

MUNIBE (Antropología-Arkeologia) 57	Homenaje a Jesús Altuna	327-335	SAN SEBASTIAN	2005	ISSN 1132-2217
-------------------------------------	-------------------------	---------	---------------	------	----------------

Descifrando los mensajes del pasado: análisis del ADN antiguo

Unravelling messages from the past: analysis of aDNA

PALABRAS CLAVE: ADN antiguo, restos humanos, ADN mitocondrial.

KEY WORDS: Ancient DNA, human remains, mitochondrial DNA.

Neskuts IZAGIRRE*
Santos ALONSO*
Concepción DE LA RÚA*

RESUMEN

El análisis de ADN antiguo (ADNa) nos permite estudiar directamente la composición genética de las poblaciones del pasado. Sin embargo, pronto se hicieron patentes las limitaciones metodológicas derivadas del mal estado de preservación del ADNa, así como del enorme riesgo de contaminación con ADN humano moderno. Ello, condujo a la elaboración de una serie de *Criterios de Autenticación* que deben cumplir todos los trabajos del campo del ADNa para su publicación. Actualmente, los trabajos publicados no son numerosos, ni espectaculares, pero los resultados son reproducibles y su autenticidad está demostrada. Nuestro equipo vienen trabajando desde hace más de 10 años en este campo. Hemos analizado 5 yacimientos prehistóricos (SJaPL, Longar, Pico Ramos, Urratxa y Aizpea) y uno histórico (Aldaieta) del País Vasco. Los resultados obtenidos hasta el momento, nos están permitiendo indagar en los procesos evolutivos sufridos por la población vasca, contrastar las hipótesis que han sido planteadas con otras evidencias, y concretamente en el yacimiento de Aldaieta, indagar en cuestiones biosociales, como el parentesco, y en el origen de este grupo humano.

ABSTRACT

The analysis of ancient DNA (aDNA) allows the direct study of the genetic pool of extinct populations. However, some methodological challenges arise, particularly linked to the poor preservation of aDNA. Other limitations stem from the high risk of contamination with modern human DNA. These caveats led to the elaboration of a series of *Authentication Criteria* that all laboratories involved in aDNA analysis must meet in order to guarantee the reliability of the results for their publication. Thus, the number of publications in this field is not now as voluminous nor as spectacular as it was at the beginning, but results are reproducible and their authenticity is not questioned. Our team has been working in this field for over a decade. In this period of time we have analyzed the human skeletal remains from 5 prehistoric sites (SJaPL, Longar, Pico Ramos, Urratxa and Aizpea) and one historical site (Aldaieta) from the Basque Country. The results obtained so far are casting some light into the evolutionary processes that took place in the Basque population. On one hand, we can now test objectively those hypotheses inferred previously based on modern DNA. On the other, particularly regarding the site of Aldaieta, we can assess biosocial questions like kinship, and finally, they are also enabling us to investigate the origins of this population.

LABURPENA

Antzinako ADNaren (aADN) analisiak iraganeko populazioen egitura genetikoa zuzenean aztertzea baimentzen digu. Halere, aADNren zainketa-egoera txarraren eta giza ADN modernoarekin kutsatzeko arriskua dela eta, laster nabarmendu ziren aADNrekin lan egiteak suposatzen zituen arazo metodologikoak. Hori dela eta, aADNren arloan argitaratu behar diren lan guztiek, denon artean adostutako *Benetakotasun Irizpide* multzoa bete behar dute. Gaur egun argitaratzen diren lanak ez dira hain ugariak, ezta hain harrigarriak; baina emaitzak errepikagarriak dira eta beraien benekotasuna frogatuta dago. Gure taldeak, 10 urtez dihardu lanean arlo honetan: Euskal Herriko historiaurreko bost aztarnategi (SJaPL, Pico Ramos, Urratxa eta Aizpea) eta garai historikoetako beste aztarnategi batetatik (Aldaieta) errekonstratu diren giza aztarnak aztertu ditugu jadanik. Orain arte lortutako emaitzek, Euskal Herriko populazioen izandako prozesu ebolutiboaren azterketa, baita beste ebidentzia batzuetatik eratorritako hipotesien ezbabaida, eta, preseski Aldaietako aztarnategiaren kasuan, arazo biosozialak, hala nola ahaidetasuna, eta giza talde honen jatorria aztertzea baimendu digute.

* NESKUTS IZAGIRRE, SANTOS ALONSO, CONCEPCION DE LA RÚA, UPV/EHU.

Zientzia eta Teknologia Fakultatea. Genetika, Antropologia Fisikoa eta Animalien Fisiologia saila. Sarriena Auzoa z/g. 48940 Leioa (Bizkaia).

* NESKUTS IZAGIRRE, E-mail neskuts.izagirre@ehu.es

* SANTOS ALONSO, E-mail santos-alonso@ehu.es

* CONCEPCION DE LA RÚA, E-mail conchi.delarua@ehu.es

INTRODUCCIÓN

La segunda mitad de la década de los 80 fue testigo de la publicación de los primeros trabajos en los que se describía la recuperación con éxito de ADN de restos antiguos, iniciándose así el campo del *ADN antiguo* (ADNa) o la *arqueogenética*. Uno de los trabajos pioneros de este campo se publicó en 1984, cuando HIGUCHI *et al.* recuperaron y analizaron el ADN a partir de músculo desecado de *quagga*, un animal extinguido hace 100 años. Un año más tarde PÄÄBO (1985) recuperó ADN humano a partir de una momia egipcia de 2.400 años de antigüedad. El desarrollo y la aplicación rutinaria de la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) en biología molecular dio el impulso necesario a este campo recién inaugurado, permitiendo la recuperación y análisis de ADN a partir de diferentes tipos de tejido (momificado, hueso, diente, fósiles, insectos preservados en ámbar,...) y de diferente antigüedad, llegando incluso, aparentemente, a extraer ADN de 135-120 m.a. de antigüedad a partir de insectos preservados en ámbar.

Todos estos trabajos, tuvieron un impacto enorme en otras disciplinas científicas, como la biología de la conservación, taxonomía, zoología, paleontología,... que rápidamente asumieron las ventajas que podía brindar el análisis de la variabilidad genética de especies extinguidas (directamente), como si viajáramos al pasado. El interés suscitado por estos trabajos traspasó incluso el ámbito científico, desbordando la imaginación del público general con posibilidades fantásticas de traer a la vida especies de animales, como los dinosaurios, extintos hacia millones de años (Parque Jurásico).

Sin embargo, este rápido y enorme crecimiento inicial de los trabajos en este campo, se vio pronto frenado por las dudas en cuanto a la autenticidad de los resultados, debido a la posibilidad de contaminación y a las dificultades técnicas que conllevaba trabajar con ADN que había sufrido daños hasta su recuperación en la actualidad. Así, le siguió un segundo periodo, donde el principal objetivo de los trabajos era determinar el tipo y causas del daño que sufría el ADN, las principales fuentes de contaminación, el modo de evitarlas, y tratar de establecer una serie de criterios que demostraran, fuera de toda duda, la autenticidad de los resultados obtenidos.

En este trabajo vamos a analizar los tipos de daño que puede presentar el ADN y las principales fuentes de contaminación, que nos dificultan la autenticación de los resultados, máxime cuando se trabaja con la especie humana. Finalizaremos

este artículo con un breve resumen de los trabajos que estamos llevando a cabo con restos humanos procedente del País Vasco.

1. DAÑO MOLECULAR DEL ADN

En vida del organismo, la integridad del ADN se mantiene gracias al proceso de reparación enzimática (LINDAHL, 1993), sin embargo cuando el organismo muere, el ADN es degradado por las nucleasas endógenas y por el ataque de microorganismos, hongos e insectos (EGLINTON & LOGAN, 1991). Esta degradación se puede ralentizar bajo ciertas condiciones: desecación rápida del tejido, temperaturas bajas y alta concentración de sales. Si asumimos unas concentraciones salinas cercanas a las fisiológicas, temperaturas en torno a 15°C y un pH neutro, podremos analizar ADN recuperado de restos de hasta 100.000 años de antigüedad (LINDHAL, 1993); algunas condiciones ambientales pueden incluso alargar este límite temporal (bajas temperaturas) (HAGELBERG *et al.*, 1994).

Los tipos de daño más obvios del ADN recuperado de restos antiguos son la *degradación del ADN en fragmentos de tamaño pequeño* y la *modificación de los nucleótidos de la secuencia del ADN* (HOFREITER *et al.*, 2001a, PÄÄBO, 1985). La fragmentación del ADN se debe principalmente a procesos hidrolíticos, rotura de las uniones fosfodiéster y glicosídicas, dando lugar a sitios abásicos (depurínicos y deamínicos) (LINDAHL, 1993), lo que nos obliga a trabajar con fragmentos de ADN inferiores a 100-200 pares de bases (pb) de longitud. Las reacciones de oxidación atacan a los dobles enlaces de las purinas y pirimidinas, favoreciendo la incorporación de nucleótidos erróneos durante la PCR o incluso bloqueando las reacciones de elongación de la ADN polimerasa. Estas modificaciones en los nucleótidos de la secuencia de ADN, dificultan la correcta determinación de la secuencia de ADN original, lo cual obliga a realizar múltiples amplificaciones del mismo extracto de ADN y clonación de los productos de PCR. La comparación de las secuencias de múltiples clones pondrá de manifiesto las diferencias nucleotídicas "consistentes" (las mutaciones reales de la secuencia de ADN), es decir, aquellas que ocurren en todos los clones (HOFREITER *et al.*, 2001a).

2. FUENTES DE CONTAMINACIÓN

La capacidad de amplificación de la PCR (obtención de millones de copias a partir incluso de una única molécula molde), supuso un enorme impulso para el campo del ADNa, aunque también ha

puesto de manifiesto el enorme riesgo de CONTAMINACIÓN con ADN intacto moderno. La recuperación de un número menor de copias y el daño molecular presente en el ADN, hacen que cualquier ADN moderno intacto contaminante amplifique preferencialmente.

La principal fuente de contaminación es la transferencia de algunas copias de los productos de PCR, *amplicones*, de una PCR previa a un experimento recién diseñado. En una sola reacción de amplificación se pueden producir billones de copias de la secuencia diana y cuando se abren los tubos del amplificado se producen pequeñas partículas de aerosoles que pasan al ambiente del laboratorio. Estas partículas contienen una cantidad suficiente de amplicones, que pueden contaminar y amplificarse en posteriores experimentos. De todas las posibles fuentes de contaminación, ninguna parece ser tan relevante como ésta.

Para evitar este tipo de contaminación, es necesario llevar a cabo el trabajo pre-PCR (manipulación de los especímenes, extracción de ADN y preparación de la reacción de amplificación) en un laboratorio equipado con presión positiva, físicamente separado del laboratorio donde se lleva a cabo todo el trabajo post-PCR (tipaje: digestión enzimática, electroforesis, clonación, secuenciación,...) y donde nunca se haya trabajado con ADN moderno.

Otra fuente de contaminación a tener en cuenta, es el contacto directo con ADN humano moderno. Las muestras se pueden contaminar con el ADN de las células de la piel, saliva, pelo,... desprendido del personal que manipula los restos *durante la excavación*. El riesgo de contaminación durante la fase de excavación se puede minimizar mediante el uso de gorros y guantes por parte de los arqueólogos y demás personal que manipulen los materiales. La limpieza con H₂O de los restos esqueléticos, además de aumentar el riesgo de contaminación, acelera la degradación del ADN endógeno. Por ello, se recomienda apartar previamente las muestras que se vayan a analizar molecularmente y almacenarlas a -20°C. Aún así, previamente al análisis se requiere desechar la superficie externa mediante la abrasión del tejido óseo o la limpieza con ácidos del tejido dentario, y posterior irradiación con luz UV.

En el laboratorio también existe riesgo de contaminación por contacto directo con el ADN de los investigadores que llevan a cabo la extracción y amplificación. La contaminación durante la fase de análisis en el laboratorio es fácilmente detectable,

realizando los oportunos controles: *el blanco de la extracción y el control negativo de la PCR*. Durante la fase de extracción de las muestras se lleva a cabo en paralelo, el blanco de la extracción, que consiste en una reacción que se somete a todo el proceso de la extracción, pero al que no se le ha añadido tejido (HAGELBERG *et al.*, 1989). El control negativo de la PCR es una reacción a la que se le añaden todos los reactivos necesarios para la amplificación, excepto el ADN molde, lo que nos permitirá poner de manifiesto las posibles contaminaciones ocurridas durante la preparación de la reacción de amplificación.

El principal problema de la contaminación con ADN humano moderno (intacto) reside en la dificultad de detectarla. En última instancia, es aconsejable para asegurarse que los resultados obtenidos corresponden a la secuencia de la muestra, realizar *múltiples extracciones de diferentes muestras del mismo individuo* y comprobar que en todas ellas se obtiene el mismo resultado (PÄÄBO, 1989).

La contaminación con el ADN de otras especies no es tan relevante. Por otra parte, si se trabaja con ADN de otras especies, al utilizarse primers específicos para dicha especie es más fácil identificar la posible contaminación con ADN humano.

3. CRITERIOS DE AUTENTIFICACIÓN DE LOS RESULTADOS

Teniendo en cuenta lo arriba comentado, es patente la dificultad de obtener secuencias de ADN de la mayoría de los fósiles, tanto por la mala conservación del ADN, como por el enorme riesgo de contaminación. Todo ello crea un enorme ruido de fondo, que hace muy difícil distinguir la secuencia endógena de la muestra, de los artefactos generados. Por todo ello, el trabajo con ADN antiguo es muy exigente y hoy día es obligatorio que los trabajos susceptibles de publicarse cumplan una serie de *Criterios de Autentificación* (Tabla 1), consensuados por todos los investigadores que trabajan en este campo (HOFREITER *et al.*, 2001a, PÄÄBO *et al.*, 2004; COOPER & POINAR, 2000).

a. Caso-ejemplo metodológico: ADN de neandertal

La primera etapa de investigación en ADN culminó con la publicación del trabajo de KRINGS *et al.* (1997), donde se aborda la problemática del origen de la especie humana moderna mediante el análisis del ADN recuperado de un espécimen de

<i>I. Ensayos bioquímicas de la preservación molecular</i>	Es una técnica que chequea rápidamente el estado general de preservación del espécimen. La técnica más usada es el grado de racemización de los aminoácidos (POINAR <i>et al.</i> , 1996). Un excesivo grado de racemización indica que hay pocas probabilidades de que esa muestra contenga ADN.
<i>II. Cuantificación del número de moléculas de ADN amplificables</i>	Nos muestra la posibilidad de que ocurran cambios consistentes. Generalmente cuando un extracto contiene >1.000 moléculas molde, es suficiente realizar una única amplificación. En caso contrario, se deben realizar múltiples amplificaciones y secuenciar varios clones de cada producto de amplificado
<i>III. Controles de la extracción y de la PCR</i>	Durante la PCR se deben llevar a cabo controles para distinguir entre la contaminación que ocurre durante la extracción (blanco de la extracción) y durante la preparación de la PCR (control negativo de la PCR).
<i>IV. Amplificación repetida del mismo o varios extractos</i>	Tiene dos propósitos: 1) detección de contaminaciones esporádicas y 2) detección de cambios debidos a las lesiones en los nucleótidos del ADN. Nos va a indicar si el resultado obtenido es fiable.
<i>V. Clonación de los productos de amplificación y secuenciación de múltiples clones</i>	Sirve para detectar la heterogeneidad en los productos de amplificación debido a contaminación o daño del ADN.
<i>VI. Correlación inversa entre la eficiencia de la amplificación y la longitud del amplificado</i>	Puesto que el ADN está fragmentado, la eficiencia de amplificación debería estar inversamente correlacionada con la longitud de la amplificación.
<i>VII. Reproducción de los resultados en un segundo laboratorio</i>	Tiene un propósito similar a los criterios v. y vi. la detección de contaminación de los reactivos y/o muestras durante su manipulación. Es necesario llevar a cabo este criterio cuando se obtienen resultados inesperados o novedosos.
<i>VIII. Análisis del ADN de restos de animales del yacimiento</i>	La falta de amplificación de secuencias humanas en restos de animales indicaría que el proceso de la decontaminación de las muestras llevadas a cabo en el laboratorio ha tenido éxito.

Tabla 1. Criterios de autenticación de los resultados para determinar las secuencias de ADN.

neandertal, en concreto el espécimen tipo procedente del valle de Neander (Alemania) hallado en 1856, siguiendo para ello una rigurosa metodología, que ha quedado como modelo a seguir para cualquier publicación posterior en el campo del ADN (KRINGS *et al.*, 1997).

La extracción de ADN se realizó a partir de un fragmento de hueso mediante un protocolo estándar

de extracción. Se secuenció un fragmento de 357 pb de longitud a partir de tres extracciones y en dos laboratorios independientes, amplificándose varias veces el material de cada extracción y secuenciando múltiples clones de cada producto de amplificado. Las comparaciones pusieron de manifiesto: 1) que las diferencias entre el neandertal y más de 5.000 secuencias de humanos mo-

ernos recopiladas de la literatura, es tres veces superior a las diferencias halladas en la muestra de humanos modernos; 2) que la variabilidad del ADNmt del neandertal no se incluye dentro del rango de variabilidad de los humanos modernos; y 3) que además no presenta mayor afinidad por los europeos modernos. Tomando como referencia la fecha de 4-5 m.a. para el tiempo de divergencia entre humanos y chimpancés, se calculó la tasa de sustitución para el fragmento analizado, y se estimó una edad de 450.000 años para el antecesor común de neandertales y humanos modernos, y de 163.000 años para el antecesor de todos los humanos actuales. Estos resultados indican que humanos modernos y neandertales siguieron una trayectoria evolutiva independiente, durante un periodo de tiempo suficientemente amplio como para justificar su clasificación en dos especies diferentes. Aunque no se descarta la existencia de cruzamientos entre neandertales y humanos modernos, parece probable que los neandertales se extinguieran sin contribuir al pool génico del ADN mt de los humanos modernos.

Actualmente disponemos de la secuencia de 9 neandertales (SERRE *et al.*, 2004; LALUEZA FOX *et al.*, 2005), lo que nos permite analizar la diversidad genética interna de los neandertales. Los neandertales presentan menor variabilidad en comparación con los grandes monos, lo que indicaría que al igual que los humanos modernos también experimentaron un cuello de botella y posterior expansión poblacional (SERRE *et al.*, 2004).

4. APLICACIÓN DE LAS INVESTIGACIONES DEL ADN EN EL PAÍS VASCO

La importancia del trabajo de KRINGS *et al.* (1997) no solo reside en la relevancia de las conclusiones obtenidas acerca del debate del origen de los humanos modernos, sino también en haber sentado las bases metodológicas que debe cumplir cualquier trabajo publicable en el campo del ADN. Siguiendo esta metodología, el análisis de ADN antiguo puede realizar aportaciones muy importantes en el campo de la antropología y la arqueología. Así, nuestro equipo viene trabajando con éxito en este campo desde hace más de 10 años.

a. ADN de restos prehistóricos de País Vasco

Los primeros trabajos en ADN antiguo que realizamos en el País Vasco (IZAGIRRE, 1998), tenían como objetivo comparar la variabilidad genética observada durante el neolítico-calcolítico con la actual y poder así contrastar las hipótesis establecidas a partir de los datos de la población vasca actual. Para ello llevamos cabo el análisis de la variabilidad del genoma mitocondrial en 122 muestras recuperadas en 4 yacimientos prehistóricos cuya cronología abarcaba desde el Neolítico a la edad de Bronce (SJaPL, Longar, Picos Ramos, Urratxa y Aizpea) (Figura 1).

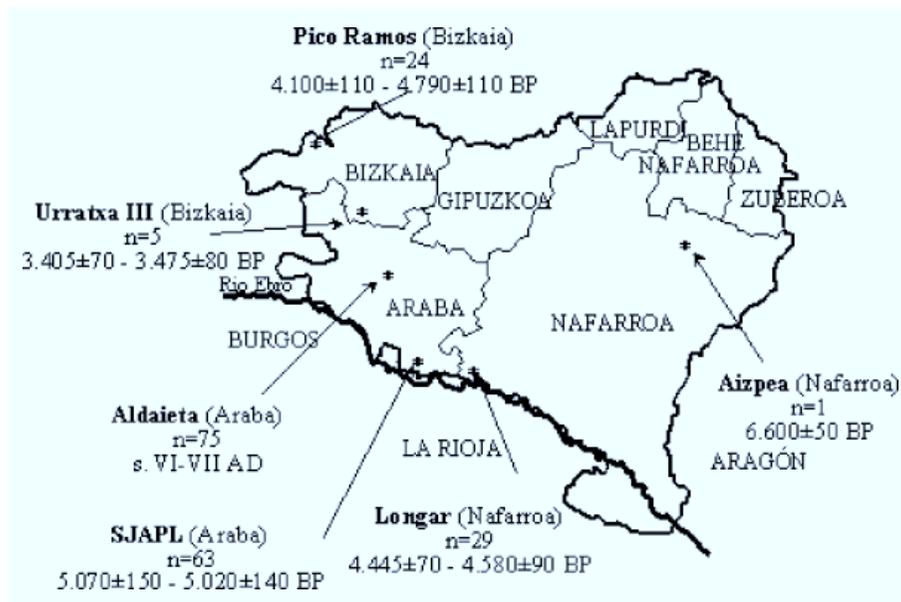


Figura 1. Localización geográfica en el País Vasco de los 5 yacimientos prehistóricos y el histórico analizados por nosotros. n, tamaño muestral analizado mediante ADN.

Los resultados más relevantes de este trabajo, fueron por un lado contrastar algunas de las hipótesis existentes en el momento, como la propuesta por TORRONI *et al.* (1998), según la cual la mutación que define al haplogrupo V del ADNmt se originó en una población pre-neolítica en la "zona Atlántica" (País Vasco) hace 12.000-13.000 años, expandiéndose después del Último Glacial (15.000 años), en un momento climático más favorable, al centro y norte de Europa. Sin embargo, los resultados obtenidos en las muestras prehistóricas, nos permitieron refutar la hipótesis de TORRONI *et al.* (1998), ya que no se encontró ningún individuo perteneciente al haplogrupo V en los 125 individuos analizados (IZAGIRRE & DE LA RÚA, 1999).

Por otro lado, este trabajo también nos ha permitido contrastar otra hipótesis comúnmente extendida, basada en los datos genéticos actuales, según la cual el aislamiento genético de los vascos sería la causa fundamental de las peculiaridades genéticas que se observan en la población actual (CAVALLI-SFORZA, 1988; RICHARDS *et al.*, 1996). El haplogrupo J, dada su antigüedad (6.000-12.000 años) y lugar de origen (Próximo Oriente), es el principal linaje del ADNmt relacionado con la expansión Neolítica (RICHARDS *et al.*, 1996). La baja frecuencia hallada de este haplogrupo en una muestra de vascos actuales (guipuzcoanos 2%), parece asimismo corroborar la hipótesis del aislamiento genético de los vascos, ya que en el resto de Europa presenta una frecuencia entre 7-14%. Sin embargo, en dos de las muestras prehistóricas (SJA PL Pico Ramos y Urratxa) con una antigüedad máxima de 5.000 años B.P., hemos encontrado una elevada frecuencia del haplogrupo J (16%), lo que sugiere que la influencia genética del neolítico en el País Vasco es semejante a la sufrida por las demás poblaciones europeas (IZAGIRRE & DE LA RÚA, 2001). Los datos genéticos obtenidos en una muestra histórica (Aldaieta, Álava), también corroboran los resultados obtenidos en las muestras prehistóricas (ALZUALDE *et al.*, 2005a).

b. Análisis molecular de un yacimiento histórico del País Vasco

Actualmente estamos trabajando en un yacimiento histórico, la necrópolis de Aldaieta (Nanclares de Gamboa, Alava) que presenta una enorme importancia histórica, tanto por su cronología (s. VI-VII c.A.D.), la tardoantigüedad, una de las épocas peor conocidas de la historia del País Vasco, como por las características arqueológicas

que presenta (complejo ajuar de carácter franco) (AZKARATE, 1999).

El análisis de la variabilidad del ADNmt en la necrópolis nos ha ayudado a determinar relaciones de parentesco existentes entre los individuos inhumados. La necrópolis de Aldaieta presenta una frecuencia muy alta de un linaje mitocondrial (H-73G) que es muy raro en las poblaciones actuales. Este linaje aparece en los diferentes enterramientos grupales del sector SE de la necrópolis, donde también observamos un porcentaje de armas superior. La explicación que proponemos es que este sector SE de la necrópolis, contiene los restos de un grupo social diferenciado (élite), cuyos componentes estarían emparentados entre sí, al menos por vía materna (IZAGIRRE *et al.* 2005). La estimación de parentesco no solo es importante por la información que proporciona acerca del comportamiento de los grupos humanos del pasado, sino también porque nos permite corregir las frecuencias de los haplogrupos antes de llevar a cabo análisis comparativos entre poblaciones.

Una de las propuestas interpretativas señala que Aldaieta es una necrópolis de caídos de guerra (BOHME, 2002), interpretación que ha sido rebatida por el director de la excavación, AZKARATE (2004), quien mantiene que se trata de un asentamiento estable. Su argumentación basada en datos antropológicos (distribución de edad y sexo), encuentra también apoyo en los datos genéticos (parentesco) (IZAGIRRE *et al.* 2005). Restaría por explicar si Aldaieta estaba formada por grupos autóctonos que habrían adquirido la cultura franca por aculturación o bien se trataría de un control temporal del territorio por parte de los francos, problemática que estamos analizando a través de las secuencias del ADNmt (ALZUALDE *et al.* 2005b).

Esta necrópolis ha puesto en cuestión algunas interpretaciones históricas sobre el aislamiento de los vascos frente a las influencias de otros pueblos que transitaban en la tardoantigüedad por la Península Ibérica (francos y visigodos). El análisis estadístico multivariante de los datos genéticos obtenidos en la población histórica de Aldaieta, junto con los datos anteriormente publicados de las poblaciones prehistóricas (IZAGIRRE & DE LA RÚA, 1999), muestran que Aldaieta se asemeja más a las poblaciones actuales del área Atlántica, mientras que las poblaciones prehistóricas del País Vasco (Sja PL, Longar, Pico Ramos) presentan una clara diferenciación en relación a todas las demás (Figura 2). Todo ello sugiere que la variabilidad de las poblaciones actuales podría ser debida a re-estructuraciones post-neolíticas. Teniendo en cuenta

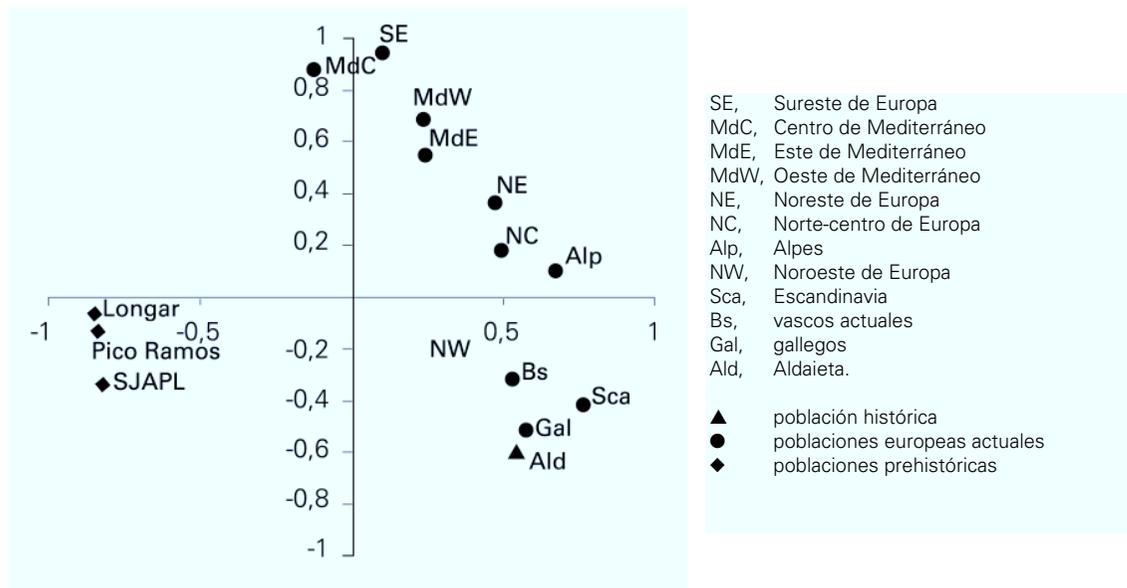


Figura 2. Análisis de componentes principales de los datos del ADNmt obtenidos en las poblaciones prehistóricas (SJAPL, Longar, Pico Ramos, Urratxa y Aizpea) y la histórica (Aldaieta) del País Vasco, junto con datos de muestras actuales del oeste de Europa de la literatura (ALZUALDE *et al.*, 2005a).

que la población histórica de Aldaieta presenta frecuencias que se incluyen dentro de la variabilidad de las poblaciones actuales de la costa Atlántica, podríamos asumir que esta re-estructuración en la distribución de las frecuencias del ADNmt tuvo lugar hace 5.000-1.500 años, probablemente como resultado del flujo génico y/o deriva genética (ALZUALDE *et al.*, 2005b).

c. Aplicaciones y perspectivas futuras de ADNa

Actualmente la proporción de trabajos en el campo del ADNa relacionados con especies diferentes de la nuestra es claramente superior, ya que en estos casos la autenticación de los resultados es más sencilla, al poder identificar inequívocamente las secuencias contaminantes humanas de las secuencias endógenas de la especie analizada. Son estudios en los que se aborda el análisis de la historia y filogeografía de la especie (análisis de los cambios genéticos que han tenido lugar a lo largo del tiempo en una especie de la que se conservan muchos individuos), de la dieta y comportamiento, ya que gracias al análisis genético de las heces tenemos información acerca de la especie que las ha depositado y de las especies que ha ingerido. Otras áreas de estudio son la arqueología médica molecular (análisis de patógenos en los restos antiguos) y el origen de la do-

mesticación. Respecto a la domesticación, el análisis en las especies antiguas de genes de baja variabilidad se puede utilizar para estimar cuando se seleccionaron esos genes y el número de poblaciones salvajes que han contribuido en la especie domesticada.

Los trabajos que hemos realizado y que se vienen publicando en los últimos años, cumpliendo los estrictos criterios de autenticación, han demostrado que disponiendo de la muestra adecuada y conservada en las condiciones idóneas (sin lavar con H₂O y conservada a una temperatura de -20°C), a pesar del enorme esfuerzo y coste económico que supone trabajar con ADNa, es posible contrastar hipótesis que han estado ampliamente aceptados en la comunidad científica durante mucho tiempo. Asimismo el estudio antropológico global de un yacimiento mediante análisis de ADNa, no solo nos proporciona datos comparativos para abordar cuestiones filogenéticas, sino también nos proporciona información acerca de la organización social de una población y de factores bioculturales como el parentesco.

Por último, el análisis de ADNa ofrece la oportunidad única de que especies o individuos extinguidos largo tiempo atrás puedan contribuir a la mejor comprensión de la evolución genético molecular de las especies.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido posible gracias a las subvenciones recibidas de la UPV/EHU (1/UPV/EHU 00154.310-EA-8130/2000, 9/UPV 00154.310-14495/2002) y del Ministerio de Ciencia y Tecnología (MCYT) (BOS2000-0408). S. ALONSO es

un investigador RAMON Y CAJAL (MEC-UPV/EHU). Asimismo, queremos agradecer a los arqueólogos de los yacimientos de SjaPL, Urratxa, Longar, Pico Ramos, Aizpea y Aldaieta habernos confiado el material para su estudio (J.I. VEGAS, M. MUÑOZ, J. ARMENDARIZ y S. IRIGARAI, L. ZAPATA, A. CAVA y A. AZKARATE).

BIBLIOGRAFÍA

- ALZUALDE A., IZAGIRRE N., ALONSO S., ALONSO A. & DE LA RÚA C.
2005a Temporal mitochondrial DNA variation in the Basque Country: influence of post-Neolithic events. *Ann. Hum. Genet.* (in press)
- 2005b Insight into the "isolation" of the Basques: mtDNA lineages from the historical site of Aldaieta (VI-VII c. AD). *Am. J. Phys. Anthropol.* (en prensa).
- AZKARATE A.
1999 Necrópolis tardoantigua de Aldaieta (Nanclares de Gamboa, Álava). Volumen I. *Memorias de yacimientos alaveses 6*, Dip. F. de Álava, Dpto. de Cultura. Vitoria/Gasteiz, 536 pp.
- e.p. ¿Reihengräberfelder al sur de los Pirineos occidentales? In: *Sacralidad y arqueología: Homenaje al Prof. Thilo Ulbert*, ed. J.M. BLAZQUEZ, A. GONZALEZ. *Antigüedad y Cristianismo 21*, 389-313, Murcia.
- 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
- BÖHME H.W.
2002 Der Friedhof von Aldaieta in Kantabrien –zeugnis für ein fränkisches Schlachtfeld des 6. Jahrhunderts? *Acta Praehistorica et Archaeologica 34*, 135-150.
- CAVALLI-SFORZA L.L.
1988 The Basque population and ancient migrations in Europe. *Munibe (Antropología y Arqueología) Suplemento n° 6*, 129-137.
- COOPER A. & POINAR H.N.
2000 Ancient DNA: do it right or not at all. *Science 289*, 1139.
- CÔRTE-REAL H.B.S.M., MACAULAY V.A., RICHARDS M.B., HARITI G., ISSAC M.S., CAMBON-THOMSEN A., PAPIHA S., BERTRANPETIT J. & SYKES B.C.
1996 Genetic diversity in the Iberian Peninsula determined from mitochondrial sequence analysis. *Ann. Hum. Genet.*, 60, 331-350.
- EGLINTON G. & LOGAN G.A.
1991 Molecular preservation. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B 333*, 315-327.
- HAGELBERG E., THOMAS M.G., COOK C.E., SHER A.V., BARYSHNIKOV G.F. & LISTER A.M.
1994 DNA from ancient mammoth bones. *Nature 370*, 333-334.
- HIGUCHI R., BOWMAN B., FREIBERGER M., RYDER O.A. & WILSON A.C.
1984 DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature 312*, 282-284.
- HOFREITER M., JAENICKE V., SERRE D., HAESELER 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 H.N., KUCH M. & PÄÄBO S.
2001b Ancient DNA. *Nat. Rev. Genet.* 2, 353-359.
- IZAGIRRE N.
1998 *Aplicación de la biología molecular en el estudio antropológico de las poblaciones humanas del pasado: análisis del ADN mitocondrial*. Tesis Doctoral, UPV/EHU. Bilbao
- 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.* 65, 199-207.
- IZAGIRRE N. & DE LA RÚA C.
2002 Ancient mtDNA haplogroups: a new insight into the genetic history of European populations. *Int. J. Anthropol.* 17, 27-40.
- IZAGIRRE N., ALZUALDE A., ALONSO S., PAZ L., ALONSO A. & DE LA RÚA C.
2005 Rare haplotypes in mtDNA: applications in the analysis of biosocial aspects of past human populations. *Hum. Biol.* (en prensa).

- KRINGS M., CAPELLI C., TSCHENTSCHER F., GEISERT H., MEYER S., HAESELER A., GROSSSCHMIDT K., POSSNERT G., PAUNOVIC M. & PÄÄBO S.
2000 A view of Neandertal genetic diversity. *Nat. Genet.* 26, 144-146
- KRINGS M., STONE A., SCHMITZ R.W., KRAINITZKI H., STONEKING M. & PÄÄBO S.
1997 Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell* 90, 19-30.
- LALUEZA FOX C., SAMPIETRO M.L., 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
- LINDAHL T.
1993 Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362, 709-715.
- MATHESON C.D. & LOY T.H.
2001 Genetic sex identification of 9400-year-old human skull samples from Çayönü Tepesi, Turkey. *Journal of Archaeological Science* 28, 569-575.
- MELLARS P.A.
1992 Archaeology and the population-dispersal hypothesis of modern human origins in Europe. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 337, 225-234.
- PÄÄBO S.
1985 Molecular cloning of ancient Egyptian mummy DNA. *Nature* 314, 644-645.
- PÄÄBO S., POINAR H., SERRE D., JAENICKE-DESPRÉS 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.
- RICHARDS M.B., CORTE-REAL H., FOSTER P., MACAULAY V., WILKINSON-HERBOTS H., DEMAINE A., PAPIHA S., HEDGES R., BANDELT H.J. & SYKES B.
1995 Paleolithic and Neolithic lineages in the European mitochondrial gene pool. *Am. J. Hum. Genet.* 59, 185-203.
- SAIKI R.K., GELFAND D.H., STOFFEL S., SCHARF S.J. & HIGUCHI R., *et al.*
1988 Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- SERRE D., LANGANEY A., CHECH M., TESCHLER-NICOLA M., PAUNOVIC M., MENNECIER P., HOFREITER M., POSSNERT G. & PÄÄBO S.
2004 No evidence of Neandertal mtDNA contribution to early modern humans. *PLoS Biol.* 2, 313-317.
- STRAUSS L.G.
1989 Age of modern European. *Nature* 342, 476-477.
- TORRONI A., BANDELT H.J., D'URBANO L., LAHERMO P., MORAL P., SELLITO D., RENGÓ C., FORSTER P., SAVONTAUS M.L., BONNÉ-TAMIR B. & SCOZZARI R.
1998 mtDNA analysis reveals a major late Paleolithic expansion from southwestern to northeastern Europe. *Am. J. Hum. Genet.* 62, 1137-1152.