

## Aportación de la biología molecular al estudio antropológico de las poblaciones humanas del pasado: análisis del ADN mitocondrial

IZAGIRRE N y DE LA RÚA C

*Rev. Esp. Antrop. Biol.* (2000) **21**: 1-10

Recibido: 1 junio 1999

Euskal Herriko Unibertsitatea (U.P.V. / E.H.U.).

Zientzi Fakultatea. Animalia Biologia eta Genetika Saila., Posta Kutxa, 644. 48080 Bilbo,  
Tel. 946 012 544, Fax 944 448 500, e-mail: ggpruvac@lg.ehu.es

*Palabras clave:* ADN antiguo, haplogrupos del ADN mitocondrial, genética de poblaciones, expansión neolítica

---

Se ha analizado la variabilidad del ADNmt mediante el análisis de RFLPs en muestras de 3 yacimientos del País Vasco (SJAPL, Pico Ramos y Longar), que abarcan un periodo de tiempo comprendido entre el Neolítico y la Edad del Bronce. El análisis genético de restos arqueológicos ha resultado un método eficaz y factible para el estudio de las relaciones biológicas existentes entre los grupos humanos del pasado. La comparación de los resultados obtenidos, muestra que Longar presenta peculiaridades genéticas, debidas principalmente a la ausencia del haplogrupo J. Además, este análisis aporta un nuevo enfoque interpretativo a los datos genéticos proporcionados por las poblaciones actuales. Así, la elevada frecuencia del haplogrupo J observada en Pico Ramos y SJAPL (situados en la región Cantábrica y en el Alto Valle del Ebro, respectivamente), permiten suponer que no hubo una influencia diferencial del Neolítico dentro del País Vasco. Sin embargo es necesario disponer de datos de un mayor número de muestras para poder plantear hipótesis más concluyentes.

© 2000 Sociedad Española de Antropología Biológica

---

### Introducción

En las últimas décadas la reconstrucción de la historia evolutiva de las poblaciones humanas se ha basado en el análisis estadístico de numerosos marcadores bioquímicos. En los primeros trabajos las limitaciones metodológicas sólo permitían disponer de información acerca de los polimorfismos de los productos génicos (grupos sanguíneos, proteínas séricas,...), tipados mediante técnicas inmunológicas o electroforéticas. A lo largo de los años se ha ido acumulando una extensa base de datos de frecuencias alélicas de estos polimorfismos, denominados *marcadores clásicos*. En los últimos 10 años, las técnicas de biología molecular han permitido el análisis directo de los genes codificantes, y la posibilidad de realizar un mayor número de análisis en menos tiempo. Los primeros trabajos de investigación de biología molecular aplicada a la evolución humana se dirigieron hacia el análisis del ADN mitocondrial (ADNmt) (Cann *et al.*, 1987; Vigilant *et al.*, 1991). El modo de herencia materno y la ausencia de recombinación convierten esta molécula en una herramienta ideal por las siguientes razones: por un lado, metodológicamente, no es necesario distinguir los dos haplotipos, como en el caso de los loci autosómicos y por otro, permite la reconstrucción directa de la historia evolutiva de las poblaciones. Además la alta tasa de mutación del ADNmt permite estudiar las diferencias genéticas acumuladas entre dos poblaciones en periodos de tiempo muy cortos. Estos estudios del ADNmt se han llevado a cabo, bien mediante la secuenciación directa de la región control del ADNmt (Vigilant *et al.*, 1991; Bertranpetit *et al.*, 1995; Richards *et al.*, 1996) o

mediante digestión enzimática (análisis de RFLPs) de la totalidad del genoma mitocondrial (Cann *et al.*, 1987; Torroni *et al.*, 1996, 1998).

Los resultados obtenidos apoyan la hipótesis de un antecesor común reciente del hombre moderno en África (Cann *et al.*, 1987; Pult *et al.*, 1994; Bertranpetit *et al.*, 1995; Richards *et al.*, 1996). Sin embargo, al contrario de las hipótesis planteadas en base a los datos de marcadores clásicos (Cavalli-Sforza y Edwards, 1967; Ammerman y Cavalli-Sforza, 1984; Cavalli-Sforza *et al.*, 1994), los resultados del ADNmt sugieren un antecesor de todas las secuencias de Europa occidental durante el Paleolítico Superior (Richards *et al.*, 1996; Torroni *et al.*, 1996; Bertranpetit *et al.*, 1996). Algunos van más allá sugiriendo que tan sólo una pequeña proporción de la variabilidad de los linajes actuales del ADNmt es debida a las migraciones de los grupos de agricultores del Neolítico (Richards *et al.*, 1996, 1998).

Las críticas planteadas a estos trabajos han sido numerosas y desde diferentes puntos de vista. Por un lado existe un considerable debate en torno al ruido generado por las tasas de mutación, flujo génico diferencial entre hombres y mujeres (Cavalli-Sforza y Minch, 1997) y la estima de las tasas de divergencia (Howell *et al.*, 1996; Pääbo, 1996; Macaulay *et al.*, 1997; Howell y Mackey, 1997). Por otro lado, este marcador representa un único locus, por lo que los datos de los loci autosómicos son necesarios para obtener una imagen más clara de la historia evolutiva del hombre moderno (Tavaré *et al.*, 1997). Hasta el momento, la historia evolutiva pasada era inferida a partir del análisis de la variabilidad genética detectada en las poblaciones actuales. Los avances metodológicos en la tecnología del ADN han hecho posible estudiar directamente la variabilidad genética de los grupos humanos prehistóricos, lo que permite un acercamiento más verosímil a la historia evolutiva de las poblaciones.

Sin embargo, el análisis del ADN de restos prehistóricos presenta una serie de limitaciones debido principalmente a la mala preservación del ADN en tejido esquelético. El ADN antiguo (ADNa) se encuentra fragmentado en unos 200 pares de bases (pb) de longitud aproximadamente, lo cual obliga a analizar fragmentos de ADN inferiores a este tamaño. Además, la cantidad de ADN recuperado es muy baja, lo que dificulta el análisis de ADN nuclear. Y por otro lado, las bases de los nucleótidos del ADNa se encuentran modificadas, lo que puede provocar la obtención de resultados ambiguos. Sin embargo, el alto número de copias de genomas mitocondriales por célula, facilita su supervivencia y recuperación. Teniendo en cuenta dichas limitaciones y el número de datos comparativos en poblaciones actuales, en este trabajo se ha analizado la variabilidad del ADNmt mediante la técnica de los RFLPs en 4 colecciones esqueléticas de procedencia arqueológica que abarcan una amplia región del País Vasco. El objetivo planteado es doble: por un lado establecer las relaciones genéticas de los grupos humanos ya extintos (hasta ahora basada en los datos morfométricos de los restos esqueléticos recuperados) y por otro, la valoración de las hipótesis planteadas en base al análisis de la variabilidad genética de las poblaciones actuales (Richards *et al.*, 1996, 1998; Torroni *et al.*, 1998).

### **Material y métodos**

En este trabajo se ha analizado mediante la técnica de RFLPs el ADN recuperado en restos dentarios correspondientes a 121 individuos exhumados en 4 yacimientos prehistóricos del País Vasco, cuya cronología abarca el periodo comprendido entre el Neolítico y la Edad del Bronce. El yacimiento de *San Juan ante Portam Latinam* (SJAPL) situado en el área del Alto valle del Ebro, con una antigüedad de  $5.070 \pm 150 - 5.020 \pm 140$  BP ( $^{14}\text{C}$ ) (Etxeberria y Vegas, 1988), ha proporcionado un número mínimo de 289 individuos, según el temporal derecho del cráneo (de la Rúa *et al.*, 1995). Se trata de un enterramiento en un abrigo natural de arenisca de aproximadamente  $20 \text{ m}^2$  de superficie y un volumen de  $36 \text{ m}^3$  (Vegas, 1992). Consiste en una

estructura singular, en una zona donde abundan los dólmenes y con una total ausencia de cerámica y fauna, lo que no es frecuente entre los ajuares funerarios de esa época (Etxeberria y Vegas, 1988). La cueva de *Pico Ramos* (Muskiz, Bizkaia) se encuentra situada en la vertiente Atlántica del País Vasco. Se trata de una cueva sepulcral, con una cronología perteneciente al periodo Calcolítico ( $4.100 \pm 110$ - $4.790 \pm 110$  BP) y un ajuar típicamente calcolítico (Zapata, 1995). Se han recuperado un número mínimo de 104 individuos en base a la pieza dentaria más abundante (canino mandibular izquierdo) (Baraybar y de la Rúa, 1997). La mala conservación y fragmentación del material esquelético hallado, dificultó su análisis morfométrico. La cueva de *Urratxa III* (Orozko, Bizkaia), situada también en la vertiente Atlántica, presenta tres periodos de ocupación: Aziliense, Epipaleolítico y Edad del Bronce. Los restos analizados en el presente trabajo corresponden al último periodo de ocupación (finales del Bronce antiguo), presentando unas dataciones radiométricas en dos muestras esqueléticas de  $3.405 \pm 70$  y  $3.475 \pm 80$  BP (de la Rúa *et al.* 1997; Muñoz y Berganza, 1997). En esta muestra está representado un número mínimo de 7 individuos en base al primer premolar mandibular izquierdo, correspondiendo 5 de ellos a individuos adultos y dos son gérmenes dentarios en formación. A pesar del pequeño tamaño muestral recuperado en este yacimiento, resulta interesante su inclusión en este trabajo, ya que se encuentra ubicado en las estribaciones del Gorbeia, una zona de mayor aislamiento, que el valle del Ebro, donde se encuentran localizados los yacimientos de SJAPL (Araba) y Longar (Nafarroa). El hipogeo de *Longar* se encuentra en Nafarroa, cerca del límite con la provincia de Araba. Este yacimiento presenta unas características arqueológicas diferentes a las estructuras más o menos contemporáneas cercanas, los dólmenes de la Rioja Alavesa. Otro hecho destacable es la ausencia de elementos de adorno personal (cuentas de collar, colgantes) (Armendariz y Irigarai, 1995). La datación de muestras óseas humanas mediante  $^{14}\text{C}$ , indica una antigüedad media de  $4.445 \pm 70$ - $4.580 \pm 90$  BP, es decir un Neolítico final-Calcolítico antiguo (Armendariz y Irigarai, 1995). Se ha recuperado un número mínimo de 69 individuos en base a la pieza dentaria más abundante (primer molar superior izquierdo). De todo el material recuperado (número mínimo de individuos=469, Tabla 1), se han escogido para su análisis genético, aquellas piezas dentarias intactas que no presentaban caries ni fisuras, a pesar de que ello ha supuesto una reducción importante del tamaño muestral.

#### Extracción de ADN

A fin de eliminar la contaminación superficial, las piezas dentarias se han sometido a un proceso de depurinización mediante ácidos, e irradiación con luz UV por toda su superficie (Ginther *et al.*, 1992). Tras cortar la raíz del diente, ésta se ha incubado toda

la noche a  $37^\circ\text{C}$ , con agitación, en un volumen suficiente como para cubrir toda la raíz (5 ml) en tampón de lisis (0,5 M EDTA pH 8,0-8,5; 0,5% SDS; 50 mM Tris-HCl pH 8,0 y 0,01 mg/ml Proteinasa K), procediéndose seguidamente a una extracción con fenol-cloroformo y cloroformo. El extracto de ADN se purifica y concentra hasta 300  $\mu\text{l}$  en un Centricon-30 (Amicon). Estos extractos de ADN se utilizan en la amplificación y tipaje de 7 marcadores necesarios para definir los 9 haplogrupos descritos en caucasoides por Torroni *et al.* (1996). En Izagirre *et al.* (1998) se muestra el patrón de ausencia/presencia de corte que presenta cada haplogrupo para estos 7 marcadores analizados.

**Tabla 1.** Yacimientos prehistóricos analizados<sup>1</sup>

Yacimiento	NMI	n	Tipo de diente
SJAPL (Araba)	289	63	C superior dcho.
Pico Ramos (Bizkaia)	104	24	C inferior izdo.
Urratxa III (Bizkaia)	7	5	P1 inferior izdo
Longar (Nafarroa)	69	29	M1 superior izdo
TOTAL	469	121	

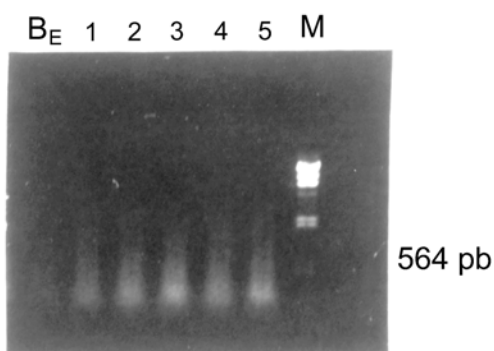
<sup>1</sup>Se indica: Número Mínimo de individuos (NMI), tamaño de la muestra analizada (n) y tipo de diente analizado en cada yacimiento.

### Tipaje del ADNmt

En el trabajo de Izagirre y de la Rúa (1999) se describe la secuencia y temperatura de anillamiento de los 7 pares de primers diseñados para amplificar mediante PCR los fragmentos específicos de ADN mitocondrial (ADNmt), que contienen los marcadores característicos de los haplogrupos caucosoides así como las condiciones de amplificación. La fase de extracción y amplificación de las muestras se realiza en un laboratorio independiente, libre de ADN moderno. Durante esta fase se han llevado a cabo sendos controles que permitieran poner de manifiesto posibles contaminaciones ocurridas durante la manipulación de las muestras en el laboratorio. En la primera fase, un *Blanco de Extracción* (BE), consistente en una muestra que se somete a todo el proceso de extracción, pero a la que no se le ha añadido tejido. Y en la segunda fase, un *Control Negativo de la Amplificación* [control (-)], a la que no se le ha añadido ADN. Tras comprobar mediante migración electroforética en geles verticales de poliacrilamida al 12% y tinción con plata, que el blanco de la extracción y el control negativo de la amplificación no han presentado producto, las muestras se digieren con sus correspondientes enzimas de restricción, siguiendo las instrucciones del proveedor. La presencia/ausencia de digestión se verifica mediante migración electroforética de geles de poliacrilamida (12%) y tinción con plata.

### Análisis estadístico

El análisis comparativo de las muestras se ha realizado mediante la medida de distancia de la cuerda de Cavalli-Sforza (Cavalli-Sforza y Edwards, 1967), utilizando el programa informático Phylip "Phylogenetic Inference Package" (Felsenstein, 1989). La comparación entre las poblaciones se ha realizado mediante el test exacto de diferenciación poblacional del paquete estadístico Genepop (Raymond y Rousset, 1995).



**Figura 1.** Análisis electroforético de los extractos de ADN obtenidos de tejido dentario (carriles 1 al 5). M: marcador de tamaño molecular I *Hind* III). BE: blanco de la extracción. Gel de agarosa al 0.7% y tinción con BrEt.

### Resultados y discusión

#### *Consideraciones sobre la amplificación y tipaje del ADN antiguo*

En este trabajo, la extracción del ADN se ha llevado a cabo a partir de piezas dentarias, ya que se ha comprobado que el ADN procedente de dientes es más apropiado que el del hueso para la amplificación. En este tipo de material, el ADN obtenido corresponde mayoritariamente al tejido dentario, siendo

despreciable el ADN procedente de otras especies (Thuesen y Engberg, 1990; Zierdt *et al.*, 1996; Izagirre *et al.*, 1998). El análisis electroforético de los extractos de ADN en geles de agarosa (Figura 1), indica que el tamaño del ADN recuperado es menor de 500 pb de longitud. A pesar de que en los geles no siempre ha sido posible detectar el ADN recuperado, una vez realizada la amplificación, incluso en esas muestras era posible obtener producto amplificado.

Tan sólo se han analizado aquellas muestras que presentaban todos los controles, blanco de la extracción y control negativo de la amplificación, negativos (ausencia de ADN contaminante detectable). De este modo, se han podido tipar con éxito el 97% de las muestras. Aunque,

esta cifra pueda resultar elevada, hay que destacar que tan sólo se han analizado el 25% de los individuos recuperados (121 individuos de un total de 469, Tabla 1). Se ha realizado una selección de aquellas piezas dentarias intactas, que no presentaban caries ni fisuras, para evitar que algún tipo de ADN contaminante pasara al interior de la pulpa dental.

Uno de los inconvenientes surgidos durante el tipaje de las muestras antiguas, ha sido la obtención de secuencias ambiguas. Durante la amplificación, la *Taq* polimerasa introduce errores en aquellas posiciones nucleotídicas que presentan sus bases modificadas. Si estos errores han ocurrido durante los primeros ciclos de la PCR, o si la amplificación comienza a partir de pocas copias de ADN molde, dichos errores se pueden detectar en el producto final (Handt *et al.*, 1994, 1996; Krings *et al.*, 1997). Pääbo (1989) estimó que una de cada 20 bases se encuentra modificada; cuando estas modificaciones coinciden con la secuencia diana del enzima de restricción, se habrá perdido el lugar de corte, dando como resultado digestiones parciales. Puesto que a causa de estos errores, es muy improbable que aparezca el lugar de corte del enzima, las digestiones parciales se han considerado como digestiones positivas. Por ello, se han diseñado unos primers que permitan amplificar fragmentos inferiores a 120 pb de longitud y que se cumplieran las siguientes condiciones: 1) el tamaño de los fragmentos de restricción resultante fuera claramente diferenciado de los dímeros de primers y 2) que el tamaño fuera lo suficientemente grande como para dar señal tras la tinción con plata y no escapar del gel durante la migración electroforética.

#### Diversidad mitocondrial en los grupos humanos prehistóricos del País Vasco

En la Figura 2 y Tabla 2 se describe la distribución de los haplogrupos característicos de caucasoides, hallada en 3 de los yacimientos prehistóricos estudiados en este trabajo. El yacimiento de Urratxa (Bizkaia), debido al escaso tamaño muestral (n=5), no se ha incluido en las comparaciones efectuadas.

La distribución de los haplogrupos H, K y U es similar en los tres yacimientos prehistóricos analizados (SJAPL, Longar y Pico Ramos) ( $\chi^2=0,0831$ ,  $P>0,05$ ;  $\chi^2=0,4325$ ,  $P>0,05$ ; respectivamente para 0,05

**Tabla 2.** Frecuencia de los haplogrupos de ADNmt hallados en los yacimientos prehistóricos analizados<sup>1</sup>

Haplo-grupo	SJAPL	Longar	Pico Ramos
	frec. ± se	frec. ± se	frec. ± se
H	0.377 ± 0.060	0.408 ± 0.094	0.374 ± 0.091
J	0.164 ± 0.047	-	0.167 ± 0.070
K	0.230 ± 0.054	0.222 ± 0.080	0.167 ± 0.070
U	0.180 ± 0.049	0.148 ± 0.068	0.125 ± 0.062
T, X	0.049 ± 0.027	0.148 ± 0.070	0.167 ± 0.070
W	-	-	-
I	-	-	-
V	-	-	-
Otros	-	0.074 ± 0.050	-

<sup>1</sup>frec.: frecuencia de cada haplogrupo; se: desviación estándar de la frecuencia. SJAPL (Laguardia, Araba); Longar (Viana, Nafarroa) y Pico Ramos (Muskiz, Bizkaia).

respectivamente para 0,05 y 0,05. Para 0,05 uno de los haplogrupos, considerando las tres poblaciones conjuntamente), presentando el haplogrupo H la frecuencia más alta en todos los enclaves. Asimismo, es de destacar que en ninguno de los yacimientos prehistóricos se han encontrado los haplogrupos I, W y V. Respecto al haplogrupo J, en el yacimiento de Longar (Nafarroa) no se ha tipado ningún individuo perteneciente a este haplogrupo; sin embargo, Pico Ramos (Bizkaia) y SJAPL (Araba) muestran una distribución similar del mismo (~16%). El yacimiento de SJAPL (Araba), presenta una frecuencia del haplogrupo [T, X] significativamente menor (5%) ( $\chi^2=3,68$ ,  $0,1<P<0,05$ ) que la descrita en los yacimientos de Pico Ramos (Bizkaia) y Longar (Nafarroa) (16,7% y 14,8%, respectivamente). En Longar, además se han encontrado individuos cuyo haplotipo no entra en ninguna de las clasificaciones descritas anteriormente, clasificándose como pertenecientes al haplogrupo "otros".

En la Tabla 3 se muestran los valores del test exacto de diferenciación poblacional realizado entre estas tres muestras prehistóricas y con una serie de poblaciones europeas actuales. La

**Tabla 3.** Test exacto de diferenciación poblacional, calculado mediante la aplicación GENEPOP (versión 1.2) (Raymond y Rousset, 1995)<sup>1</sup>

Poblaciones	P ± s.e.
<b>Prehistóricas</b>	
SJAPL-PR	0.51654 ± 0.00648
SJAPL-Long	0.03409 ± 0.00240 *
PR-Long	0.28702 ± 0.00566
<b>Prehistóricas-actuales</b>	
SJAPL-FIN	0.01748 ± 0.00219 *
SJAPL-SUE	0.01302 ± 0.00120 *
SJAPL-TOSC	0.01434 ± 0.00188 *
SJAPL-VasAct	0.00000 ± 0.00000 *
PR-FIN	0.66369 ± 0.00786
PR-SUE	0.48235 ± 0.00657
PR-TOSC	0.88951 ± 0.00342
PR-VasAct	0.00453 ± 0.00075 *
LONG-FIN	0.09895 ± 0.00461
LONG-SUE	0.52902 ± 0.00732
LONG-TOSC	0.10751 ± 0.00451
LONG-VasAct	0.00809 ± 0.00129 *
FIN-SUE	0.21471 ± 0.00705
FIN-TOSC	0.82653 ± 0.00447
FIN-VasAct	0.00025 ± 0.00013 *
SUE-TOSC	0.22022 ± 0.00743
SUE-VasAct	0.02588 ± 0.00219 *
TOSC-VasAct	0.00006 ± 0.00006 *

<sup>1</sup>SJAPL, *San Juan Ante Portam Latinam (Laguardia, Araba)*; PR, *Pico Ramos (Muskiz, Bizkaia)*; LONG, *Longar (Viana, Nafarroa)*; FIN, *Finlandeses (Finlandia) (Torroni et al., 1996)*; TOSC, *Toscanos (Italia) (Torroni et al., 1996)*; SUE, *Suecos (Suecia) (Torroni, comunicación personal)*.

\* Diferencias estadísticamente significativas  $P < 0.05$

al hecho de estar sometidos a una presión selectiva semejante, ya que en estos caracteres craneales existe un componente ambiental que es difícil de valorar. La existencia de datos genéticos y craneales de un mayor número de yacimientos prehistóricos podría ayudar a resolver esta cuestión.

#### Comparación con muestras actuales

A la hora de comparar los datos obtenidos en este trabajo con los publicados en muestras modernas, se ha podido disponer de la distribución de todos los haplogrupos en muestras de vascos actuales (n=50) (pertenecientes a la provincia de Gipuzkoa), toscanos (n=48), finlandeses (n=49) y suecos (n=37) (Torroni *et al.*, 1996). Además, también se ha podido realizar la comparación con los datos disponibles acerca de la distribución de algunos de los haplogrupos con otras dos muestras vascas: una compuesta por 61 individuos muestreados en las provincias

población prehistórica de SJAPL (Araba), presenta diferencias significativas con la de Longar (Nafarroa) ( $p > 0,05$ ), pero no con la de Pico Ramos (Bizkaia). Asimismo, cuando se calcula la distancia de la cuerda de Cavalli-Sforza, las muestras de Pico Ramos (Bizkaia) y SJAPL (Araba) muestran los valores de distancia más pequeños, presentando Longar (Nafarroa) mayores distancias con cada una de ellas (Tabla 4). La diferenciación estadística entre las poblaciones de Longar (Nafarroa) y SJAPL (Araba) se puede explicar por la ausencia del haplogrupo J y una frecuencia más alta del haplogrupo conjunto [T, X] en Longar.

Desde el punto de vista arqueológico, el hipogeo de Longar presenta unas características diferenciadas de otras estructuras funerarias cercanas más o menos contemporáneas como son los dólmenes de la Rioja Alavesa. La estructura de enterramiento del hipogeo de Longar sólo se ha descrito en el sur de la Península Ibérica y en la cuenca de París (Armendariz y Irigarai, 1995). Sin embargo, los restos culturales hallados en Longar no se diferencian de los descritos en otros yacimientos del Alto Ebro. Por otro lado, el análisis de caracteres no-métricos del cráneo (Iñarra, 1996) indica semejanzas entre SJAPL (Araba) y Longar (Nafarroa) (en Pico Ramos se carece de estos datos). Sin embargo, no es posible decir si ello se debe a un flujo génico entre ambos grupos poblacionales o

de Bizkaia y Araba (Côrte-Real *et al.*, 1996) y otra de 45 individuos guipuzcoanos (Bertranpetit *et al.*, 1995).

**Tabla 4.** Matriz de distancias basada en la medida de la cuerda de Cavalli-Sforza & Edwards (1967)

	SJAPL	PR	Longar	Toscanos	Finland	Suecos
PR	0.0095					
Longar	0.0664	0.0600				
Toscanos	0.0462	0.0249	0.0669			
Finlandeses	0.0586	0.0484	0.0813	0.0255		
Suecos	0.0470	0.0294	0.0362	0.0495	0.0450	
VasAct	0.0991	0.0914	0.1046	0.1077	0.0578	0.0349

<sup>1</sup>SJAPL (Araba); PR, Pico Ramos (Bizkaia); Longar (Nafarroa).

Sin embargo, en estos dos últimos trabajos, los haplogrupos no se han determinado mediante el análisis de RFLPs, sino a partir de la correlación establecida por Torroni *et al.* (1996) entre la secuencia nucleotídica de la región control del ADNmt y los datos de RFLPs. La comparación de las muestras modernas (toscanos, finlandeses, suecos y vascos actuales) y las poblaciones prehistóricas (Tabla 3), indica que las únicas poblaciones que presentan diferencias significativas son: la población prehistórica de SJAPL con todas las muestras comparadas - excepto con la prehistórica de Pico Ramos- y la muestra de vascos actuales con todas las demás. Las diferencias que presenta la muestra de vascos actuales con todas las poblaciones comparadas, se puede explicar en razón de las frecuencias relativamente bajas de los haplogrupos J y K, y de la elevada frecuencia que presenta el haplogrupo V (20%), superior a la de cualquier otra población europea. Todo ello, seguramente, diferencia a la muestra de vascos actuales del resto de poblaciones comparadas.

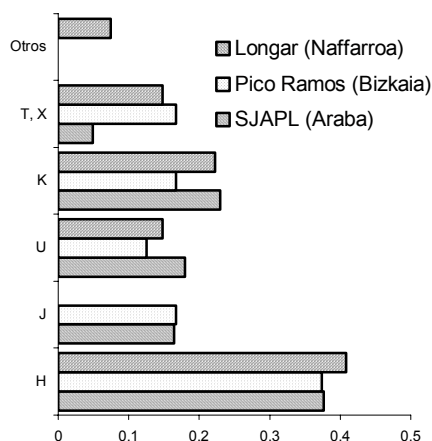
En los trabajos realizados con datos de secuencias del ADNmt, se ha observado una gran homogeneidad en los grupos europeos (Sajantila *et al.*, 1996; Pult *et al.*, 1994; Bertranpetit *et al.*, 1995). Los datos de RFLPs del ADNmt de las escasas muestras actuales publicadas hasta la fecha indican también una relativa homogeneidad entre estas poblaciones, no observándose diferencias significativas entre ellas (Tabla 3). La clasificación de la variabilidad del ADNmt en haplogrupos, permite analizar en mayor detalle el origen y distribución de cada uno de ellos. Así, Richards *et al.* (1998), han propuesto que la mayoría de los linajes del ADNmt (85%) tienen su origen en el Paleolítico Superior europeo y que sólo una pequeña proporción (15%) llegaron a Europa desde Próximo Oriente durante el neolítico.

Concretamente, el haplogrupo J, se habría introducido en Europa desde Próximo Oriente hace unos 10.000 años, siguiendo la expansión del neolítico (Richards *et al.*, 1996, 1998). Este haplogrupo presenta en toda Europa una frecuencia superior al 11%. Sin embargo, en aquellas poblaciones en las que parece que el mestizaje con los agricultores neolíticos fue menor, como en el caso de los vascos (Cavalli-Sforza *et al.*, 1994), cabría esperar, que la frecuencia de este haplogrupo fuera más baja. La muestra de vascos actuales presenta una frecuencia del 2% para este haplogrupo (Torroni *et al.*, 1996). Sin embargo, en dos de los yacimientos prehistóricos (SJAPL y Pico Ramos) se ha encontrado una frecuencia relativamente alta de este haplogrupo (16%, Figura 2), mientras que en el yacimiento de Longar no se ha detectado.

Estos datos sobre el haplogrupo J suponen que tanto los pobladores de Pico Ramos (en la vertiente atlántica del País Vasco) como los de SJAPL (en la vertiente mediterránea), tuvieron contacto con los grupos neolíticos portadores de la mutación que define este haplogrupo. Nue-

vamente, el yacimiento de Longar presenta un comportamiento diferencial respecto a los otros dos enclaves.

Asimismo, el origen y distribución del haplogrupo V tampoco guarda relación con la expansión del hombre anatómicamente moderno en Europa. Torroni *et al.* (1998) han propuesto que este haplogrupo probablemente se originó en alguna población del sudoeste Europeo (norte de la Península Ibérica o sudoeste de Francia) hace ~10.000-15.000 años, desde donde migraría hacia Europa del norte y central durante el Último Glacial. Sin embargo, ninguna de las muestras prehistóricas analizadas se ha clasificado como perteneciente al haplogrupo V. Izagirre y de la Rúa (1999), analizando un conjunto de datos (ausencia del haplogrupo V en las muestras prehistóricas, debate acerca de las tasas de mutación, posible heterogeneidad poblacional en vascos y datos arqueológicos) consideran que la mutación que define al haplogrupo V habría aumentado considerablemente por efecto de la deriva genética y este proceso microevolutivo sería asimismo, responsable de la heterogeneidad observada para el haplogrupo V entre las diferentes muestras de vascos (entre 0-20%). Aunque, ésto es compatible con la datación atribuida al origen de la mutación, no es necesario recurrir a modelos de migración/difusión para explicar la distribución del haplogrupo V en las poblaciones indo-europeas.



**Figura 2.** Distribución de la frecuencia de haplogrupos en las poblaciones prehistóricas de SJAPL (Araba), Pico Ramos (Bizkaia) y Longar (Nafarroa).

En conclusión la caracterización de polimorfismos puntuales mediante análisis de RFLPs resulta un método eficaz y factible para la realización de estudios poblacionales en muestras arqueológicas. Sin embargo, el análisis de las secuencias permitiría valorar con mayor precisión las hipótesis establecidas en base a los datos de las poblaciones actuales (Richards *et al.*, 1998; Torroni *et al.*, 1998). Los datos obtenidos en el presente trabajo no señalan una influencia diferencial de los movimientos poblacionales del Neolítico dentro del País Vasco, ya que el haplogrupo J se encuentra igualmente representado en el yacimiento de Pico Ramos (región Cantábrica) y en el de SJAPL (Alto valle del Ebro).

El yacimiento de Longar presenta peculiaridades genéticas (ausencia del haplogrupo J y presencia de "otros" haplogrupos) y asimismo arqueológicas. Los datos del haplogrupo V obtenidos en las muestras prehistóricas del País Vasco analizadas en este trabajo, han sugerido un nuevo enfoque interpretativo para los datos proporcionados por las poblaciones actuales, en base a los cuales Torroni *et al.* (1998) propusieron una hipótesis sobre el origen y expansión del haplogrupo V en Europa. Estos resultados, debatidos con mayor detalle en Izagirre y de la Rúa (1999), indican la importancia de disponer de datos genéticos de las poblaciones antiguas, que cuestionan algunos de los supuestos asumidos en la interpretación de la historia evolutiva de Europa. En este contexto, el flujo génico diferencial entre hombres y mujeres y las estimas de las tasas de mutación resultan dos de las cuestiones más sugerentes a debatir en el futuro. Por otro lado, cuando se dispongan de datos genéticos en un mayor número de poblaciones prehistóricas, se podrán plantear hipótesis interpretativas más concluyentes sobre las relaciones genéticas existentes entre los grupos humanos en el pasado.

### Agradecimientos

Este trabajo se ha realizado gracias a las ayudas concedidas al proyecto titulado: "Aportación de la biología molecular al estudio de la evolución biológica de la población del País Vasco" por la Diputación Foral de Vizcaya, Diputación Foral de Álava, Fundación Caja Vital y BBK, así como por el proyecto GN 154.310-0001-94 (Gobierno de Navarra y U.P.V./E.H.U.) y UPV 154.310-EA008/98 (U.P.V./E.H.U.).

### Bibliografía

- AMMERMANN A.J. & CAVALLI-SFORZA L.L. (1984). *The Neolithic Transition and the Genetics of Populations in Europe*. Princeton University Press, Princeton, NJ
- ARMENDÁRIZ J. & IRIGARAI S. (1995). *La arquitectura de la muerte: el hipogeo de Longar (Viana, Navarra), un sepulcro colectivo de 2.500 A.C.* Centro de Estudios Tierra-Estella, Lizarraldeko Ikastetxea.
- BARAYBAR J.P., DE LA RÚA C. (1997). Reconstruction of diet with trace elements of bone at the Chalcolithic site of Pico Ramos, Basque Country, Spain. *J. Archaeol. Sci.*, 24: 355-364
- BERTRANPETIT J., SALA J., CALAFELL F., UNDERHILL P.A., MORAL P., COMAS D. (1995). Human mitochondrial DNA variation and the origin of the Basques. *Ann. Hum. Genet.*, 59: 63-81
- BERTRANPETIT J., CALAFELL F., COMAS D., PÉREZ-LEZAUN A., MATEU E. (1996). Mitochondrial DNA sequences in Europe: an insight into population history. In Boyce A.J. & Mascie-Taylor C.G.N. (eds), *Molecular Biology and Human Diversity*. Society for the study of human biology, Symposium, 38: 112-129
- CANN R.L.; STONEKING M.; WILSON A.C. (1987) Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature*, 325: 31-36
- CAVALLI-SFORZA L.L. & EDWARDS A.W.F. (1967) Phylogenetic analysis -models and estimation procedure. *Am. J. Hum. Genet.*, 19:233-257
- CAVALLI-SFORZA L.L., MENOZZI P., PIAZZA A. (1994). *The history and geography of human genes*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey
- CAVALLI-SFORZA L.L. & MINCH E. (1997). Paleolithic and neolithic lineages in the European mitochondrial gene pool. *Am. J. Hum. Genet.*, 61: 247-251
- CÔRTE-REAL H.B.S.M., MACAULAY V.A., RICHARDS M.B., HARITI G., ISSAC M.S., CAMBONTHOMSEN A., PAPIHA S. et al. (1996). Genetic diversity in the Iberian Peninsula determined from mitochondrial sequence analysis. *Ann. Hum. Genet.*, 60: 331-350
- DE LA RUA C., BARAYBAR J.P., CUENDE M., MANZANO C. (1995). La sepultura colectiva de san Juan ante Portam Latinam (Laguardia, Alava): contribución de la antropología a la interpretación del ritual funerario. *Rubricatum (I Congreso del neolítico de la Península Ibérica)*, 1: 585-589
- DE LA RÚA C., CUENDE M., DURAN L.M., IZAGIRRE N. (1997). Estudio antropológico de los restos humanos del yacimiento de Urratxa III (Orozko, Bizkaia). In MUÑOZ SALVATIERRA M. & BERGANZA E. (Eds), *El yacimiento de la Cueva de Urratxa III (Orozko, Bizkaia)*. Universidad de Deusto, Bilbao, p. 207-241
- ETXBERRIA F. & VEGAS J.I. (1988). ¿Agresividad social o guerra? durante el Neo-eneolítico en la cuenca media del valle del Ebro, a propósito de San Juan ante Portam Latinam (Rioja Alavesa). *Munibe (Antropol-Arkeo)*, 6: 105-112
- FELSENSTEIN J. (1989) PHYLIP -Phylogenetic Inference package (Version 2.3). *Cladistic*, 5: 164-166
- GINTHER C, ISSEL-TARVER L, KING MC. (1992) Identifying individuals by sequencing mitochondrial DNA from teeth. *Nature Genetics*, 2: 135-138
- HANDT O., HÖSS M., KRINGS M., PÄÄBO S. (1994). Ancient DNA: methodological challenges. *Experientia*, 50: 524-529
- HANDT O., KRINGS M., WARD R.H., PÄÄBO S. (1996). The retrieval of ancient human DNA sequences. *Am. J. Hum. Genet.*, 59: 368-376
- HOWELL N, KUBACKA I, MACKEY DA. (1996) How rapidly does the human mitochondrial genome evolve? *Am. J. Hum. Genet.*, 59: 501-509
- HOWELL N AND MACKEY DA (1997) Reply to Macauley et al. *Am. J. Hum. Genet.*, 61: 986-990
- IÑARRA M.L. (1996). *Estudio de rasgos no-métricos del cráneo en poblaciones del País Vasco*. Memoria de Licenciatura. Universidad del País Vasco.
- IZAGIRRE N., DURÁN L.M., DE LA RÚA C. (1998). Genética y arqueología: análisis molecular de ADN procedente de restos esqueléticos. *Munibe (Antropol-Arkeol)*, 50: 3-14
- IZAGIRRE N. & DE LA RÚA C. (1999). An mtDNA analysis in ancient Basque populations: implications for haplogroup V as a marker for a major Paleolithic expansion from southwestern Europe. *Am. J. Hum. Genet.* (en prensa)
- KRINGS M., STONE A., SCHMITZ R.W., KRAINITZ H., STONEKING M., PÄÄBO S. (1997). Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell*, 90: 19-30

- MACAULAY V.A.; RICHARDS M.B.; FORSTER P.; BENDALL K.E.; WATSON E.; SYKES B.; BANDLEY H.-J. (1997). mtDNA mutation rates -no need to panic. *Am. J. Hum. Genet.*, 61: 983-986.
- MUÑOZ M. & BERGANZA E. (1997) *El yacimiento de la Cueva de Urratxa III (Orozko, Bizkaia)*. Cuadernos de Arqueología, 16. Universidad de Deusto, Bilbao.
- PÄÄBO S. (1989). Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning and enzymatic amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86 1939-1943
- PÄÄBO S. (1996). Mutational hot spots in the mitochondrial microcosm. *Am. J. Hum. Genet.*, 59: 493-496
- PULT I., SAJANTILA J., SIMANAINAN O., GEORGIEV W., SCHAFFNER W., PÄÄBO S. (1994). Mitochondrial DNA sequences from Switzerland reveal striking homogeneity of European populations. *Biol. Chem Hoppe-Seyler*, 375: 837-840
- RAYMOND M. & ROUSSET F. (1995) An exact test for population differentiation. *Evolution*, 49: 1280-1283
- RICHARDS M., CÔRTE-REAL H., FORSTER P., MACAULAY V., WILKINSON-HERBOTS H., DEMAINE A., PAPIHA S., HEDGES R., BANDELDT H.-J., SYKES B. (1996). Paleolithic and Neolithic lineages in the European mitochondrial gene pool. *Am. J. Hum. Genet.*, 59: 185-203
- RICHARDS M.B.; MACAULAY V.A.; BANDELDT H.-J.; SYKES B. (1998) Phylogeography of mitochondrial DNA in western Europe. *Ann. Hum. Genet.*, 62: 241-260
- SAJANTILA A., SALEM A.-H., 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. USA*, 93: 12035-12039
- TAVARÉ S.; BALDING D.J.; GRIFFITHS R.C.; DONNELLY P. (1997). Inferring coalescence times from DNA sequence data. *Genetics*, 145: 505-518.
- THUESEN I. & ENGBERG J. (1990). Recovery and analysis of human genetic material from mummified tissue and bone. *J. Archaeo. Sci.*, 17: 679-689
- TORRONI A., HUOPONEN K., FRANCALACCI P., PETROZZI M., MORELLI L., SCOZZARI R., OBINU D., SAVONTAUS M.-L., WALLACE D.C. (1996). Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations. *Genetics*, 144: 1835-1850
- TORRONI A., BANDELDT H.-J., D'URBANO L., LAHERMO P., MORAL P., SELBITTO D., RENGO C., FORSTER P., SAVONTAUS M.-L., BONNE-TAMIR B., SCOZZARI R. (1998). MtDNA analysis reveals a major late Palaeolithic population expansion from southwestern to northeastern Europe. *Am. J. Hum. Genet.*, 62:1137-1152
- VEGAS J.I. (1992). El enterramiento de San Juan ante Portam Latinam: las más numerosas señales de violencia de la prehistoria peninsular. *Kultura*. (Ciencias, Historia, Pensamiento) Nº 5: 9-20.
- VIGILANT L.; STONEKING M.; HARPENDING H.; HAWKES K.; WILSON A.C. (1991) African populations and the evolution of human mitochondrial DNA. *Science*, 253: 1503-1507
- ZAPATA L (1995) La excavación del depósito sepulcral calcolítico de la cueva Pico Ramos (Muskiz, Bizkaia). La industria ósea y los elementos de adorno. *Munibe (Antropol.-Arqueol.)* 47: 35-90.
- ZIERDT H., HUMMEL S., HERRMANN B. (1996). Amplification of human short tandem repeats from medieval teeth and bone samples. *Hum. Biol.*, 68 (2): 185-199

### Abstract

To contribute to the understanding of the biological relationships among past human groups in the Basque Country, mtDNA variation has been studied by RFLP analysis in samples recovered from 3 prehistoric sites of the Basque Country (SJAPL, Pico Ramos y Longar), dated between the Neolithic and the Bronze Age. The genetic analysis of archaeological remains has been proved to be an effective and feasible methodology to analyse the biological relationships between past human groups. This analysis contributes a new interpretative focus to the genetic data provided by modern populations. Thus, the results obtained so far show that the population of Longar is genetically peculiar, due mainly to the absence of haplogroup J. Additionally, the high frequency of haplogroup J observed in Pico Ramos and SJAPL (located in the Cantabrian fringe and in the Upper Ebro valley respectively) allows us to suggest that there has not been a differential influence of the Neolithic into the Basque Country.

### Anthropological study of mtDNA on past human populations

*Key words:* ancient DNA, mitochondrial DNA haplogroups, population genetics, Neolithic expansion