

Análisis del ADN mitocondrial de dos muestras del yacimiento paleolítico de El Pirulejo

Mitochondrial DNA analysis of two samples from the paleolithic site of El Pirulejo

EVA FERNÁNDEZ DOMÍNGUEZ, EVA PRATS MIRAVITLLAS, EDUARDO ARROYO PARDO, ALEJANDRO PÉREZ PÉREZ, DANIEL TURBÓN BORREGA y MIGUEL CORTÉS SÁNCHEZ

RESUMEN

En la presente publicación se presentan los resultados del análisis del ADN mitocondrial (ADNmt) de dos individuos del nivel magdaleniense de El Pirulejo (Córdoba) (Asquerino *et al.*, 1991). Las secuencias obtenidas se encuadran dentro de la variabilidad genética del hombre moderno actual, sin presentar similitud alguna con las secuencias de ADN mitocondrial de neandertal publicadas hasta la fecha. La distribución actual de las variantes mitocondriales encontradas en las dos muestras de El Pirulejo es similar a la encontrada en otros dos individuos Paleolíticos (Caramelli *et al.*, 2003), y coherente con el modelo de expansión del hombre anatómicamente moderno desde África.

PALABRAS CLAVES: ADN antiguo. Paleolítico. ADN mitocondrial. Andalucía.

SUMMARY

At the present work it was studied the mitochondrial DNA (mtDNA) in two individuals from the Magdalenian level from El Pirulejo archaeological site located in Córdoba, Spain (Asquerino *et al.* 1991). The obtained sequences were inside the genetic variability of modern humans and did not share any similarities with published Neanderthal mtDNA sequences. The present distribution of the mtDNA lineages from El Pirulejo are similar to that found at other two Paleolithic individuals (Caramelli *et al.*, 2003). All data are compatible with an "Out of Africa" model of dispersion of modern humans.

KEY WORDS: Ancient DNA. Palaeolithic. Mitochondrial DNA. Andalusia.

1. INTRODUCCIÓN

El origen del hombre moderno en Europa es tema de continuo debate. En este sentido, desde la Biología Molecular se han hecho propuestas para la reconstrucción del poblamiento europeo durante el Paleolítico Superior y el Neolítico, principalmente mediante el análisis de genomas haploides como el ADN mitocondrial (ADNmt) y el Cromosoma Y.

El ADNmt es un tipo de material genético extranuclear que contiene información relativa a la síntesis de componentes de la respiración celular, y que se hereda íntegra y exclusivamente por línea materna. Puesto que en este caso no existe aportación genética mixta del padre y de la ma-

dre, como sucede con el ADN nuclear o cromosómico, el ADN mitocondrial se transmite invariable de generación en generación, siendo las mutaciones que ocurren espontáneamente en él la única fuente de variabilidad a lo largo del tiempo. El equivalente "masculino" del ADNmt es el cromosoma Y, ya que se transmite exclusivamente en la línea masculina. Sin embargo, a diferencia del ADNmt, el cromosoma Y se encuentra en el núcleo celular.

Todos los estudios realizados hasta la fecha con estos marcadores apuntan a un origen africano del hombre anatómicamente moderno hace aproximadamente 200.000 años en África (Cann *et al.*, 1987; Vigilant *et al.*, 1991; Harding *et al.*, 1997, 2000; Clark *et al.*, 1998; Hey y Harris,

1999; Thomson *et al.*, 2000; Ingman *et al.*, 2000; Richards y Macaulay, 2001; Quintana-Murci *et al.*, 1999; Takahata *et al.*, 2001; Forster, 2004). En la vertiente opuesta a la teoría de un origen único africano reciente “*Out of Africa*” se encuentra la Teoría Multiregional (Thorne y Wolpoff, 1992) según la cual existió un flujo genético importante entre los humanos anatómicamente modernos y las poblaciones descendientes directas de *Homo erectus*, los neandertales en el caso del continente Europeo. De ser cierta esta última hipótesis cabría buscar los orígenes de la diversidad genética europea mucho más atrás en el tiempo, probablemente en el stock ancestral de *Homo erectus*.

Por otra parte, el avance de las técnicas de extracción y amplificación de ADN ha permitido la recuperación de secuencias de ADNmt de varios neandertales de diferentes procedencias (Kriings *et al.*, 1997, 2000; Ovchinnikov *et al.*, 2000; Schmitz *et al.*, 2002; Serre *et al.*, 2004; Lalueza-Fox *et al.*, 2005, 2006; Beauval *et al.*, 2005; Orlando *et al.*, 2006; Caramelli *et al.*, 2006; Krause *et al.*, 2007). El número y naturaleza de los cambios nucleotídicos y el análisis de las diferencias por parejas (MPD) muestran que la variabilidad genética de los especímenes analizados está fuera de la variabilidad genética humana actual, excluyendo por tanto la posibilidad de una contribución genética importante de los neandertales al stock genético actual. Mediante la aplicación de varios modelos poblacionales se ha estimado que, atendiendo a los análisis de ADNmt, esta contribución habría sido como máximo de entre un 0,1 y un 25% (Serre *et al.*, 2004; Currat y Excoffier, 2004).

La clave de este problema reside probablemente en el análisis genético de los especímenes de *Homo sapiens sapiens* del momento en que ambas subespecies convivieron en Europa. La obtención de secuencias de dos individuos de Cro-Magnon de 24000 años de antigüedad confirmó que la diferenciación genética existente entre el hombre de Neandertal y la humanidad actual ya estaba presente a inicios del Paleolítico superior (Caramelli *et al.*, 2003).

A pesar de que todos los resultados apuntan a una contribución genética mínima por parte de los neandertales, tal y como sugirieron inicialmente los propios autores de uno de estos estudios la posibilidad de hibridación entre neandertales y *Homo sapiens sapiens* no puede ser excluida totalmente por diversas causas (Kriings *et al.*, 1997). Por una parte, los estudios genéticos de las poblaciones humanas actuales han puesto de manifiesto que nuestra especie es sorprendentemente homogénea genéticamente hablando, lo que apunta a un origen común reciente a partir de un grupo pequeño de individuos. Según esto, cabría suponer que la variabilidad genética de las poblaciones del pasado debió de ser mucho mayor a la observada actualmente, pudiendo incluir genes de origen neandertal. Otra posibilidad es que estos “genes neandertales” hubieran evolucionado dentro de la línea humana a través de mutación.

Por otra parte, dado que el ADNmt proviene exclusivamente de la madre, los resultados anteriores no permiten excluir la posibilidad de un flujo génico entre ambos especímenes a nivel paterno, tal y como sugiere la variabilidad genética de ciertos marcadores nucleares (Hammer, 1995; Armour *et al.*, 1996; Tishkoff *et al.*, 1996).

La reciente recuperación de un millón de pares de bases de ADN nuclear de un espécimen de Neandertal mediante una

novedosa técnica de secuenciación parece apoyar esta última hipótesis (Green *et al.*, 2006). Sin embargo, la incidencia de la contaminación y del daño *post-mortem* en las secuencias recuperadas mediante esta novedosa tecnología no ha sido aún evaluada completamente, y no puede descartarse la posibilidad de que muchas de las variantes detectadas en el análisis sean resultado de estos fenómenos.

La recuperación y el análisis de ADNmt a partir de restos de gran antigüedad resultan más factibles y metodológicamente menos complejos. La ventaja de este material genético sobre el material nuclear es que es del orden de 10000-1000 veces mucho más abundante en la célula (Malyarchuk *et al.*, 2002; Giles *et al.*, 1980). Además, la variabilidad del ADN mitocondrial ha sido ampliamente disecionada en las poblaciones humanas actuales de los cinco continentes proporcionando un marco de comparación adecuado para las secuencias antiguas recuperadas. Esta variabilidad ha sido tipificada en lo que se denominan *haplogrupos* o *clusters* mitocondriales. Podríamos definir un haplogrupo mitocondrial como una agrupación de variantes mitocondriales (*haplotipos*) que comparten ciertas mutaciones y que presentan un origen común. Esto implica que los polimorfismos que definen cada haplogrupo se produjeron exclusivamente en las líneas antecesoras de todos los haplotipos que lo integran.

La aplicación de este tipo de estudios en muestras de diferentes continentes por separado reveló la existencia de localizaciones geográficas específicas de los haplogrupos mitocondriales, de manera que podían distinguirse *clusters* exclusivamente africanos, europeos y asiáticos respectivamente¹. Esta característica ha resultado ser de extrema utilidad para la inferencia de patrones migratorios dentro y fuera de cada continente.

En Europa existen 9 haplogrupos principales que se identifican con letras mayúsculas (H, HV, V, U, J, T, I, W y X), subdivididos en algunos casos en subclusters menores (H puede subdividirse en 12 subclusters que van de H1 a H12; U se subdivide en K, U1, U2, U3, U4, U5, U6, U7, U8; J en J1 y J2 y dentro de T se distinguen T1, T2, T3, T4 y T5). Cada uno de estos haplogrupos aparece hoy con una distribución geográfica diferencial en Europa. Así, el haplogrupo H, que incluye a la secuencia consenso y aquellas derivadas, es el más frecuente en Europa (40-60%) y se encuentra ampliamente distribuido. Los restantes haplogrupos se distribuyen con frecuencia menor de forma más o menos homogénea en el continente, exceptuando los haplogrupos J y V. El primero de ellos exhibe un gradiente decreciente en su frecuencia que va desde Próximo Oriente hacia el sur de Europa (Richards *et al.*, 1996, 2000), mientras que el segundo presenta picos máximos de frecuencia en poblaciones del norte de Europa y en la franja cantábrica de la Península Ibérica (Torroni *et al.*, 1998, 2001; Tambets *et al.*, 2004).

Para la datación de los diferentes haplogrupos se estima el tiempo del ancestro común más reciente (TMRCA, *Time of the Most Recent Common Ancestor*) de cuantas líneas lo integran. Para ello se consideran aquellos haplotipos relacionados, se calcula su diversidad y se estima el tiempo que ésta ha tardado en generarse con una tasa de mutación determinada. La estima no se corresponde exactamente con el momento en que surgieron las mutaciones que caracterizan a dichos clusters, pues desde ese mo-

mento hasta la fijación de dichas mutaciones en las líneas descendientes puede haber transcurrido mucho tiempo. Por otra parte, la estima del TMRCA se basa en aquellos haplotipos derivados del linaje original. Muchos de los descendientes de este MRCA pueden haberse extinguido por procesos de deriva genética por lo que el tiempo estimado puede ser menor al real.

A partir de estos datos se ha propuesto que la mayor parte de la variabilidad mitocondrial europea actual tiene sus orígenes en las expansiones desde Próximo Oriente durante el Paleolítico (Richards *et al.*, 1996 y 2000). Así, el haplogrupo U habría sido introducido en Europa al inicio del Paleolítico Superior (*Early Upper Palaeolithic* o EUP) por las expansiones del hombre anatómicamente moderno. Los haplotipos fundadores de los haplogrupos HV*, U1 y posiblemente también de U2 y U4 llegarían después, durante el Paleolítico Superior Medio (MUP). A finales del Paleolítico Superior (*Late Upper Palaeolithic* o LUP) penetrarían en Europa desde Próximo Oriente algunas variantes del haplogrupo H, como el H-CRS, H-16304 y H-16362,16482. Finalmente, los haplogrupos J, T1, U3 y algunas secuencias de los haplogrupos H y W habrían sido introducidos en Europa durante la difusión del Neolítico desde Próximo Oriente.

Como ya se ha mencionado antes, estas interpretaciones se basa el supuesto de que la tasa de mutación —el ritmo al que se producen los cambios en una secuencia de ADN—, es constante a lo largo del tiempo. Existe una gran controversia a la hora de determinar esta tasa de mutación, de manera que los mismos datos pueden proporcionar tiempos de divergencia muy dispares dependiendo de la tasa elegida. En 1996 se anunció (Howell *et al.*, 1996) que la tasa de mutación del ADNmt era considerablemente más alta que las utilizadas por Richards *et al.*, 1996 lo que motivó que estos autores consideraran la posibilidad de que las dataciones paleolíticas de los linajes mitocondriales europeos quedaran acortadas hasta época neolítica (Richards *et al.* 1996; véase, también, Pääbo, 1996 a este respecto). Siguroardóttir *et al.*, 2000 insisten de nuevo en la alta tasa de mutación en la región Hipervariable I (HVRI ó HVSI) del ADNmt, que rebajaría considerablemente las supuestas fechas paleolíticas mencionadas, hasta un límite aproximado no superior a los 10.000 años A.P.

En el presente estudio se estudió el ADN mitocondrial de dos individuos de época Magdaleniense del yacimiento de El Pirulejo, situado en la localidad de Priego de Córdoba (Andalucía) (Asquerino, 1992 y 1993).

La caracterización genética de individuos del Paleolítico superior resulta de especial interés ya que proporciona datos sobre la composición genética de estas poblaciones en el contexto del poblamiento de Europa. En este sentido, este análisis permitirá matizar el tiempo y lugar de origen de los diferentes haplogrupos europeos y por otra precisar la contribución genética -si es que la hubo- del hombre de Neandertal al acervo genético humano actual.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

En la campaña de excavación de 1991 en El Pirulejo, en el subnivel 4B (nº inventario 256) aparecieron diversos restos humanos, en concreto dos fragmentos de parietal,

un canino de leche, un molar inferior de leche y tres premolares probablemente inferiores. Por el desgaste diferencial de la corona dentaria puede deducirse la existencia de dos individuos adultos y otro infantil.

El material fue entregado para su identificación taxonómica y su análisis de DNA por la profesora M.D. Asquerino en 2000 al objeto de utilizar el material y los datos dentro de dos tesis doctorales que veníamos realizando dos autores (EFD y MCS).

Dos de estas piezas dentales, nombradas como 1PI y 2PI fueron seleccionadas en función de su aparente buen estado de preservación.

El proceso experimental empleado fue el siguiente:

a) Limpieza y trituración de las muestras

Las muestras se limpiaron en superficie mediante óxido de aluminio a presión con una "arenadora" *Sand-blaster Dentalfarm*, modelo Base 1 Plus, con el fin de eliminar la capa más externa, y con ella parte de la suciedad procedente del enterramiento y posibles moléculas de ADN contaminante.

Una vez realizada la limpieza, se irradiaron con luz ultravioleta (UV) durante 30 minutos en el interior de una campana de flujo laminar. La luz ultravioleta destruye el ADN que haya podido ser introducido durante la fase de limpieza y otros ADNs contaminantes que hayan sobrevivido a dicha fase.

Las muestras limpias fueron trituradas en un molino refrigerado con nitrógeno líquido.

b) Extracción del material genético

El polvo de hueso resultante de la trituración fue lavado varias veces con EDTA 0.5M para eliminar el calcio y posteriormente incubado toda la noche en solución de lisis con proteinasa K, para digerir las proteínas y liberar el ADN.

La extracción del ADN total se realizó mediante un protocolo estándar Fenol/Cloroformo y se concentró con micro-concentradores Centriplus-30000 (*Millipore*).

Los extractos de ADN obtenidos fueron guardados en un arcón a -25°C hasta su procesado.

c) Amplificación del ADN mitocondrial

La región objeto de estudio corresponde a un fragmento de 244 pares de bases editadas de la Región Hipervariable I (HVRI) del ADN mitocondrial (posiciones 16126-16369). Esta región fue seleccionada y copiada en dos amplificaciones solapantes mediante la reacción en cadena de la polimerasa (*PCR*) usando cebadores específicos que proporcionaban dos productos de amplificación de 133 y 112 pares de bases.

Los productos de amplificación fueron purificados y secuenciados en un secuenciador automático (ABI-PRISM 377). Las secuencias así obtenidas se compararon con la secuencia consenso de Cambridge (*CRS*) (Anderson *et al.*, 1981), a la que se hace referencia a la hora de determinar el haplotipo.

d) Precauciones durante el análisis

Una de las principales limitaciones de los estudios de ADN antiguo es la contaminación con ADN exógeno durante el proceso de manipulación de las muestras, generalmente procedente del investigador pero también del ADN que, en forma de aerosoles, flota en todo ambiente.

Para reducir al máximo la probabilidad de contaminación, tanto la extracción como la amplificación se realizaron en una sala aislada de uso exclusivo para este fin, en el interior de una campana de flujo laminar, usando para ello material

estéril. Durante la manipulación de la muestra se emplearon guantes de laboratorio, bata y mascarilla. Se introdujeron “controles” en las dos fases de manipulación de la muestra más susceptibles de contaminación, las de extracción y amplificación, consistentes en reacciones que tan sólo contenían los reactivos necesarios para el proceso. Adicionalmente, las muestras fueron procesadas junto con otras dos “muestras control” de secuencia conocida, lo que permite verificar, una vez completado el proceso, la existencia de contaminación total o parcial, lo cual invalidaría todos los resultados obtenidos en las muestras restantes.

El total de secuencias obtenidas fue, finalmente, comparado con las secuencias de la misma región correspondientes a los investigadores directamente involucrados en la manipulación de las muestras.

e) Cuantificación del ADN mitocondrial

Antes de proceder a su amplificación resulta de gran interés realizar una cuantificación específica del material genético que se desea amplificar, al objeto de determinar las probabilidades de éxito en la obtención de información genética de un determinado conjunto de muestras.

El material genético extraído de restos fósiles, además de ser escaso, está muy fragmentado, lo que hace imposible en la mayor parte de los casos la recuperación de fragmentos de ADN de tamaño superior a 300 pares de bases.

Por otra parte, existe la posibilidad de que el ADN original presente modificaciones *post-mortem* (*miscoding lesions*) (Gilbert *et al.*, 2003). Si esto sucede y el número de cadenas es reducido, existirá una elevada probabilidad de que este “daño molecular” sea reproducido por la PCR dada su elevada sensibilidad. Se considera que por debajo de 1.000 moléculas de ADN originales la probabilidad de error es muy elevada, y los resultados del análisis no son reproducibles (Handt *et al.*, 1996).

En el presente estudio se cuantificó el ADN presente en los extractos mediante PCR a tiempo real (*Real Time PCR*). La ventaja de este método de cuantificación sobre otros es que permite estimar específicamente el número de moléculas de ADN que existen de la región que se desea estudiar. Los ensayos se realizaron de acuerdo a lo descrito en Fernández (2005).

f) Inhibición

Antes de la amplificación de secuencias específicas de ADNmt se realizó una prueba sencilla para detectar la presencia de moléculas inhibitoras de la reacción de amplificación y estimar por tanto las posibilidades de éxito de los análisis posteriores.

Para ello se prepararon reacciones de PCR de 25µl de volumen final con 100ng de ADN fresco a las que se añadieron tres volúmenes diferentes de cada uno de los extractos de ADN antiguo (5µl, 2'5µl y 1µl).

El conjunto se amplificó con cebadores específicos de la HVRI del ADNmt.

Los resultados se visualizaron en geles de agarosa al 2%, interpretándose la ausencia o disminución de la intensidad de la banda de amplificación como signo de la presencia de inhibición para dicha cantidad y extracto de ADN antiguo.

g) Clonación

Los productos de amplificación se clonaron en plásmidos bacterianos (moléculas circulares de DNA bicatenario de pequeño tamaño que tienen la capacidad de auto-re-

plicarse mediante los enzimas y proteínas codificados por su huésped bacteriano) con la finalidad de detectar errores en las secuencias producidos por contaminaciones traza, daño molecular producido post-mortem y errores producidos por la taq-polimerasa. La clonación se realizó con el sistema pGEM®-T Easy Vector System II (Promega) tal y como se describe detalladamente en Fernández, 2005.

Todo este proceso se llevó a cabo en el Instituto de Biología Molecular del C.S.I.C. en Barcelona.

3. RESULTADOS

Se obtuvieron un total de dos secuencias de ADN mitocondrial de dos individuos del yacimiento de El Pirulejo (1PI, 2PI).

Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 2, junto a la secuencia de referencia de Cambridge (*CRS*) (Anderson *et al.*, 1981). En la tabla se incluyen también las secuencias de Neandertal publicadas hasta la fecha (Kriings *et al.*, 1997, 2000; Ovchinnikov *et al.*, 2000; Schmitz *et al.*, 2002; Serre *et al.*, 2004; Lalueza-Fox *et al.*, 2005, 2006; Beauval *et al.*, 2005; Orlando *et al.*, 2006; Caramelli *et al.*, 2006; Krause *et al.*, 2007) junto con dos secuencias de dos individuos de Cro-Magnon (Caramelli *et al.*, 2003).

Se han representado solamente aquellas posiciones que difieren entre los individuos analizados. Los casos de coincidencia con la secuencia consenso se indican mediante un punto, y los cambios o mutaciones con la inicial de la base nitrogenada correspondiente (A, T, C ó G).

En el análisis de las secuencias de El Pirulejo se aplicó un criterio restrictivo, descartándose aquellas mutaciones ambiguas o dudosas posiblemente originadas por la *Taq* polimerasa durante el proceso de replicación y copia del ADN. De esta manera se representan en la Tabla 1 únicamente aquellos cambios que han sido confirmados en ambas cadenas.

4. AUTENTICIDAD DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

Los blancos de extracción y amplificación fueron negativos en todos los casos, lo que permite descartar la introducción de ADN exógeno durante estas fases de análisis. Por otra parte, las secuencias de los dos individuos antiguos usados como control interno (aborígenes de la Tierra del Fuego), de secuencia conocida *a priori* (datos no incluidos), fueron las esperadas.

La secuencia obtenida para el individuo 2PI coincide con la del investigador responsable de su análisis. Sin embargo, dado que se trata del haplotipo mayoritario en Europa y que los controles de extracción y amplificación resultaron negativos, la mera coincidencia con la secuencia de uno de los investigadores no es criterio suficiente para dudar de su autenticidad.

La cuantificación de secuencias específicas de ADNmt por *Real Time PCR* produjo resultados únicamente en la muestra 2PI. El número de copias de ADN en el extracto fue superior al millar, lo que permite descartar la incidencia de daño molecular en la secuencia final.

Por su parte, el extracto de 1PI no pudo ser cuantificado probablemente debido a la existencia de inhibición a la cantidad de 5µl, que es precisamente la cantidad empleada en los ensayos de cuantificación (ver Tabla 1).

La clonación bacteriana de los productos de amplificación permitió eliminar ciertas ambigüedades de las secuencias obtenidas de forma directa

Yacimiento	Individuo	Muestra	Réplica 1	Réplica 2	Media	SD	Nº copias extracto	Nº copias/mg hueso	Inhibición		
									5µl	3µl	1.5µl
El Pirulejo	1PI	1PI	NO	NO	NO	NO	NO	NO	+	P	-
El Pirulejo	2PI	2PI	5.64 x10 ⁴	5.77 x10 ⁴	5.70 x10 ⁴	9.52 x10 ²	1.14 x10 ⁶	1.48 x10 ³			

Tabla 1

Resultados de cuantificación obtenidos en las muestras analizadas. Se cuantificó cada extracto por duplicado en la misma reacción (réplicas 1 y 2). Se estimó el nº copias por extracto y por mg de hueso. Media: media aritmética de las dos réplicas. SD: Desviación estándar. NO: Resultado negativo de cuantificación. +: Resultado positivo de inhibición. -: Resultado negativo de inhibición.

5. IMPLICACIONES POBLACIONALES DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

Las dos secuencias magdalenienses de El Pirulejo son muy diferentes entre sí. El individuo 2PI coincide con la secuencia consenso, la más representada en Europa en la actualidad. Esta secuencia coincide con una de las secuencias de Cro-Magnon del estudio de Caramelli *et al.*, 2003 (Paglici-25).

En cambio, el individuo 1PI se caracteriza por la presencia de tres sustituciones confirmadas en ambas cadenas de ADN (A→C 16182, A→C 16183 y T→C 16189). Este haplotipo aparece representado tan sólo en un individuo de las 5 bases de datos de secuencias actuales de ADNmt de todo el mundo: EMPOP (5.173 individuos), mtDB (*Human mitochondrial Genome Database*, 116 individuos), *Mitochondrial ADN Concordance* (1.440 secuencias), *mtADN Population Database* (FBI, 4.294 perfiles) y base de datos interna (Fernández, 2005, 2.815 individuos).

En la base de datos EMPOP, el perfil genético del individuo 1PI se localiza tan sólo en un individuo de Macedonia. Adicionalmente, en esta misma base de datos pudieron encontrarse secuencias similares (sin la sustitución 16182C) en 11 individuos del Norte de Europa (5 del Tirolo, 3 de Alemania y 3 de Finlandia). Esta misma variante aparece también en 7 individuos de la base de datos interna (2 de Austria, 2 de Francia, 2 de Finlandia y 1 en el grupo Karelio de Rusia).

6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El presente estudio demuestra que la recuperación, amplificación y secuenciación de ADN de restos de época paleolítica son posibles.

El punto de partida usual para analizar el significado de las secuencias antiguas es el panorama genético actual. Este, sin embargo, no tiene por qué ser considerado representativo del pasado más que para ejemplos muy limitados geográficamente, como puede ser el caso del poblamiento de Polinesia. Sabemos, por fuentes distintas a la Genética, que las actuales poblaciones humanas son una mezcla "reciente" de colectivos muy heterogéneos por migración, y no por diferenciación "in situ".

Como ya se ha comentado antes, una de las secuencias de El Pirulejo, 2PI, coincide con la secuencia consenso y con la secuencia de uno de los individuos de Cro-Magnon estudiados por Caramelli *et al.* (2003), Paglici-25.

La secuencia de 1PI, caracterizada por la combinación de mutaciones A→C 16182, A→C 16183 y T→C 16189, parece ser una condición muy poco frecuente en la huma-

nidad actual y no coincide con las restantes secuencias paleolíticas.

De acuerdo con la caracterización genética de otras regiones del ADN mitocondrial, Paglici-12 pertenecería al haplogrupo N* y Paglici-25 al haplogrupo HV ó pre-HV. Estos haplogrupos son poco frecuentes en las poblaciones Europeas actuales, pero se observan en elevada frecuencia en la región de Próximo Oriente. Dado que en el presente análisis no se ha obtenido información genética de otras regiones del ADNmt no resulta posible asignar haplogrupo a las muestras estudiadas de El Pirulejo. Sin embargo, la coincidencia de 2PI a nivel de la HVRI con Paglici-25 y la identidad de la secuencia de 1PI con un individuo de Macedonia parecen sugerir que también podrían tener un origen en la región de Próximo Oriente. Tal y como exponen Caramelli *et al.* (2003) en su trabajo, la existencia de afinidades genéticas entre los primeros europeos modernos y las poblaciones actuales de Próximo Oriente es totalmente coherente, dado que esta región fue zona de paso obligado durante las expansiones humanas del Paleolítico en Europa.

Por otra parte, puede apreciarse en la Tabla 2 que las citadas secuencias difieren sobremanera de las secuencias de neandertales estudiadas hasta la fecha. Así, aunque las tres posiciones mutadas de 1PI están presentes también en 6 de las 9 secuencias neandertales completas, ello no implica que haya existido una contribución genética neandertal sobre el *pool* genético de los humanos anatómicamente modernos. Si así hubiera sido se detectaría la secuencia completa del neandertal debido a que el ADN mitocondrial se transmite como una unidad. La presencia de estas tres mutaciones en ambos es probablemente resultado de una herencia común de gran profundidad temporal.

En conclusión, aunque sería necesario analizar un mayor número de secuencias de época paleolítica, para descartar definitivamente el aporte neandertal al acervo genético humano actual, los resultados obtenidos hasta la fecha sugieren que este aporte no se produjo o que si se produjo fue poco significativo.

Bases de datos empleadas:

- EMPOP: *Walther Parson. Institute of Legal Medicine, Innsbruck Medical University.* <http://www.empop-org/>
- MtDB: *Human mitochondrial Genome Database. Max Ingman. Molecular Anthropology. Section of Medical Genetics. Department of Genetics and Pathology. Uppsala University.* <http://www.genpat.uu.se/mtDB/>
- Mitochondrial DNA Concordance.* Miller y Dawson 1997, 1998. *Cambridge University.* <http://www.bio-anth.cam.ac.uk/mtDNA/>
- The mtDNA Population Database: An Integrated Software and Database Resource for Forensic Comparison.*

