination by using UNG-coupled quantitative real-time PCR on degraded DNA samples: application to ancient DNA studies. *Biotechniques*, 38: 569-575

PULT I, SAJANTIL AA, SIMANAINEN J, GEORGIEV O, SCHAFFNER W, PÄÄBO S (1994). Mitochondrial DNA sequences from Switzerland reveal striking homogeneity of European populations. *Biol. Chem. Hoppe. Seyler.*, 375(12): 837-840.

QUINTANA-MURCI L, SEMINO O, BANDELT HJ, PASSARINO G, MCELREAVEY K, SANTACHIARA-BENERECETTI AS (1999a). Genetic evidence of an early exit of *Homo sapiens sapiens* from Africa through eastern Africa. *Nat. Genet.*, 23: 437-441.

QUINTANA-MURCI L, SEMINO O, POLONI ES, LIU A, VAN GM, PASSARINO G, BREGA A, NASIDZE IS, MACCIONI L, COSSU G, AL-ZAHERY N, KIDD JR, KIDD KK, SANTACHIARA-BENERECETTI AS (1999b). Y-chromosome specific YCAII, DYS19 and YAP polymorphisms in human populations: a comparative study. *Ann. Hum. Genet.*, 63: 153-166.

RAMACHANDRAN S, DESHPANDE O, ROSEMAN CC, ROSENBERG NA, FELDMAN MW, CAVALLI-SFORZA LL (2005). Support from the relationship of genetic and geographic distance in human populations for a serial founder effect originating in Africa. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 102: 15942-15947.

RANDO JC, PINTO F, GONZALEZ AM, HERNANDEZ M, LARRUGA JM, CABRERA VM, BANDELT HJ (1998). Mitochondrial DNA analysis of northwest African populations reveals genetic exchanges with European, near-eastern, and sub-Saharan populations. *Ann. Hum. Genet.*, 64: 531-550.

RAYMOND M. y ROUSSET F (1995) An exact test for population differentiation. *Evolut.*, 49:1280-1283.

RELETHFORD JH y JORDE LB (1999) Genetic evidence for larger African population size during recent human evolution. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 108: 251-260.

RELETHFORD JH (2001). Ancient DNA and the origin of modern humans. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 98(2): 390-391

- RELETHFORD JH (2008) Genetic evidence and the modern human origins debate. *Heredity*, 100(6): 555-563.
- RENFREW JW, PETTIGREW KD y RAPOPORT SI (1987). Motor activity and sleep duration as a function of age in healthy men. *Physiol. Behav.* 41: 627-634.
- RENFREW C, FORSTER P y HURLES M (2000). The past within us. *Nat. Genet.*, 26: 253-254.
- REYNOLDS J, WEIR B S Y COCKERHAM CC (1983). Estimation of the Coancestry Coefficient: Basis for a Short-Term Genetic Distance. *Genetics*, 105: 767-779.
- RICHARDS M, CORTE-REAL H, FORSTER P, MACAULAY V, WILKINSON-HERBOTS H, DEMAINE A, PAPIHA S, HEDGES R, BANDELT HJ y SYKES B (1996). Paleolithic and neolithic lineages in the European mitochondrial gene pool. *Am. J. Hum. Genet.*, 59: 185-203.
- RICHARDS MB, MACAULAY VA, BANDELT HJ AND SYKES BC (1998). Phylogeography of mitochondrial DNA in western Europe. *Ann. Hum. Genet.*, 62: 241-260.
- RICHARDS M, MACAULAY V, HICKEY E, VEGA E, SYKES B, GUIDA V, RENGO C, SELLITTO D, CRUCIANI F, KIVISILD T, VILLEMS R, THOMAS M, RYCHKOV S, RYCHKOV O, RYCHKOV Y, GOLGE M, DIMITROV D, HILL E, BRADLEY D, ROMANO V, CALI F, VONA G, DEMAINE A, PAPIHA S, TRIANTAPHYLIDIS C, STEFANESCU G, HATINA J, BELLEDI M, DI RIENZO A, NOVELLETTO A, OPPENHEIM A, NORBY S, AL-ZAHERI N, SANTACHIARA-BENERECETTI S, SCOZARI R, TORRONI A y BANDELT HJ (2000). Tracing European founder lineages in the Near Eastern mtDNA pool. *Am. J. Hum. Genet.*, 67: 1251-1276.
- RICHARDS M, MACAULAY V, TORRONI A, BANDELT HJ (2002). In search of geographical patterns in European mitochondrial DNA. *Am. J. Hum. Genet.*, 71: 1168-1174.
- RICHARDS M (2003). The Neolithic transition in Europe: archaeological models and genetic evidence *Documenta Praehistorica XXX*, Neolithic Studies 10: 159-167
- ROOTSI S, MAGRI C, KIVISILD T, BENUZZI G, HELP H, BERMISHEVA M, KUTUEV I, BARAC L, PERICIC M, BALANOVSKY O (2004). Phylogeography of Y-chromosome haplogroup I reveals distinct domains of prehistoric gene flow in Europe. *Am. J. Hum. Genet.*, 75: 128-137.

ROSSER ZH, ZERJAL T, HURLES ME, ADOJAAN M, ALAVANTIC D, AMORIM A, AMOS W, ARMENTEROS M, ARROYO E, BARBUJANI G, BECKMAN G, BECKMAN L, BERTRANPETT J, BOSCH E, BRADLEY DG, BREDE G, COOPER G, CORTE-REAL HB, DE KNIJFF P, DECORTE R, DUBROVA YE, EVGRAFOV O, GILISSEN A, GLISIC S, GOLGE M, HILL EW, JEZIOROWSKA A, KALAYDJIEVA L, KAYSER M, KIVISILD T, KRAVCHENKO SA, KRUMINA A, KUCINSKAS V, LAVINHA J, LIVSHITS LA, MALASPINA P, MARIA S, MCELREAVEY K, MEITINGER TA, MIKELSAAR AV, MITCHELL RJ, NAFA K, NICHOLSON J, NORBY S, PANDYA A, PARIK J, PATSALIS PC, PEREIRA L, PETERLIN B, PIELBERG G, PRATA MJ, PREVIDERE C, ROEWER L, ROOTSI S, RUBINSZTEIN DC, SAILLARD J, SANTOS FR, STEFANESCU G, SYKES BC, TOLUN A, VILLEMS R, TYLER-SMITH C, JOBLING MA (2000). Y-chromosomal diversity in Europe is clinal and influenced primarily by geography, rather than by language. *Am. J. Hum. Genet.*, 67: 1526-1543.

SAJANTILA A, LAHERMO P, ANTTINEN T, LUKKA M, SISTONEN P, SAVONTAUS ML, AULA P, BECKMAN L, TRANEBJAERG L, GEDDE-DAHL T, ISSEL-TARVER L, DIRIENZO A, PÄÄBO S (1995). Genes and languages in Europe: an analysis of mitochondrial lineages. *Genome Research*, 5: 42-52.

SAJANTILA A, SALEM AH, SAVOLAINEN P, BAUER K, GIERIG C, PÄÄBO S (1996). Paternal and maternal DNA lineages reveal a bottleneck in the founding of the Finnish population. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 93: 12035-12039.

SALAS A, COMAS D, LAREU MV, BERTRANPETT J, CARRACEDO A (1998) mtDNA analysis of the Galician population: a genetic edge of European variation. *Eur. J. Hum. Genet.*, 6: 365-375.

SAMBROOK J, FRITSCH EF Y MANIATIS T (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Second Edition (Plainview, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

SAMPIETRO ML, CARAMELLI D, LAO O, CALAFELL F, COMAS D, LARI M, AGUSTÍ B, BERTRANPETT J, LALUEZA-FOX C (2005). The genetics of the pre-Roman Iberian Peninsula: a mtDNA study of ancient Iberians. *Annals of Human Genetics*, 69: 1-14.

SAMPIETRO ML, LAO O, CARAMELLI D, LARI M, POU R, MARTI M, BERTRANPETT J, LALUEZA-FOX C (2007). Palaeogenetic evidence supports a dual model of Neolithic spreading into Europe. *Proc. Biol. Sci.*, 274: 2161-2167.

SCHNEIDER S y EXCOFFIER L (1999). Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: application to human mitochondrial DNA. *Genetics*, 152: 1079-1089.

SCHMITZ RW, SERRE D, BONANI G, FEINE S, HILLGRUBER F, KRAINITZKI H, PÄÄBO S, SMITH FH (2002). The Neandertal type site revisited: interdisciplinary investigations of skeletal remains from the Neander Valley, Germany. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 99: 13342-13347.

SEMINO O, PASSARINO G, BREGA A, FELLOUS M, SANTACHIARA-BENERECETTI AS (1996). A view of the neolithic demic diffusion in Europe through two Y chromosome-specific markers. *Am. J. Hum. Genet.*, 59: 964-968.

SEMINO O, PASSARINO G, OEFNER PJ, LIN AA, ARBUZOVA S, BECKMAN LE, DE BENEDICTIS G, FRANCALACCI P, KOUVATSI A, LIMBORSKA S, MARCIKIAE M, MIKA A, MIKA B, PRIMORAC D, SANTACHIARA-BENERECETTI AS, CAVALLI-SFORZA LL, UNDERHILL PA (2000). The genetic legacy of Paleolithic Homo sapiens sapiens in extant Europeans: a Y chromosome perspective. *Science*, 290: 1155-1159.

SERRE D, HOFREITER M y PÄÄBO S (2004). Mutations induced by ancient DNA extracts? *Mol. Biol. Evol.*, 21: 1463-1467.

SIGURGARDOTTIR S, HELGASON A, GULCHER JR, STEFANSSON K, DONNELLY P (2000). The mutation rate in the human mtDNA control region. *Am. J. Hum. Genet.*, 66: 1599-15609.

SLATKIN M y VOELM L (1991). F_{ST} in a hierarchical island model. *Genet.*, 127, 627-629

SLATKIN M (1995). A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genet.*, 139: 457-462.

SOARES P, ERMINI L, THOMSON N, MORMINA M, RITO T, ROHL A, SALAS A, OPPENHEIMER S, MACAULAY V, RICHARDS MB (2009). Correcting for purifying selection: an improved human mitochondrial molecular clock. *Am. J. Hum. Genet.*, 84: 740-759.

SOARES P, ACHILLI A, SEMINO O, DAVIES W, MACAULAY V, BANDELT HJ, TORRONI A, RICHARDS MB (2010). The archaeogenetics of Europe. *Curr. Biol.*, 20: R174-R183.

SOKAL RR, ODEN NL y WILSON C (1991). Genetic evidence for the spread of agriculture in Europe by demic diffusion. *Nature*, 351: 143-145.

SPENCER M y HOWE CJ (2004). Authenticity of ancient-DNA results: a statistical approach. *Am. J. Hum. Genet.*, 75: 240-250

TAKAHATA N, LEE SH y SATTA Y (2001). Testing multiregionality of modern human origins. *Mol. Biol. Evol.*, 18: 172-183.

TAMBETS K, ROOTSI S, KIVISILD T, HELP H, SERK P., LOOGVA LI, E.-L., TOLK HV, REIDLA M, METSPALU E, PLISS L (2004). The western and eastern roots of the Saami - the story of genetic "outliers" told by mitochondrial DNA and Y chromosomes. *Am. J. Hum. Genet.*, 74: 661-682.

TANG S y HUANG T (2010). Characterization of mitochondrial DNA heteroplasmy using a parallel sequencing system. *BioTechnol.*, 48 (in press).

TEMPLETON AR (2005). Haplotype trees and modern human origins. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 41:33-59.

TEMPLETON AR (2007). Genetics and recent human evolution. *Evolution*, 61: 1507-1519.

TORRONI A, LOTT MT, CABELL MF, CHEN YS, LAVERGNE L, WALLACE DC (1994). mtDNA and the origin of Caucasians: identification of ancient Caucasian-specific haplogroups, one of which is prone to a recurrent somatic duplication in the D-loop region. *Am. J. Hum. Genet.*, 55: 760-776.

TORRONI A, HUOPONEN K, FRANCALACCI P, PETROZZI M, MORELLI L, SCOZZARI R, OBINU D, SAVONTAUS ML (1996). Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations. *Genetics*, 144: 1835-1850.

TORRONI A, BANDELT HJ, D'URBANO L, LAHERMO P, MORAL P, SELITTO D, RENGO C, FORSTER P, SAVONTAUS M L, BONNE-TAMIR B, SCOZZARI R (1998). mtDNA analysis reveals a major late Paleolithic population expansion from southwestern to northeastern Europe. *Am. J. Hum. Genet.*, 62: 1137-1152.

TORRONI A, HUOPONEN K, FRANCALACCI P, PETROZZI M, TULLY LA y LEVIN BC (2000) Human mitochondrial genetics. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 17: 147-177.

TORRONI A, BANDELT HJ, MACAULAY V, RICHARDS M, CRUCIANI F, RENGO C, MARTINEZ-CABRERA V, VILLEMS R, KIVISILD T, METSPALU E, PARIK J, TOLK HV, TAMBETS K, FORSTER P, KARGER B, FRANCALACCI P, RUDAN P, JANICIJEVIC B, RICKARDS O, SAVONTAUS ML, HUOPONEN K, LAITINEN V, KOIVUMAKI S, SYKES B, HICKEY E, NOVELLETTO A, MORAL P, SELKITTO D, COPPA A, AL-ZAHERI N, SANTACHIARA-BENERECETTI AS, SEMINO O, SCOZZARI R (2001). A signal, from human mtDNA, of postglacial recolonization in Europe. *Am. J. Hum. Genet.*, 69: 844-852.

TORRONI A, ACHILLI A, MACAULAY V, RICHARDS M, BANDELT HJ (2006). Harvesting the fruit of the human mtDNA tree. *Trends. Genet.*, 22. 339-345.

ULLMANN A, JACOB F y MONOD J (1967). Characterization by in vitro complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the beta-galactosidase structural gene of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, 24: 339-343.

VERNESI C, CARAMELLI D, DUPANLOUP I, BERTORELLE G, LARI M, CAPPELLINI E, MOGGI-CECCHI J, CHIARELLI B, CASTRI L, CASOLI A, MALLEGNI F, LALUEZA-FOX C, BARBUJANI G (2004). The Etruscans: a population-genetic study. *Am. J Hum. Genet.*, 74: 694-704.

VIGILANT L, STONEKING M, HARPENDING H, HAWKES K, WILSON AC (1991). African populations and the evolution of human mitochondrial DNA. *Science*, 253: 1503-1507.

VIGNE JD, ZAZZO A, SALIEGE JF, POPLIN F, GUILAINE J, SIMMONS A (2009). Pre-Neolithic wild boar management and introduction to Cyprus more than 11.400 years ago. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 106: 16135-16138.

VILLALBA MJ, EDO M y BLASCO A (1995). Tecnologia minera neolítica a partir del yacimiento de Can Tintorer (Gavà, Baix Llobregat). *1º Congreso de arqueología peninsular. Actas*. VI. Porto.

WALL JD y KIM SK (2007). Inconsistencies in Neanderthal genomic DNA sequences. *PLoS Genetics*, 175.

WASON PK. (1994). The archaeology of rank. *Cambridge University Press, Cambridge*.

WATKINS WS, RICKER CE, BAMSHAD MJ, CARROLL ML, NGUYEN SV, BATZER MA, HARPENDING HC, ROGERS AR, JORDE LB (2001). Patterns of

ancestral human diversity: an analysis of Alu-insertion and restriction-site polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.*, 68: 738-52.

WATSON E, FORSTER P, RICHARDS M y BANDELT HJ (1997). Mitochondrial footprints of human expansions in Africa. *Am. J. Hum. Genet.* 61: 691-704.

WHITE TD y FOLKENS PA (2005). *The human bone manual* Ed, Elsevier academic Press.

WILLERSLEV E, HANSEN AJ, RONN R, BRAND TB, BARNES I, WIUF C, GILICHINSKY D, MITCHELL D, COOPER A (2004). Long-term persistence of bacterial DNA. *Curr. Biol.*, 14: 9-10.

WILLERSLEV E y COOPER A (2005). Ancient DNA. *Proc. Biol. Sci.*, 272: 3-16.

WOODWARD S, WEYAND NJ y BUNNELL M (1994). DNA sequence from Cretaceous period bone fragments. *Science*, 266: 1229-1232.

ZIERDT H, HUMMEL S y HERRMANN B (1996). Amplification of human short tandem repeats from medieval teeth and bone samples. *Hum. Biol.*, 68: 185-199.

ZILHAO J (2001). Radiocarbon evidence for maritime pioneer colonization at the origins of farming in west Mediterranean Europe. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 98: 14180-14185.

ZISCHLER H, HÖSS M, HANDT O, VON HAESELER A, VAN DER KUYL AC, GOUDSMIT J, PÄÄBO S (1995). Detecting dinosaur DNA. *Science*, 268: 1192-1193.

ZVELEBIL L (2000). Looking back at the Neolithic transition in Europe *European Journal of Archaeology*; 8: 183-190

ANEXO I

Tabla A1. Piezas dentarias analizadas en el presente estudio, junto con la nomenclatura de cada individuo y las medidas tomadas en mm. Piezas dentarias recuperadas de los yacimientos de Los Cascajos (CAS), Urtiaga (URT), Marizulo (MZ), Erralla (ERR), Fuente Hoz (FH), La Pasiega (PS), La Chora (Ch) y Paternabidea (PAT). (“*In situ*”, piezas dentarias que se encuentran en los maxilares y “*seltas*”, piezas dentarias que no se encuentran en los maxilares, sino asociadas a los inhumados).

| Individuo | Sigla | Pieza dentaria | Diámetro Mesio-distal | Diámetro Buco-lingual | Altura diente | Altura raíz | Altura corona |
|-----------|-------|-------------------|-----------------------|-----------------------|---------------|-------------|---------------|
| CAS-21 | 21a | 38 <i>in situ</i> | 11,7 | 10,8 | 22,1 | 15,8 | 6,3 |
| | 21b | 44 suelto | 8,3 | 8,6 | 28,2 | 19,7 | 8,4 |
| | 21c | 31 suelto | 6,3 | 6,9 | 24,3 | 18,2 | 6,1 |
| CAS-33 | 33a | 33 <i>in situ</i> | 7,9 | 8,1 | 27 | 18 | 9 |
| | 33b | 44 <i>in situ</i> | 9,3 | 7,4 | 22,4 | 16,4 | 6 |
| | 33c | 45 <i>in situ</i> | 6,6 | 8,2 | 21,2 | 14,9 | 6,3 |
| CAS-48 | 48a | 36 suelto | 10 | 9 | 19,3 | 15,4 | 3,9 |
| | 48b | 28 suelto | 11,2 | 8,8 | 16 | 10,7 | 5,3 |
| | 48 | 38 suelto | 9,9 | 9,1 | 18,8 | 13,7 | 5,1 |
| CAS-70 | 70a | 48 suelto | 7,3 | 9,9 | 13,5 | 7,6 | 5,9 |
| CAS-90 | 90a | 36 suelto | 12 | 11,2 | 18,9 | 13,4 | 5,5 |
| | 90b | 46 suelto | 10 | 9,8 | 18,5 | 13,3 | 5,2 |
| | 90c | 37 suelto | 11 | 9,7 | 17,9 | 11,1 | 6,8 |
| CAS-173 | 173a | 36 suelto | 11,5 | 11,2 | 19,2 | 11,9 | 7,3 |
| | 173b | 26 suelto | 9,1 | 11,4 | 19,9 | 12,3 | 7,6 |
| | 173c | 16 suelto | 11,2 | 8,5 | 17,2 | 11,9 | 5,3 |
| | 173d | 34 <i>in situ</i> | 6,8 | 8,9 | 21,3 | 13,3 | 7,9 |
| CAS-179 | 179a | 42 <i>in situ</i> | 6 | 11 | 21 | 16,1 | 4,9 |
| | 179b | 46 <i>in situ</i> | 12,2 | 6,2 | 21 | 16,6 | 4,4 |
| CAS-180 | 180a | 23 suelto | 8,2 | 8,3 | 29,8 | 18,6 | 11,2 |
| | 180b | 27 suelto | 13 | 8,3 | 23,2 | 18,7 | 4,5 |
| | 180c | 47 <i>in situ</i> | 5,1 | 6,9 | 22,3 | 13,2 | 9,1 |
| | 180d | 26 suelto | 12,9 | 10 | 22,2 | 15,1 | 7,1 |
| | 180e | 24 suelto | 7,1 | 9,2 | 22,9 | 12 | 6,7 |
| CAS-181 | 181a | 36 suelto | 11 | 11,2 | 18,8 | 12,1 | 6,7 |
| CAS-183 | 183a | 23 suelto | 6,2 | 6,9 | 18,9 | 13,3 | 5,6 |
| | 183b | 24 suelto | 6 | 6,3 | 20,3 | 16,1 | 4,2 |
| | 183 | 44 suelto | 6,7 | 6,4 | 16,2 | 13,4 | 2,8 |

| Individuo | Sigla | Pieza dentaria | Diámetro Mesio-disatal | Diámetro Buco-lingual | Altura diente | Altura raíz | Altura corona |
|-----------|-------|-------------------|------------------------|-----------------------|---------------|-------------|---------------|
| CAS-191 | 191a | 32 <i>in situ</i> | 6,2 | 6,98 | 21,86 | 14,66 | 7,2 |
| | 191b | 35 <i>in situ</i> | 8,01 | 9,08 | 19,99 | 13,03 | 6,96 |
| | 191c | 33 <i>in situ</i> | 6,89 | 7,83 | 29,06 | 20,13 | 8,93 |
| CAS-193S | 193a | 41 <i>in situ</i> | 5,55 | 6,02 | 18,52 | 10,62 | 7,9 |
| | 193b | 31 <i>in situ</i> | 5,56 | 6,01 | 21,03 | 12,51 | 8,52 |
| | 193S | 42 <i>in situ</i> | 4,37 | 6,05 | 24,02 | 13,97 | 10,05 |
| CAS-194 | 194a | 38 <i>in situ</i> | 9,98 | 9,15 | 20,07 | 12,86 | 7,21 |
| | 194b | 35 <i>in situ</i> | 8,16 | 7,21 | 21,59 | 17,43 | 4,16 |
| | 194 | 37 <i>in situ</i> | 11,23 | 10,63 | 21,52 | 16,45 | 5,07 |
| CAS-196 | 196a | 23 <i>in situ</i> | 6,79 | 7,92 | 25,9 | 17,98 | 7,92 |
| | 196b | 14 <i>in situ</i> | 6,34 | 8,78 | 21,69 | 15,93 | 5,76 |
| | 196c | 24 <i>in situ</i> | 6,03 | 8,34 | 22,25 | 16,24 | 6,01 |
| CAS-202 | 202a | 16 <i>in situ</i> | 10,48 | 10,68 | 20,58 | 14,62 | 5,96 |
| | 202b | 24 <i>in situ</i> | 7,4 | 8,5 | 21,2 | 13,56 | 7,64 |
| | 202 | 14 <i>in situ</i> | 7,3 | 8,36 | 21,5 | 15,22 | 6,28 |
| CAS-203 | 203a | 47 <i>in situ</i> | 8,36 | 9,33 | 17,72 | 11,24 | 6,48 |
| | 203b | 17 suelto | 9,32 | 9,74 | 10,56 | 4,07 | 6,49 |
| | 203c | PM suelto | 3,6 | 8,3 | 21,7 | 15,9 | 5,8 |
| | 203 | 27 suelto | 8,12 | 10,15 | 20,79 | 14,75 | 6,04 |
| CAS-204 | 204a | 42 suelto | 7,04 | 6,27 | 18,71 | 12,72 | 5,99 |
| | 204b | molar deciduo | 11 | 13 | 20,5 | 14,3 | 6,2 |
| CAS-216 | 216a | 45 <i>in situ</i> | 6,43 | 7,67 | 18,33 | 13,76 | 4,57 |
| | 216b | 38 <i>in situ</i> | 9,51 | 10,93 | 18,23 | 13,17 | 5,06 |
| | 216c | 47 <i>in situ</i> | 9,98 | 10,04 | 17,47 | 12,23 | 5,24 |
| CAS-222 | 222a | 44 suelto | 5,96 | 7,31 | 19,92 | 15,27 | 4,65 |
| | 222b | 37 suelto | 9,86 | 8,67 | 17,45 | 12,86 | 4,59 |
| | 222c | 38 suelto | 10,34 | 9,3 | 18,63 | 14,27 | 4,36 |
| CAS-254 | 254a | 21 suelto | 7,95 | 6,61 | 23,72 | 12,58 | 11,14 |
| | 254b | M suelto | 10,16 | 11,5 | 19,93 | 13,16 | 6,77 |
| CAS-257 | 257a | 23 suelto | 5,41 | 7,48 | 25,15 | 19,74 | 5,41 |
| | 257b | 21 suelto | 6,68 | 6,59 | 21,64 | 14,89 | 6,75 |
| | 257c | 34 <i>in situ</i> | 5,4 | 6,7 | 17,2 | 12,3 | 4,9 |
| | 257d | 33 <i>in situ</i> | 6,2 | 6 | 21,6 | 14,5 | 7,1 |
| CAS-258 | 258a | 37 <i>in situ</i> | 10,52 | 9,86 | 17,07 | 9,54 | 7,53 |
| | 258b | 42 suelto | 6,68 | 6,91 | 22,04 | 13,91 | 8,13 |
| | 258c | 35 <i>in situ</i> | 5,98 | 8,34 | 22,13 | 17,47 | 4,66 |
| CAS-340 | 340a | 36 suelto | 8,48 | 8,78 | 17,31 | 10,55 | 6,76 |

| Individuo | Sigla | Pieza dentaria | Diámetro Mesio-disatal | Diámetro Buco-lingual | Altura diente | Altura raíz | Altura corona |
|----------------|--------------|-------------------|------------------------|-----------------------|---------------|-------------|---------------|
| CAS-497 | 497a | PM <i>in situ</i> | 7,19 | 7,83 | 18,22 | 13,81 | 4,41 |
| CAS-517 | 517a | 35 <i>in situ</i> | 9 | 10,72 | 18,79 | 13,54 | 5,25 |
| | 517b | 44 suelto | 7,21 | 10,11 | 23,95 | 15,62 | 8,33 |
| | 517c | PM2 suelto | 4,9 | 5,7 | 18,8 | 6,3 | 12,5 |
| | 517d | 47 suelto | 11,44 | 9,53 | 18,2 | 11,24 | 6,96 |
| | 517e | C suelto | 6,8 | 8,1 | 26,3 | 16,7 | 10,6 |
| CAS-517 | 517a | 35 <i>in situ</i> | 9 | 10,72 | 18,79 | 13,54 | 5,25 |
| | 517b | 44 suelto | 7,21 | 10,11 | 23,95 | 15,62 | 8,33 |
| | 517c | PM2 suelto | 4,9 | 5,7 | 18,8 | 6,3 | 12,5 |
| | 517d | 47 suelto | 11,44 | 9,53 | 18,2 | 11,24 | 6,96 |
| | 517e | C suelto | 6,8 | 8,1 | 26,3 | 16,7 | 10,6 |
| ERR-1 | ERR-1a | 16 | 10,98 | 11,18 | 16,4 | 11,14 | 5,26 |
| | ERR-1b | 13 | 6,56 | 5,6 | 21,93 | 14,68 | 7,25 |
| MZ-1 | MZ-1b | 33 <i>in situ</i> | 8,44 | 6,59 | 27,83 | 18,7 | 9,13 |
| | MZ-1 a | 13 <i>in situ</i> | 9,27 | 8,19 | 25,02 | 15,4 | 9,62 |
| | MZ-1c | 12 <i>in situ</i> | 6,7 | 5,9 | 21,33 | 12,4 | 8,93 |
| URT-1 | URT 1a | 14 | 7,79 | 6,38 | 16,37 | 11,32 | 5,05 |
| | URT 1b | 26 | 9,95 | 10,91 | 17,65 | 11,01 | 6,64 |
| URT-2 | URT-2b | 16 | 12,1 | 10,85 | 17,55 | 10,26 | 7,29 |
| | URT 2a | 17 | 12,22 | 9,1 | 18,82 | 11,32 | 7,5 |
| URT-3 | URT-3a | 26 | 11,09 | 12,07 | 18,37 | 12,24 | 6,13 |
| FH-1 | FH-1b | 47 | 9,22 | 10,41 | 15,95 | 10,86 | 5,09 |
| | FH-1a | 38 | 9,27 | 9,73 | 11,88 | 6,98 | 4,9 |
| FH-2 | FH 2a | 13 | 8,35 | 6,71 | 24,62 | 14,25 | 10,37 |
| | FH 2b | 23 | 7,03 | 7,14 | 24,2 | 16,25 | 7,95 |
| FH-3 | FH 3b | 48 | 8,81 | 9,05 | 16,83 | 12,45 | 4,38 |
| | FH 3a | 47 | 9,04 | 9,67 | 17,95 | 13,69 | 4,26 |
| FH-4 | FH-4a | 22 | 7,61 | 5,71 | 20,49 | 13,73 | 6,76 |
| | FH 4 | 25 | 7,99 | 5,87 | 18,38 | 13,7 | 4,68 |
| | FH 4b | 26 | 11,29 | 7,43 | 17,57 | 14,32 | 3,25 |
| FH-5 | FH 5 maxi-a | 18 | 11,52 | 9,49 | 16,07 | 10,93 | 5,14 |
| | FH 5 mandi-b | 34 | 7,95 | 6,73 | 21,08 | 15,55 | 5,53 |
| | FH5 mandi-a | 35 | 8,49 | 6,7 | 22,44 | 17 | 5,44 |
| FH-6 | FH6a | 46 | 10,5 | 10,34 | 17,75 | 11,95 | 5,8 |
| | FH6b | 47 | 11,6 | 9,13 | 17,19 | 11,44 | 5,75 |
| PS-1 | Ps-1a | 21 <i>in situ</i> | 6,93 | 4,9 | 24,35 | 12,15 | 12,2 |

| Individuo | Sigla | Pieza dentaria | Diámetro Mesio-disatal | Diámetro Buco-lingual | Altura diente | Altura raíz | Altura corona |
|----------------|-------|-------------------|------------------------|-----------------------|---------------|-------------|---------------|
| CH-1 | Ch-1a | 23 <i>insitu</i> | 7,8 | 5,9 | 23,7 | 15,8 | 7,9 |
| PAT-1E1 | 1E1a | 38 | 10,13 | 9,38 | - | - | - |
| | 1E1b | 48 | 10,77 | 9,58 | - | - | - |
| | 1E1c | 47 <i>in situ</i> | 10,77 | 9,58 | - | - | - |
| PAT-1E3 | 1E3a | 15 | 5,61 | 9,1 | - | - | - |
| | 1E3b | 14) | 6,02 | 9,13 | - | - | - |
| | 1E3c | 17 <i>in situ</i> | 11,9 | 9,24 | - | - | - |
| PAT-1E4 | 1E4a | Canino suelto | 5,92 | 8,09 | - | - | - |
| | 1E4b | 46 | 8,88 | 11,51 | - | - | - |
| | 1E4c | 47 <i>in situ</i> | 9,48 | 9,28 | - | - | - |
| PAT-1E5 | 1E5a | 26 | 10,48 | 11,33 | - | - | - |
| | 1E5b | 65 | 9,28 | 8,01 | - | - | - |
| PAT-2E1 | 2E1a | Canino suelto | 5,39 | 8,23 | - | - | - |
| | 2E1b | 34 | 5,62 | 7,51 | - | - | - |
| | 2E1c | 35 <i>in situ</i> | 6,35 | 8,03 | - | - | - |
| PAT-2E2 | 2E2a | PM | 6,75 | 8,02 | - | - | - |
| | 2E2b | M2 | 11,38 | 10,54 | - | - | - |
| | 2E2c | 25 <i>in situ</i> | 6,75 | 8,02 | - | - | - |
| | 2E2d | 47 <i>in situ</i> | 10,97 | 9,74 | - | - | - |
| PAT-3E2 | 3E2a | 35 | 5,22 | 7,34 | - | - | - |
| PAT-4E1 | 4E1a | 34 | 6,96 | 7,9 | - | - | - |
| | 4E1b | 37 | 10,32 | 10,67 | - | - | - |
| | 4E1c | 38 <i>in situ</i> | 10,61 | 9,57 | - | - | - |
| PAT-4E2 | 4E2a | 42 | 4,63 | 5,9 | - | - | - |
| | 4E2b | 43 | 5,19 | 6,97 | - | - | - |
| | 4E2c | 48 | 9,58 | 7,74 | - | - | - |

Tabla A2. Estudio osteométrico de los restos óseos analizados. Se presentan las medidas correspondientes a los huesos recuperados de los yacimientos de Los Cascajos (CAS) y Paternanbidea (PAT).

| Ind. | Sigla | Hueso | Long. Total (mm) | Anch. total (mm) | a)* | b)* | c)* |
|---------|----------|------------------------|------------------|------------------|------|-----|------|
| PAT-1E2 | PAT-1E2a | humero izquierdo | 186,39 | - | 52 | 26 | 38 |
| PAT-3E1 | PAT-3E1a | tibia derecho | 1175,75 | 43 | | | |
| PAT-3E2 | PAT-3E2b | humero derecho | 242 | - | 59,9 | 28 | 41,4 |
| CAS-70 | CAS-70b | fémur izquierdo | 181 | 128,5 | | | |
| CAS-73 | CAS-73a | Cubito izquierdo | 147 | 123,31 | | | |
| CAS-148 | CAS-148a | diáfisis tibia | 204,8 | 25,66 | | | |
| CAS-182 | CAS-182a | Diáfisis humero | 113,3 | 21,98 | | | |
| CAS-195 | CAS-195a | Diáfisis fémur | 290,34 | 30,58 | | | |
| CAS-201 | CAS-201a | humero | 264,95 | 25,87 | | | |
| CAS-205 | CAS-205a | Diáfisis fémur derecho | 253,3 | 26,33 | | | |
| CAS-262 | CAS-262a | fémur | 195,74 | 22,33 | | | |
| CAS-263 | CAS-263a | tibia | 155,34 | 21,4 | | | |
| CAS-340 | CAS-340b | fémur derecho | 111 | 39,4 | | | |
| CAS-497 | CAS-497b | fémur izquierdo | 221 | 44 | | | |

a)* anchura máxima epífisis bicondilar; b)* anchura mínima tróclea posterior c)* anchura mínima anterior.