

## SECUENCIACION DE DNA ANTIGUO DE RESTOS HUMANOS DEL PAIS VASCO

Lalueza, C. (1),  
Pérez-Pérez, A. (1),  
Prats, E. (2),  
Arenal, I. (3),  
Valdés, L. (1),  
Moreno, P. (1) y  
Turbón, D. (1)

### RESUMEN

Se ha recuperado DNA mitocondrial (región 1 del D-loop) de tres individuos procedentes del yacimiento vasco de época alto-medieval de Alto de la Ermita (Amézaga, Araba), mediante la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Los dientes se han mostrado como un excelente sistema de protección del material hereditario. El estudio del DNA de poblaciones antiguas presenta numerosos problemas técnicos debido al alto grado de degradación del DNA, la inhibición de la amplificación y la posibilidad de contaminación de las muestras. Sin embargo, el DNA *antiguo* proporciona información genética directa de las poblaciones del pasado, y puede ser útil para establecer relaciones de afinidad de estas poblaciones con los grupos humanos actuales. Hasta el momento, se han obtenido las secuencias de una zona de DNA de 228 bp, correspondientes a dos de los individuos estudiados. La información que proporcionan estas secuencias, sin embargo, no podrá ser valorada adecuadamente hasta que no se disponga de más datos de DNA de poblaciones vascas actuales y pasadas.

### SUMMARY

Mitochondrial DNA (region 1 of the D-loop) of three medieval individuals from the Alto de la Ermita site (Amézaga, Araba) has been successfully extracted and amplified by the PCR technique (polymerase chain reaction). Teeth has been used as a source for genetic material, proving to be an adequate material for DNA preservation. The study of ancient DNA presents numerous technical problems due to the extreme degree of degradation of the DNA, to the inhibition of the amplification and to the possibility of contaminating the samples. Nevertheless, the ancient DNA yields direct genetic information of the past populations, and can be useful to establish relationships between these populations and the present human groups. At this moment, a region of 228 bp has been sequenced in two of the studied individuals. However, this information can not be adequately assessed until more DNA data from the past and present Basque populations were available.

### LABURPENA

Goi erdi aroko "Alto de la Ermita" (Amézaga, Araba) deritzon aztarnategiko hezurrei PCR teknika aplicatu ondoren ADN mitokondrial (D- looperen lehen aldean) berrezkuratu da, aldiberean hiru gizakien informazio genetikoak lortuz.

- (1) Secc. Antropología, Dept. Biología Animal. Fac. de Biología, Universidad de Barcelona. Avda. Diagonal 645, 08028 Barcelona.
- (2) Dept. Biología Molecular y Celular. Centro de Investigación y Desarrollo de Barcelona. C.S.I.C.
- (3) Dept. Genética y Biología Animal. Fac. Ciencias. Universidad de Lejona

## INTRODUCCION

La posibilidad de extraer DNA de restos óseos procedentes de material arqueológico ha abierto en los últimos años un nuevo campo de investigación, permitiendo la integración de diversas ramas del estudio del hombre, como la antropología, la genética, la arqueología o la paleopatología, en el desarrollo de una nueva disciplina, que algunos autores han llamado *arqueología molecular*, *paleontología molecular* o *paleogenética*.

El estudio del DNA antiguo o DNA "fósil" ("ancient DNA"), definido en el primer congreso sobre esta disciplina que se celebró del 8 al 10 julio de 1991 en Nottingham, como "la recuperación y estudio de secuencias de DNA obtenidas a partir de material arqueológico o especímenes de museo", confiere a los estudios de DNA realizados a partir de muestras actuales una dimensión temporal de la que forzosamente carecían hasta ahora. Este nuevo campo de estudio puede contribuir a ampliar nuestros conocimientos sobre los cambios genéticos asociados a migraciones del pasado y a caracterizar genéticamente grupos humanos ya desaparecidos. En el plano teórico, sus posibilidades son enormes, como la identificación específica de restos humanos de tamaño pequeño que de otra forma sería difícil clasificar, determinación del sexo (mediante una sonda del cromosoma Y), detección de parentesco entre individuos de una misma necrópolis (mediante microsatélites) o detección de enfermedades del pasado, tanto infecciosas como genéticas. Sin embargo, una de las limitaciones de este tipo de estudio es el estado de conservación del material genético en restos antiguos, que parece depender no sólo de su antigüedad sino también de las condiciones de preservación de éstos.

Los primeros estudios de DNA antiguo se orientaron hacia los tejidos momificados, que parecían ser más prometedores, por lo que respecta a la preservación del DNA, que los restos óseos. El verdadero inicio de la disciplina del estudio del DNA antiguo puede situarse en 1984, con la recuperación de DNA del tejido de un tipo de équido extinguido, el quagga (HIGUCHI et al., 1984). Por otra parte, en el mismo año, Pääbo (1984; 1985a; 1985b), recuperó DNA de momias egipcias de unos 2500 años de antigüedad. Más tarde, en 1988, Pääbo fue el primer investigador que aplicó la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), técnica que ha revolucionado la genética molecular, al estudio del DNA antiguo (ROSS, 1992).

Los restos de mayor antigüedad que se han analizado con éxito son, por una parte, una hoja fósil de magnolia, de 17-20 millones de años de antigüedad, que se hallaba en unas condiciones de conservación excepcionales (GOLENBERG et al., 1990; GOLENBERG, 1991) y, por otra parte, insectos conservados en ámbar, de 25-30 millones de años (DeSALLE et al., 1992; ver también MORELL, 1992).

No fue hasta 1989 cuando se recuperó DNA directamente a partir de restos óseos, lo cual fue llevado a cabo independientemente por dos equipos (HAGELBERG et al., 1989; HORAI et al., 1989). En 1990, se añadieron los trabajos de tres equipos más (HÄNNI et al., 1990; WILLIAMS et al.,

1990, THUESEN and ENGBERG, 1990). Las primeras reacciones en el campo científico fueron de escepticismo en algunos investigadores, especialmente aquellos que habían orientado sus estudios hacia el DNA in vivo. En 1991, HAGELBERG et al. (1991 a), identificaron los restos esqueléticos de una joven de 15 años asesinada en 1981, a partir del DNA extraído de los huesos. Fue la primera vez que la justicia británica aceptó como prueba en un tribunal los resultados de una investigación basada en DNA antiguo, lo que indica la creciente aceptación de la fiabilidad de la técnica a nivel oficial. El mismo planteamiento sirvió posteriormente para identificar los restos de Josef Mengele (el *ángel de la muerte* de Auschwitz) (JEFFREYS et al. 1992).

En España varios trabajos preliminares sobre DNA antiguo han sido presentados en congresos internacionales (ESTIVILL et al., 1991; PÉREZ-PÉREZ et al., 1992) o nacionales (MARTÍNEZ de PANCORBO et al., 1992) y en una revista especializada en DNA antiguo (PÉREZ-PÉREZ, 1992). El presente estudio ofrece las primeras secuencias obtenidas a partir de material arqueológico de la Península Ibérica y, particularmente, del País Vasco, donde los estudios paleogenéticos pueden contribuir al conocimiento de la antigüedad y el origen de las particularidades biológicas de las poblaciones vascas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

El yacimiento de la necrópolis del Alto de la Ermita se encuentra situado en la Llanada Oriental Alavesa, en las afueras del pueblo de Amézaga, en una zona próxima al antiguo Camino de Santiago. Entre el lugar donde se encuentra el yacimiento y el Camino de Santiago se hallaban dos hospitales de peregrinos, uno en Salvatierra y otro en Galarreta, cuya existencia junto con otros cementerios asociados a diferentes ermitas de la zona, es indicativa de su utilización por la población local. El funcionamiento de la ermita de Amézaga sería probablemente similar al de otras de la zona, con cementerios de poca extensión y gran densidad de enterramientos que se dejaron de utilizar anteriormente al siglo XVIII, en favor de cementerios nuevos dependientes de los pueblos próximos. A partir del siglo XVIII las ermitas, incluida la de Amézaga, fueron remodeladas por motivos de culto ampliándose por su lado oeste, lo cual supuso la destrucción de los enterramientos adosados al muro del antiguo edificio. En cuanto a la cronología del cementerio se ha realizado en la Universidad de Uppsala un análisis de  $C_{14}$  sobre 2 individuos: el AZ94003; Va-4120:  $1.070 \pm 70$  BP y el AZ85004; Va-4121:  $860 \pm 70$  BP, lo que permite situar el uso de este cementerio del s. IX al XII, en un período anterior a las remodelaciones de la ermita hechas entre los siglos XIII al XVI.

Para el estudio del DNA se seleccionaron diversos individuos del yacimiento de Amézaga, de los que tres proporcionaron resultados positivos. De cada uno de los ellos se tomaron dos muestras: un diente y un fragmento de hueso. La muestra estudiada fue la siguiente:

INDIVIDUO	MUESTRA	SEXO	EDAD
<b>94003 a</b>	M <sub>2</sub> i	♀	Adulto
<b>94003 b</b>	Peroné (epifisis distal)		
<b>85004 a</b>	Pm <sub>3</sub> i	♀	Adulto
<b>85004 b</b>	Metatarso (entero)		
<b>67003 a</b>	C <sub>1</sub> i	♀	Maduro
<b>67003 b</b>	Tibia (diáfisis)		

Las muestras de hueso se obtuvieron realizando dos cortes cruzados formando un ángulo de unos 90°, realizados con una sierra de marquetería esterilizada. Posteriormente, la capa superficial del fragmento de hueso ( $\pm 1$  mm) se eliminó con ayuda de una broca de dentista. La muestra (aproximadamente 1 gramo) se pulverizó después con un molino refrigerado por nitrógeno líquido con un impactador electromagnético (Freezer Mill Spex 6700), para evitar que el calor dañara el DNA, hasta obtener un polvo muy fino, semejante a la harina. La muestra se lavó sucesivas veces con EDTA (0.5 M, pH 8.0), desechándose los sobrenadantes. A continuación, se incubó la muestra en agitación a 37° C durante 12 horas en 10 ml de solución de lisis (EDTA 0.5 M pH 8.0-8.5, Tris 50 mM, SDS 0.5 % y Proteinasa K 50  $\mu$ g/ml), y se centrifugó, conservando el sobrenadante. La extracción del DNA se realizó mediante fenol/cloroformo (3 extracciones sucesivas: fenol, fenol/cloroformo (1:1), cloroformo) siguiendo el protocolo de SAMBROOK *et al.* (1989). El componente proteico de la muestra se desnaturaliza o deviene insoluble, mientras que los ácidos nucleicos quedan en solución en la fase acuosa. Después se concentró la muestra mediante diálisis por centrifugación con Centricon-30 (Amicon), resuspendiéndola en 300  $\mu$ l y conservándola a -20° C.

La amplificación se llevó a cabo con un bloque termostático de ciclos (Perkin-Elmer Cetus: modelo PCR Thermal Cycler). Se programaron 35 ciclos de PCR (desnaturalización a 94° C durante 1 minuto, reasociación a 55° C durante 1 minuto y extensión a 72° C también durante 1 minuto). El protocolo de amplificación utilizado es estándar (HAGELBERG *et al.*, 1989; PÄÄBO, 1990; GINTHER *et al.*, 1992) con algunas modificaciones. Se hicieron reacciones generales de 300  $\mu$ l, alicuotadas en reacciones de 25  $\mu$ l por muestra, con los siguientes componentes: Tampón 1x, Tris-HCl 20 mM pH 8.0, dNTP's 200  $\mu$ M, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, BSA 2-20  $\mu$ g/ml, cebadores 200 pmoles/100  $\mu$ l, Taq DNA Polimerasa (Cetus) 5 u/100  $\mu$ l de reacción. Junto a las muestras con DNA, se añadieron siempre dos blancos de control, uno obtenido durante el proceso de lisis y extracción, y otro utilizando sólo los reactivos del PCR. Estos blancos se utilizaron como controles de contaminación por parte de DNA exógeno, y sólo se dio el visto bueno al estudio cuando salieron negativos. Los cebadores utilizados fueron el D2 (equivalente al D6 de HIGUCHI *et al.*, 1988 y al H16401 de VIGILANT *et al.*, (1989) y el D18, (HIGUCHI *et al.*, 1988). El segmento determinado por estos cebadores tiene una longitud de 228 bp, y se localiza en la región 1 del D-loop.

A continuación se realizó un PCR asimétrico, con un volumen de 200  $\mu$ l por cada muestra, usando los mismos componentes de la primera amplificación, pero con un solo ceba-

dor (D2) y sin BSA. De esta forma, se obtuvo un DNA de cadena sencilla que se purificó separándolo de los nucleótidos y cebadores no incorporados, mediante los mismos Centricones-30 (también se pueden utilizar columnas de resina tipo Magic-Preps de Promega). Para la secuenciación del DNA la muestra se precipitó con acetato amónico y etanol y se resuspendió en 7  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O. La secuenciación se llevó a cabo siguiendo el método de SANGER *et al.* (1977), utilizando el sistema de Sequenasa (USB), con S<sup>35</sup>-dATP como nucleótido radiactivo. Las secuencias se resolvieron en geles de poliácridamida al 6%, en 7 M urea y 1x TBE, a 100 W, 1900-2000 V y unos 55° C, durante aproximadamente 1.5 horas. El gel se fijó con 10% de ácido acético y 10% de metanol en agitación, y se secó en la estufa a 80° C, durante 2 horas. La autorradiografía se realizó sobre un film Kodak (X-OMAT AR) durante 16-72 horas.

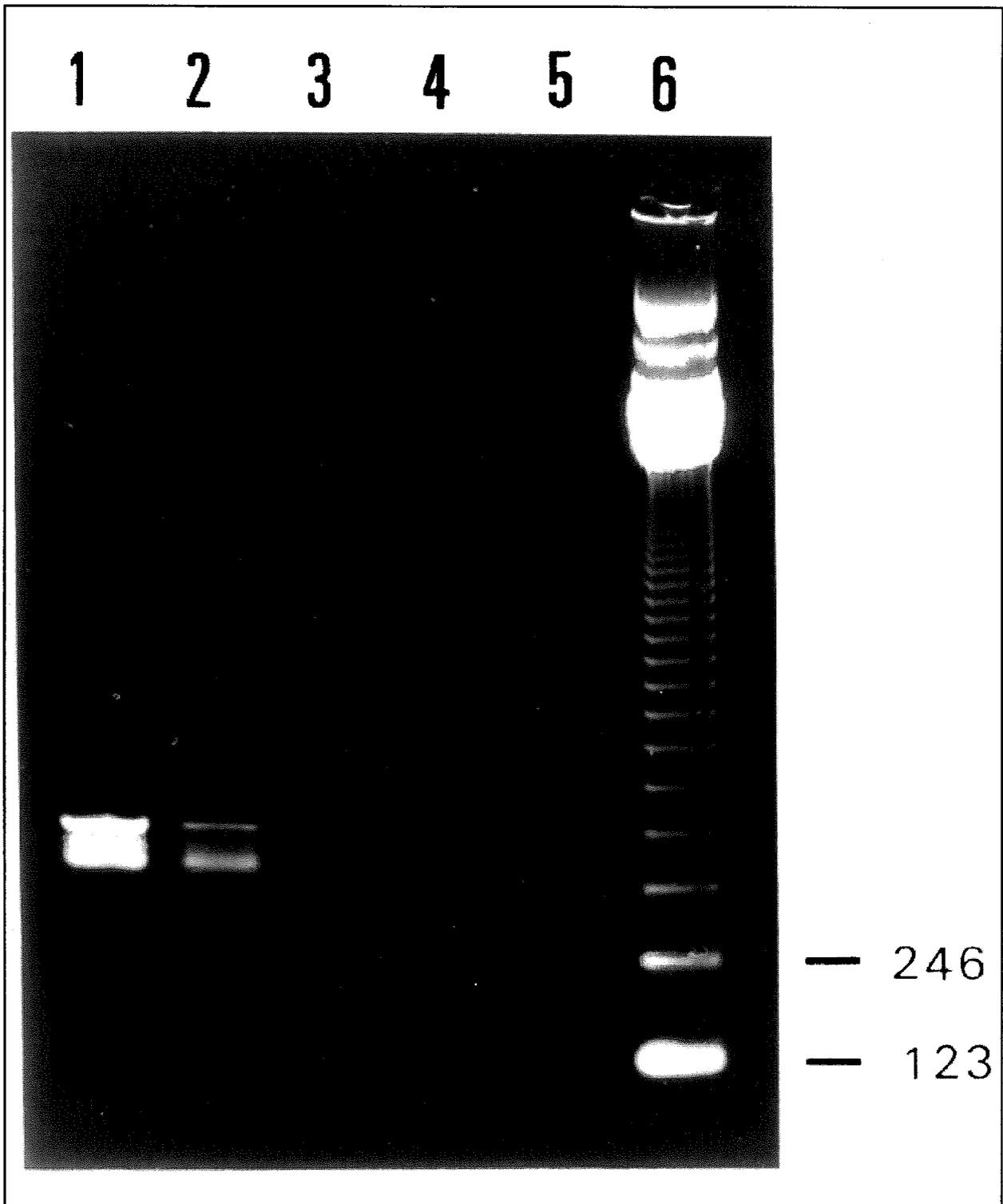
## RESULTADOS

En la Figura 1 se muestra la capacidad inhibitora de la amplificación por parte de alícuotas de extracto de DNA antiguo. Se ha amplificado un segmento de 500 pb de una región del genoma del bacteriófago  $\lambda$  siguiendo las condiciones estándar especificadas por Perkin-Elmer, Cetus. A cada muestra del fago se le añadió una alícuota creciente de DNA antiguo (0.2  $\mu$ l, 0.4  $\mu$ l y 0.8  $\mu$ l). Puede observarse cómo con 0.2  $\mu$ l de DNA antiguo, la amplificación es menos eficiente que en la muestra que sólo presenta DNA del fago, mientras que con sólo 0.4  $\mu$ l, la inhibición ya es total.

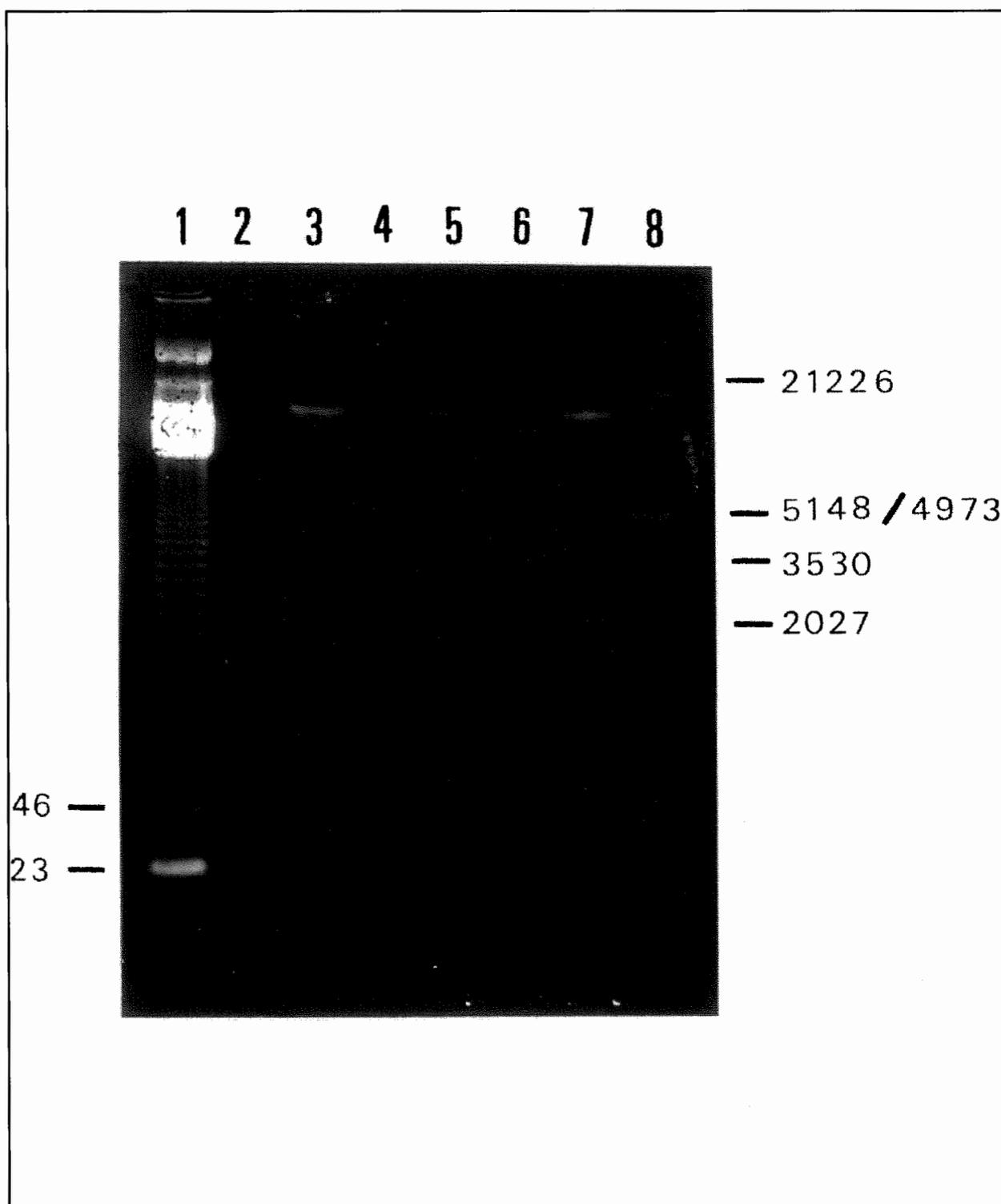
En la Figura 2 se muestra un gel de agarosa 1% con seis de las muestras (**94003 a y b**, **85004 a y b**, **67003 a y b**) antes de la amplificación. Puede observarse cómo las muestras de hueso presentan una gran cantidad de DNA, generalmente de elevado peso molecular, muy probablemente de origen microbiano. En cambio, las muestras de dientes aparecen muy limpias, con excepción de la muestra **67003 a**, que presenta un ligero *smear* y que fue la única que necesitó BSA para ser amplificada.

En la Figura 3 se presentan los resultados de la amplificación de seis de las muestras analizadas (**94003 a y b**, **85004 a y b**, y **67003 a y b**). Puede observarse cómo sólo en los tres dientes se ha formado una débil banda del tamaño esperado (228 bp). Las dos primeras muestras de dientes pudieron expresarse directamente sin necesidad de BSA. En las dos últimas fue necesaria una reamplificación antes de llevar a cabo el PCR asimétrico. Las bandas inferiores corresponden a los cebadores, mientras que las bandas intermedias son debidas a dímeros de cebador (*primer-dimers*). Estos artefactos se forman por la unión de ambos cebadores cuando el DNA molde es especialmente escaso o de pobre calidad (PÄÄBO, 1990). No llegan a impedir su amplificación, aunque la eficiencia de la reacción es inferior a la esperada. Por otra parte, puede observarse cómo los dos blancos (blanco de extracción y blanco de PCR) están limpios y por tanto indican que no existe contaminación.

En la Figura 4 se muestran las secuencias de las dos muestras de DNA antiguo (**94003 a y 85004 a**) y de una



**Figura 1:** Estimación de la capacidad de inhibición del DNA antiguo. A la amplificación estándar de una región de 500 bp del bacteriófago  $\lambda$  (*cebador* 1: nucleótidos 7131-7155, *cebador* 2: nucleótidos 7606-7630), siguiendo las recomendaciones de Perkin-Elmer Cetus, se han añadido cantidades crecientes de la muestra **94003 b** de DNA antiguo. 1: Bacteriófago  $\lambda$  sin DNA antiguo, 2: + 0.2  $\mu$ l de DNA antiguo, 3: + 0.4  $\mu$ l de DNA antiguo, 4: + 0.8  $\mu$ l de DNA antiguo. 5: Blanco de PCR, 6: Marcador de Peso Molecular (múltiplos de 123 bp, BRL).



**Figura 2:** Análisis de extracción (*Sizing*) de tres de las muestras estudiadas de Amézaga, realizado en un gel de agarosa al 1 %, teñido con Bromuro de Etidio y observado con luz UV. Se puede observar cómo las muestras de hueso que no se amplificaron muestran una mayor cantidad de DNA, presumiblemente debido a contaminaciones microbianas y fúngicas. 1: Marcador (múltiplos de 123 bp), 2: 94003 a (diente), 3: 94003 b (hueso), 4: 85004 a (diente), 5: 85004 b (hueso), 6: 67003 a (diente), 7: 67003 b (hueso), 8: marcador de peso molecular  $\lambda$  HindIII/EcoRI. (de mayor a menor 21226bp, 5148/4973bp, 3530bp, 2027bp).

muestra de DNA actual, cuya secuencia coincide con la de ANDERSON *et al.* (1981).

## DISCUSION

El DNA de restos antiguos presenta numerosos problemas para su amplificación, ya que se encuentra oxidado (especialmente las pirimidinas) (PÄÄBO, 1989) y notablemente fragmentado (PÄÄBO, 1985 a; HAGELBERG *et al.*, 1989; HÄNNI *et al.*, 1990), lo que puede favorecer la aparición de artefactos, como los *primer-dimers* (SAMBROOK *et al.*, 1989), y el efecto *jumping PCR* (PÄÄBO *et al.*, 1989; PÄÄBO, 1990). Pero el principal problema proviene de la presencia de ácidos húmicos del suelo en las muestras, que inhiben total o parcialmente la amplificación. Para intentar eliminar en parte esta inhibición, se añade BSA (seroalbúmina bovina) a los componentes habituales del PCR (PÄÄBO *et al.*, 1988; HAGELBERG *et al.*, 1989), y que actúa como estabilizante de la reacción. Una estrategia alternativa consiste en diluir progresivamente la muestra, aunque hay que llegar a un compromiso entre la dilución del escaso DNA presente y la de los inhibidores (PÄÄBO, 1990). Sin embargo, en determinadas muestras no llegó a conseguirse la amplificación, ni siquiera añadiendo BSA, especialmente en aquéllas que presentaban una coloración marronosa, descrita en estudios anteriores de DNA *antiguo* y que cabe atribuir a una importante presencia de ácidos húmicos. Al tratarse de una técnica tan compleja y costosa, puede resultar más rentable eliminar estas muestras y centrar los esfuerzos en las que sean incoloras de entrada.

La capacidad de inhibición de la amplificación del DNA antiguo varía, pues, de una muestra a otra, dependiendo probablemente de la cantidad de ácidos húmicos de ésta y por tanto, de las condiciones de enterramiento y de la propia naturaleza de la muestra. Los dientes y las diáfisis de los huesos largos, especialmente el tercio medio del córtex (HAGELBERG *et al.*, 1991), parecen ser el tipo de muestra más adecuado para obtener DNA. El tejido esponjoso de los huesos, que ha estado sometido a abundantes lavados y que ha permitido la infiltración de ácidos húmicos del suelo, se revela como muy poco adecuado en este tipo de estudios. Las condiciones de enterramiento parecen ser factores más importantes en la conservación del DNA de los huesos que no la propia antigüedad de éstos, al menos dentro de unos límites temporales razonables, que sin embargo todavía no están bien establecidos.

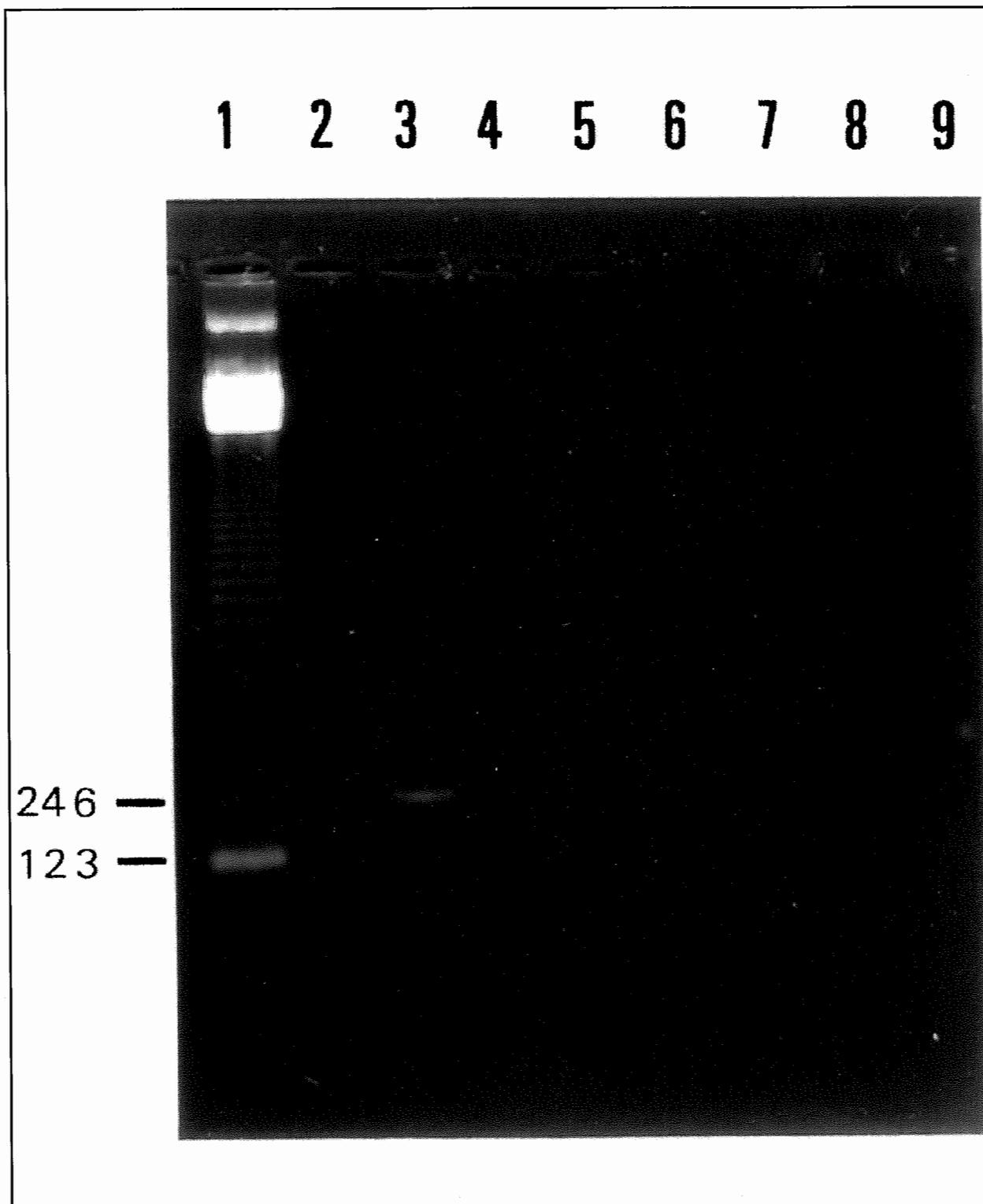
La contaminación es otro de los grandes problemas de los estudios de DNA *antiguo*, ya que la baja calidad del DNA presente y la poca cantidad en que se encuentra en las muestras hace que se esté trabajando en los límites de sensibilidad de la técnica de PCR, lo que favorece la aparición de falsos positivos. La contaminación provocada por el fenómeno del carry-over (contaminación de reactivos por productos de amplificaciones anteriores) parece ser la más importante (IVINSON and TAYLOR 1991), y probablemente, la más cara, difícil y compleja de combatir. La contaminación mediante aerosoles puede ser importante, especialmente referida a las superficies de trabajo en el laboratorio, a las pipetas, a las microcentrifugas, a los reactivos y al propio aparato de PCR

(PRINCE and ANDRUS 1992). También la descamación de las células epidérmicas del propio investigador parece que puede provocar contaminación en el PCR (KITCHIN *et al.* 1990). Sin embargo, la contaminación puede evitarse o eliminarse mediante una estricta metodología de laboratorio (SAMBROOK *et al.* 1989), esterilización del material, uso de radiaciones ultravioletas (SARKAR and SOMMER 1991), alcuotado de los reactivos, separación física de las fases de pre y post PCR, cambio frecuente de guantes, empleo de mascarilla, etc), y puede comprobarse su ausencia mediante el uso de controles. En todos los procesos de obtención de muestras, es recomendable disponer siempre de un blanco de extracción y un blanco de PCR. Por otra parte, las muestras obtenidas a partir de yacimientos arqueológicos, pueden estar contaminadas por haber sido manipuladas sin precaución durante la excavación o el almacenamiento posterior, básicamente debido a la descamación de las células epidérmicas. Aunque este problema se puede solventar con la eliminación de la capa superficial de las muestras de hueso, es igualmente recomendable seguir una serie de normas durante la excavación. Es aconsejable seleccionar previamente un hueso del esqueleto para estudios de DNA antiguo, que será desenterrado con guantes, se guardará en bolsas estériles, no se lavará con agua y se dejará secar en un sitio seco y poco concurrido (BROWN and BROWN, 1992).

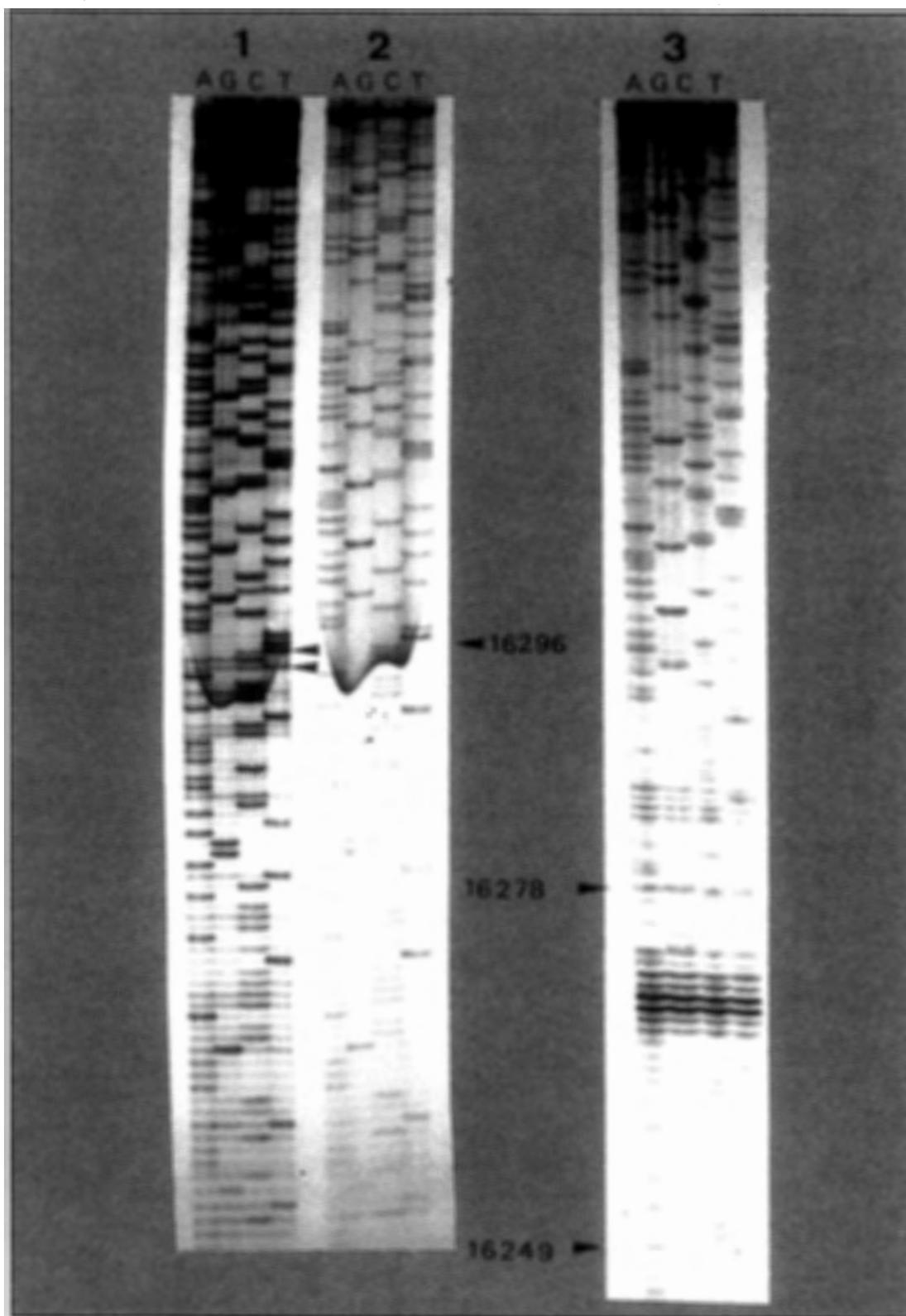
Un aspecto interesante de nuestro estudio es la comprobación de que los dientes parecen proporcionar un DNA de mejor calidad que el extraído de los propios huesos del mismo individuo. La explicación de este fenómeno, puede atribuirse a que el diente, que es el tejido de mayor dureza del cuerpo, actúa como un estuche protector de las células de la cavidad pulpar, ricas en DNA (GINTHER *et al.*, 1992). Aunque el esmalte es casi completamente inorgánico, la cavidad pulpar del diente está abundantemente irrigada e innervada, y de allí provendría el DNA extraído. Hasta ahora, sólo dos estudios de DNA *antiguo* han recuperado DNA de dientes. HÄNNI *et al.*, (1990), lo obtuvieron a partir de un canino humano de 4500-5000 BP, y GINTHER *et al.*, (1992), a partir de dientes extraídos por dentistas, de una antigüedad máxima de 20 años.

En la Figura 2 puede observarse cómo las muestras que no se amplificaron en absoluto presentan una abundante concentración de DNA, que hay que atribuir a contaminación bacteriana o fúngica. Esta relación inversa entre presencia de DNA contaminante no-humano y facilidad de amplificación ya fue observada anteriormente (HAGELBERG *et al.*, 1991 b).

Por el momento se han secuenciado dos de las tres muestras amplificadas (Figura 4). La primera que se obtuvo fue la **94003 a**. El fragmento que se pudo leer está comprendido entre las posiciones 16420 y 16400 del DNA mitocondrial, abarcando 160 pares de bases. Esta secuencia presenta dos polimorfismos en las posiciones 16294 y 16296, consistentes en una sustitución de una C de la secuencia de referencia (ANDERSON *et al.*, 1981) por una T. De la muestra **85004 a** se pudo leer aproximadamente el mismo fragmento, si bien la secuencia presenta indeterminaciones en las zonas 16242-45 y 16266-69. Se observó la delección de una C en las posiciones 16278 o 16279 (se trata de dos C seguidas), y una sustitución de una T por una A en la base 16249.



**Figura 3:** Gel de agarosa al 1%, donde se observan las tres muestras que se pudieron amplificar. Las dos primeras se amplificaron sin necesidad de añadir BSA. En todos los casos la señal es muy débil (especialmente en la muestra 7), si se compara con muestras de DNA actual. 1: Marcador (múltiplos de 123 bp), 2: 94003 b, 3: 94003 a, 4: 85004 b, 5: 85004 a, 6: 67003 b, 7: 67003 a, 8: blanco de extracción, 9: blanco de PCR.



**Figura 4:** Secuencias del DNA mitocondrial (región 1 del D-loop) obtenidas de dos de las muestras amplificadas previamente con las variantes polimórficas encontradas; 1; 94003 a, 2; secuencia de referencia de ANDERSON et al. (1981), 3; 85004 a.

Las posiciones 16294 y 16296 son altamente polimórficas, tal como se ha descrito en algunos trabajos (HORAI and HAYASAKA 1990, DI RIENZO and WILSON 1991, STONEKING *et al.* 1991). El haplotipo T>C (16294)/T>C (16296), hallado en el individuo **94003 a**, se ha observado idéntico (al menos en los 160 bp disponibles) en el individuo caucasoide SB26 (Francia) (HORAI and HAYASAKA 1990), y en los individuos 56 y 79 provenientes del Próximo Oriente (DI RIENZO and WILSON 1991). En cambio, los mismos autores no encuentran, en una muestra de 88 individuos, que la posición 16249 sea polimórfica. HORAI and HAYASAKA (1990), describen una transición en esta posición. En el individuo de Amézaga (**85004 a**), se ha hallado una transversión, fenómeno mucho menos frecuente. En la posición 16278 se ha descrito un polimorfismo (T>C) en varios individuos (DI RIENZO and WILSON 1991, HORAI and HAYASAKA 1990), pero ninguna delección, como la observada en el individuo **85004 a**, aunque podría tratarse, en este caso, de una replicación defectuosa de la polimerasa.

Obviamente, la información que en este momento nos proporcionan estos datos está seriamente limitada por la imposibilidad de compararlos con otros de las poblaciones actuales y pasadas. Actualmente se están estudiando, con resultados positivos, muestras del País Vasco de la Edad del Bronce. Es de suponer que en el futuro, cuando se disponga de secuencias de la población vasca actual y de otras poblaciones de la Península Ibérica, se podrán valorar adecuadamente estos resultados preliminares.

#### AGRADECIMIENTOS

Agradecemos el interés y la colaboración mostrados por M.<sup>a</sup> Luisa Palanques quien proporcionó el material estudiado del yacimiento del Alto de la Ermita (Amézaga) a través del museo de la Diputación de Alava y a la Dra. E. Hagelberg, de la Universidad de Cambridge, por su apoyo técnico y humano.

## BIBLIOGRAFIA

- ANDERSON, S.; BANKIER, A.T.; BARRELL, B.G.; BRUIJN, M.H.de; COULSON, A.R.; DROUIN, J.; EPERON, I.C.; NIERLICH, D.P.; ROE, B.A.; SANGER, F.; SCHREIER, P.H.; SMITH, A.J.H.; STANDEN, R.; YOUNG, I.G. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457-465.
- BROWN, T.A.; BROWN, K.A. 1992. Ancient DNA and the archaeologist. *Antiquity* 66: 10-23.
- DeSALLE, R.; GATESY, J.; WHEELER, W.; GRIMALDI, D. 1992. DNA Sequences from a Fossil Termite in Oligo-Miocene Amber and Their Phylogenetic Implications. *Science* 257: 1933-1936.
- DI RIENZO, A.; WILSON, A.C. 1991. Branching pattern in the evolutionary tree for human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 1597-1601.
- ESTIVILL, X.; TURBON, D.; PÉREZ-PÉREZ, A. 1991. Ancient DNA analysis from bone in Spain. I Meeting on Ancient DNA - The retrieval and study of DNA sequences from archeological material and museum specimens. University of Nottingham. July 8-10, 1991.
- GINTHER, C.; ISSEL-TARVER, L.; KING, M.C. 1992. Identifying individuals by sequencing mitochondrial DNA from teeth. *Nature Genetics* 2 (2): 135-138.
- GOLENBERG, E.M. 1991. Amplification analysis of Miocene plant fossil DNA. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* (series B) 333: 419-427.
- GOLENBERG, E.M.; GIANNASI, D.E.; CLEGG, M.T.; SMILEY, C.J.; DURBIN, M.; HENDERSON, D.; ZURAWSKI, G. 1990. Chloroplast DNA sequence from a Miocene Magnolia species. *Nature* 344: 656-658.
- HAGELBERG, E.; SYKES, B.; HEDGES, R. 1989. Ancient bone DNA amplified. *Nature* 342: 485.
- HAGELBERG, E.; CLEGG, J.B. 1991. Isolation and characterization of DNA from archaeological bone. *Proc. R. Soc. Lond.* 244: 45-50.
- HAGELBERG, E.; GRAY, I.C.; JEFFREYS, A.J. 1991 a. Identification of the skeletal remains of a murder victim by DNA analysis. *Nature* 352: 427-429.
- HAGELBERG, E.; BELL, L.S.; ALLEN, T.; BOYDE, A.; JONES, S.J.; CLEGG, J.B. 1991 b. Analysis of ancient DNA: techniques and applications. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 333: 399-407.
- HÄNNI, C.; LAUDET, V.; SAKKA, M.; BEGUE, A.; STEHELIN, D. 1990. Amplification of mitochondrial DNA fragments from ancient human teeth and bones. *C. R. Acad. Sci. Paris, Ser. III*, 310: 365-370.
- HIGUCHI, R.; BOWMAN, B.; FREIBERGER, M.; RYDER, O.A.; WILSON, A.C. 1984. DNA sequence from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature*, 312: 282-284.
- HIGUCHI, R.; von BEROLDINGEN, C.H.; SENSA-BAUGH, G.F.; ERLICH, H.A. 1988. DNA typing from single hairs. *Nature* 312: 282-284.
- HORAI, S.; HAYASAKA, K.; MURAYAMA, K.; WATE, H.; KOIKE, H.; NAKAI, N. 1989. DNA amplification from ancient human skeletal remains and their sequence analysis. *Proceedings of the Japan Academy*, series B - Physical and Biological Sciences. 65: 229-233.
- HORAI, S.; HAYASAKA, K. 1990. Intraspecific Nucleotide Sequence Differences in the Major Noncoding Region of Human Mitochondrial DNA. *Am. J. Hum. Genet.* 46: 828-842.
- IVINSON, A.J.; TAYLOR, G.R. 1991. PCR in genetic diagnosis. In: McPHERSON, M.J., QUIRKE, P., and TAYLOR, G.R. (Eds.). *PCR, A Practical Approach*: 15-28.
- JEFFREYS, A.L.; ALLEN, M.J.; HAGELBERG, E.; SONNBERG, A. 1992. Identification of the skeletal remains of Josef Mengele by DNA analysis. *Forensic Science International* 56: 65-76.
- KITCHIN, P.A.; SZOTYORI, Z.; FROMHOLD, C.; ALMOND, N. 1990. Avoidance of false positives. *Nature* 344: 201.
- MARTINEZ de PANCORBO, M.; CASTRO, A.; ALONSO, S.; ORUE, J.; GARCIA-ORAZ, A.; ARIZTI, P.; TAMAYO, G.; ETXEBERRIA, F.; RÚA de la, C. 1992. Extracción y caracterización del DNA procedente del hueso esponjoso reciente y de los siglos XVI y XVII. *Munibe* 8: 209-212.
- MORELL, V.; 1992. 30-Million-Year-Old DNA Boosts and Emerging Field. *Science* 257: 1860-1863.
- PÄÄBO, S.; 1984. Über den Nachweis von DNA in altägyptischen Mumien. *Das Altertum* 30: 213-218.
- PÄÄBO, S.; 1985 a. Molecular cloning of Ancient Egyptian mummy DNA. *Nature* 314: 644-645.
- PÄÄBO, S.; 1985 b. Preservation of DNA in Ancient Egyptian mummies. *J. Archaeol. Sci.* 12: 411-417.
- PÄÄBO, S.; 1989. Ancient DNA: Extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86: 1939-1943.
- PÄÄBO, S.; 1990. Amplifying ancient DNA. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, New-York, USA.
- PÄÄBO, S.; GIFFORD, J.A.; WILSON, A.C. 1988. Mitochondrial DNA from a 7,000-year-old-brain. *Nucl. Acids Res.* 16: 9775-9787.
- PÄÄBO, S.; IRWIN, D.M.; WILSON, A.C. 1989. DNA damage promotes jumping between templates during enzymatic amplification. *J. Biol. Chem.* 265: 4718-4721.
- PEREZ-PEREZ, A.; 1992. Ancient Bone DNA analysis in Spain: cystic fibrosis and mt DNA. *Ancient DNA Newsletter* 1(1):33.
- PEREZ-PEREZ, A.; GIRBAU, E.; LALUEZA, C.; ESTIVILL, X.; TURBON, D. 1992. Ancient DNA analysis: detection of disease and mt-DNA variability. Proceedings of IX Th European Meeting Paleopathology Association. Museo Arqueológico de Barcelona, 1-14 september 1992.
- PRINCE, A.M.; ANDRUS, L. 1992. How to Kill Unwanted DNA. *BioTechniques* 12 (3): 358-360.
- ROSS, P.E.; 1992. Eloquent remains. *Scientific American*. May 1992: 72-81.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. 1989. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Second Edition.

- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 74: 5463-5467.
- SARKAR, G.; SOMMER, S.S. 1991. Parameters Affecting Susceptibility of PCR Contamination to UV Inactivation. **BioTechniques** 10 (5): 590-594.
- STONEKING, M.; HEDGECOCK, D.; HIGUCHI, R.G.; VIGILANT, L. (1991). Population Variation of Human mtDNA Control Region Sequences Detected by Enzymatic Amplification and Sequence-specific Oligonucleotide Probes. **Am. J. Hum. Genet.** 48: 370-382.
- THUESEN, I.; ENGBERG, J. 1990. Recovery and analysis of human genetic material from mummified tissue and bone. **J. Archaeol. Sci.** 17: 679-689.
- VIGILANT, L.; PENNINGTON, R.; HARPENDING, H.; KOCHER, T.D.; WILSON, A.C. 1989. Mitochondrial DNA sequences in single hair from a southern African population. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 86: 9350-9354.
- WILLIAMS, S.R.; LONGMIRE, J.L.; BECK, L.A. 1990. Human DNA recovery from ancient bone. **Am. J. Phys. Anthropol.** 81: 318.

