

Jaume GARCÍA-BOUR*, Eva FERNÁNDEZ*, João ZILHÃO**, Daniel TURBÓN*

Estudio preliminar de DNA humano del neolítico de la Península Ibérica

El panorama relativo al establecimiento del Neolítico en Europa está sujeto a controversia. Múltiples disciplinas barajan hipótesis contradictorias destacando esencialmente dos: expansión démica de las poblaciones neolíticas tecnológicamente más favorecidas con absorción de los grupos mesolíticos locales frente a adopción del modo de vida neolítico por estos grupos sin sustitución.

Los estudios de variabilidad mitocondrial de DNA antiguo mediante comparación de secuencias de época neolítica de Oriente Medio con las procedentes de yacimientos de la Península Ibérica (mesolíticos de Muge, neolíticos de Caldeirao y de Atxuri, y medievales de Garai), pueden proporcionar una respuesta a esta cuestión. La ventaja del DNA antiguo, respecto al de las poblaciones actuales, es que permite analizar directamente el espécimen objeto de estudio, evitándose, así, los sesgos debidos variaciones demográficas acontecidos con posterioridad.

Palabras clave: DNA antiguo, Expansión neolítica, Península Ibérica.

The panorama for establishing the Neolithic in Europe is a controversial issue. Multiple disciplines juggle contradictory hypotheses, of which two predominate: endemic expansion of the technologically more favoured Neolithic populations absorbing the local Mesolithic groups opposing the latter groups adopting Neolithic ways of living without substitution. Mitochondrial variability studies of ancient DNA by comparing sequences from the Neolithic period in the Middle East with those from sites on the Iberian Peninsula (Mesolithic at Muge, Neolithic at Caldeirao and Atxuri, and medieval at Garai), can provide an answer to this question. The advantage of ancient DNA over that of current populations, is that it allows the direct analysis of the specimen under study. This avoids biases arising from posterior demographic variations.

Key words: Ancient DNA, Neolithic expansion, Iberian peninsula.

INTRODUCCIÓN

Las técnicas de extracción y análisis de DNA a partir de muestras antiguas son hoy de aplicación habitual en los laboratorios de Biología Molecular especializados en material arqueológico y paleontológico, así como en laboratorios forenses. La preservación del DNA no depende tanto de factores temporales (antigüedad del material analizado) como de las condiciones de preservación (temperatura, acidez) del yacimiento. La secuencia de DNA mitocondrial (mtDNA) de un Neandertal, recuperada no hace mucho, así lo indica (Krings *et al.* 1997).

La utilidad de los estudios de DNA antiguo es evidente cuando, sobre el contexto poblacional previamente establecido por los estudios en poblaciones actuales, pasa a verificar las hipótesis formuladas. Su ventaja es precisamente que estudia los especímenes antiguos, pudiéndose soslayar los sesgos poblacionales producidos por descensos demográficos a lo largo de siglos (guerras, epidemias, hambrunas, deriva genética, desaparición de pueblos) y de las migracio-

nes. Tal utilidad ya ha sido demostrada en la resolución del origen de los primeros pobladores de la Isla de Pascua (Hagelberg *et al.* 1994), así como de los Amerindios (García-Bour *et al.* 1998, Turbón 1996).

La interpretación de mapas sintéticos elaborados con polimorfismos sanguíneos dio apoyo a la hipótesis de que los europeos actuales proceden, biológicamente, de las expansiones geográficas y démicas de los pueblos neolíticos del Próximo Oriente (Cavalli-Sforza *et al.* 1994). No obstante el análisis de la variabilidad del mtDNA en poblaciones actuales de Europa y del Próximo Oriente puso en duda algunas de las conclusiones derivadas de estos estudios (Sajantila *et al.* 1995). Incluso se pasó a sostener la hipótesis contraria (Richards *et al.* 1996), esto es, que la transición de las poblaciones mesolíticas, de tradición paleolítica, al modo de vida neolítico, no se produjo como resultado de su mezcla y absorción genética mayoritarias por parte de las poblaciones llegadas del Próximo Oriente al continente europeo. Este último trabajo, pues, refuerza la antigua idea

(*) Sección de Antropología. Facultad de Biología. Universidad de Barcelona.

(**) Instituto Português de Arqueologia. Lisboa.

de que la cultura agrícola neolítica habría sido, en buena medida, adoptada por los grupos locales mesolíticos, los cuales no habrían experimentado grandes cambios en su acervo genético por causa de la inmigración de poblaciones de Asia Menor.

Tal conclusión se basa, desde el punto de vista molecular, en la presencia en poblaciones actuales de Europa de linajes considerados "paleolíticos" (linaje 1 del mtDNA) en contraposición a otros "neolíticos" (2 y 3A del mtDNA). Si la revolución neolítica hubiese implicado una sustitución poblacional importante, la frecuencia del linaje 1 en Europa tendría que ser menor a la observada.

Dado que la consideración de 'paleolítico' a un linaje mitocondrial determinado no indica necesariamente que se originara en la región geográfica en la que se detecta en la actualidad, sería deseable contrastar, mediante la recuperación de DNA antiguo, hipótesis tan contradictorias como las comentadas. Nuestro objetivo, pues, es contrastar secuencias de mtDNA antiguo, extraídas de muestras arqueológicas del Neolítico del Próximo Oriente, con las de ciertos yacimientos de la Península Ibérica. Se pretende soslayar, como ya se ha comentado, los sesgos poblacionales producidos por descensos demográficos a lo largo de siglos (guerras, epidemias, hambrunas, deriva genética, desaparición de pueblos) y de las migraciones. Tales circunstancias están suficientemente constadas en Europa, tanto a nivel tanto arqueológico como histórico, como para aceptar las conclusiones de los estudios genéticos en poblaciones actuales sin verificación mediante el DNA antiguo.

Nuestra hipótesis de trabajo es que si las poblaciones occidentales de época neolítica (7.000/6000 A.P. en la Península Ibérica), supuestamente procedentes del *stock* neolítico del Próximo Oriente, presentan los linajes orientales 2 y 3^a, quedará favorecida, en principio, la hipótesis difusionista en su sentido poblacional. Si, por el contrario, tal difusión hubiera sido más cultural que démica, las más antiguas poblaciones agrícolas occidentales presentarán de forma preponderante el linaje "paleolítico" 1, mientras que las orientales compartirán entre ellas los linajes 2 y 3A.

MATERIAL Y MÉTODO

Se han analizado el mtDNA de piezas dentarias antiguas de los yacimientos de época preneolítica de Muge (Portugal), de época neolítica de Caldeirao (Portugal), de Atxuri (País Vasco) y de época medieval de Garai (País Vasco), que serán comparadas con las de Asikli (Turquía) y Tell Halula (Siria). Se presentan aquí resultados preliminares de la amplificación y secuenciación de las muestras de la Península Ibérica, aunque sujetas aún a verificación con nuevos análisis.

La extracción del DNA se realizó mediante procedimientos usuales de Biología Molecular, con algunas particularidades. Las muestras fueron inicialmente limpiadas en su exterior mediante arena a presión, a fin de eliminar toda

fuerza posible de contaminación o suciedad. Posteriormente fueron trituradas en un molino refrigerado con nitrógeno líquido, lavadas con solución de EDTA 0.5 M, y digeridas con proteinasa K. A continuación se extrajo el DNA con Fenol/Cloroformo y se concentró con microconcentradores Centricon-30. Por último se amplificaron y secuenciaron fragmentos correspondientes a la Región Hipervariable 1 del mtDNA con cebadores específicos, proporcionando un producto de PCR de 273 pares de bases. Todo el proceso fue elaborado siguiendo el protocolo de extracción descrito en anteriores artículos (Lalueza *et al.* 1997), y en condiciones estrictas de esterilidad, a fin de minimizar el riesgo de contaminación con DNA humano actual, para lo cual las muestras sólo fueron manipuladas por un único investigador durante la fase de amplificación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron secuencias de un total de 15 individuos, pertenecientes a los yacimientos antes mencionados, que fueron comparadas entre sí y con la secuencia consenso de Anderson (Anderson *et al.* 1981), incluyéndose, además, la misma región mitocondrial del único investigador que llevó a cabo la amplificación del DNA, a fin de descartar posibles contaminaciones.

Ordinariamente suelen procesarse las dos cadenas del DNA, para confirmar la secuencia, ya que son complementarias. Sin embargo, no es infrecuente en los análisis de muestras antiguas que un cierto número de ellas presente resultados inconsistentes. En la mayoría de las secuencias de los quince individuos mencionados fue posible secuenciar ambas cadenas, si bien no en todas, debido quizás a la gran dificultad de amplificación del DNA antiguo por la presencia de inhibidores que, tras la muerte del individuo, pueden interferir, e incluso impedir, la amplificación del DNA.

El análisis comparativo de las secuencias reveló que hay diferencias entre los distintos individuos, lo que demuestra que, algunas de ellas pertenecen a las muestras antiguas. La posible coincidencia con la secuencia del investigador mencionado no implica necesariamente la contaminación durante el proceso de amplificación, pero introduce el factor de la duda y requiere comprobaciones adicionales en un proceso ya, de por sí, muy laborioso.

Por otra parte, y ante el riesgo de errores de la *Taq*-polimerasa en la reconstrucción de las cadenas, es preciso verificar las secuencias mediante repeticiones de amplificaciones independientes. Ello resulta obligado para las muestras antiguas, y muy aconsejable en las muestras de población actual en las que el DNA no está degradado *post mortem*. En nuestro experimento se han producido inconsistencias (replicaciones diferentes de la misma cadena) entre algunas secuencias procedentes de una misma muestra, lo que no permite aún pasar a la fase del análisis poblacional, al persistir las dudas sobre cuáles son las auténticas secuencias de

las muestras. Este proceso de comprobación está llevándose a cabo actualmente. Además, se procede también a ampliar el tamaño muestral correspondiente a cada uno de los yacimientos considerados, con objeto de disponer de un mayor número de secuencias.

Las dificultades anteriores son de tipo técnico y no parecen suponer un obstáculo insalvable, aunque debe insistirse en su resolución requiere gran rigor así como equipo especializado y condiciones adecuadas en el laboratorio. Problemáticos o no, los estudios de DNA antiguo son la vía directa para la comprobación de las hipótesis planteadas, y la clave de su resolución. Con el análisis de relativamente pocas muestras puede avanzarse extraordinariamente en la resolución de problemáticas o de enigmas del pasado prehistórico humano, así como orientar sobre la dirección a seguir en nuevas investigaciones.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido financiado por el proyecto DGES PB97-925 del MEC español.

BIBLIOGRAFÍA

ANDERSON S., BANKIER A.T., BARREL B.G., BRUIN M.H. et al. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457-465.

- CAVALLI-SFORZA L., MENOZZI P. Y PIAZZA A. 1994. *History and geography of human genes*. Princeton NJ: Princeton University Press.
- GARCÍA-BOUR J., PÉREZ-PÉREZ A., PRATS E. Y TURBÓN D. 1998. Secuencias de mtDNA de aborígenes de Tierra del Fuego-Patagonia y el origen de los Fueguinos. *Anales del Instituto de la Patagonia* 26:69-75.
- KRINGS M., STONE A., SCHMITZ R.W., KRAINITZKI, STONEKING M. Y PÄÄBO S. 1997 Neanderthal DNA sequences and the origin of Modern Humans. *Cell* 90:19-30.
- LALUEZA C., PÉREZ-PÉREZ A., PRATS E., CORNUDELLA L. Y TURBÓN D. 1997. Lack of founding Amerindian mitochondrial lineages in extinct Aborigines from Tierra del Fuego-Patagonia. *Human Molecular Genetics* 6:41-46.
- RICHARDS M., CÔRTE REAL H., FORSTER P., MACAULAY V. et al. 1996. Paleolithic and Neolithic lineages in the European Mitochondrial Gene Pool. *American Journal of Human Genetics* 59:185-203
- HAGELBERG E., QUEVEDO, S., TURBÓN, D. & CLEGG, J.B. 1994. DNA from Ancient Easter Islanders. *Nature* 369: 25-26
- SAJANTILA A., LAHERMO P., ANTTINEN T., LUKKA M., SISTONEN P., SAVONTAUS M., AULA P., BECKMAN L., TRANEBJERG L., GEDDE-DAHL T., ISSEL-TARVER L., DIRIENZO A. Y PÄÄBO S. 1995. Genes and languages in Europe: an analysis of mitochondrial lineages. *Genome Research* 5:42-52.
- TURBÓN, D. 1996. DNA antiguo y el origen de los vascos. En: Cela-Conde et al. Eds. *Senderos de la Evolución Humana*. Coloquio Internacional en Homenaje a Phillip V. Tobias. *Ludus Vitalis*, núm esp. 1. pp. 205-246, México 1998.