

Las poblaciones prehistóricas desde una perspectiva genético-molecular

(Prehistoric populations from a genetic - molecular perspective)

Rúa, Concepción de la
Univ. del País Vasco
Fac. de Ciencias
Dpto. de Biología Animal y Genética
Apartado 644
48080 Bilbao

La reconstrucción de la historia evolutiva humana se ha visto enriquecida con nuevas metodologías de análisis: tanto modelos teóricos para reconstruir la genealogía de los genes a partir de los datos de las poblaciones actuales (filogeografía), como el análisis genético-molecular de las poblaciones pretéritas (ADN antiguo). En este artículo discutimos la problemática y los resultados del análisis filogeográfico y presentamos dos estudios de ADN antiguo (el haplogrupo V en poblaciones prehistóricas del País Vasco y las secuencias de ADN mt en fósiles de neandertales).

Palabras Clave: ADN mitocondrial. Filogeografía. ADN antiguo. Haplogrupo V. Neandertales.

Azterketa metodologia berriak direla eta, gizakiaren historia ebolutiboa berregiteko lanak aberasturik gertatu dira: hala geneen genealogia berregiteko eredu teorikoak, egungo populazioen datuetan (filogeografia) oinarriturik, nola lehengo populazioen azterketa genetiko-molekularra (antzinako ADN). Artikulu honetan, azterketa filogeografikoaren arazoak eta emaitzak eztabaidatzen ditugu eta antzinako ADNaren azterketa bi aurkezten ditugu (V haplotaldea Euskal Herriko historiaurreko populazioetan eta ADN mt-aren azterketa neandertalen fosiletan).

Giltza-Hitzak: ADN mitokondrial. Filogeografia. Antzinako ADN. V haplotaldea. Neandertalak.

La reconstruction de l'histoire évolutive humaine s'est vue enrichie par de nouvelles méthodologies d'analyse: aussi bien des modèles théoriques pour reconstruire la généalogie des gènes à partir des données des populations actuelles (philogéographie), que l'analyse génético-moléculaire des populations passées (ADN ancien). Dans cet article nous parlons de la problématique et des résultats de l'analyse philogéographique et nous présentons deux études d'ADN ancien (le haplogroupe V dans des populations préhistoriques du Pays Basque et les séquences d'ADN mt dans des fossiles de néanderthals).

Mots Clés: ADN mitochondrique. Philogéographie. ADN ancien. Haplogroupe V. Néanderthals.

INTRODUCCIÓN

El estudio de la historia evolutiva humana se ha centrado durante tiempo en el análisis de los restos recuperados en los yacimientos arqueológicos (humanos y materiales) y en el análisis genético de las poblaciones actuales, ya que los genes guardan un registro de la historia evolutiva humana.

En los últimos años se está avanzando significativamente en la interpretación de la historia de las poblaciones humanas, gracias al desarrollo de nuevas metodologías. Por un lado, la aplicación de modelos teóricos en el estudio de las poblaciones actuales, pretende reconstruir la genealogía de los genes (desde los linajes de las poblaciones actuales hasta identificar los linajes fundadores o de la población ancestral). Este nuevo enfoque, se denomina Filogeografía (Avice, 2000) (Figura 1). Y por otro lado, la posibilidad de analizar el material genético de los restos de nuestros antepasados, nos está permitiendo acercarnos directamente a la realidad genética de las poblaciones que nos precedieron.

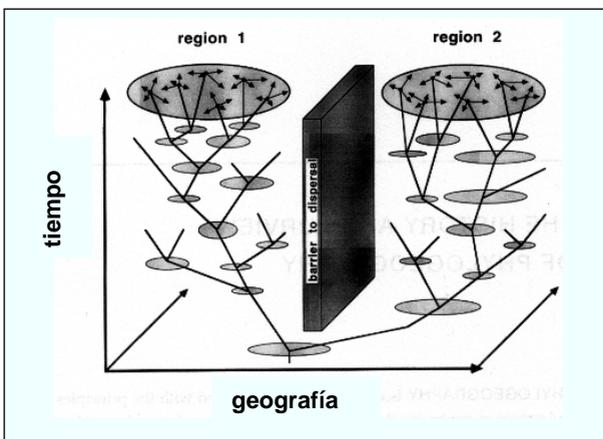


Figura 1: Genealogía hipotética de un gen para poblaciones de dos regiones separadas. (óvalos sombreados: rangos geográficos de cada linaje particular) (Avice 2000).

El desarrollo de modelo teóricos pretende reconstruir la historia de los genes (genealogía de los genes) desde una doble perspectiva, temporal y espacial, aunque sólomente de aquellos linajes o secuencias genéticas que han sobrevivido hasta nuestros días (Figura 1). Sin embargo solamente el análisis directo del ADN de las poblaciones ancestrales (que en lo sucesivo denominaremos ADN_a), nos permitirá conocer los linajes que no persisten en la actualidad.

Desde hace algunos años, es posible la recuperación y análisis de ADN de restos antiguos (ADN_a) (hueso, diente, tejido momificado). En principio estos estudios se han limitado al ADN mitocondrial (ADN_{mt}), pero los conocimientos adquiridos en la última década, están permitiendo analizar otras regiones del genoma, localizadas a nivel nuclear (revisión en Izagirre y de la Rúa, 2001).

EL ADN MITOCONDRIAL (ADN_{mt})

Características del ADN_{mt}

La mayor parte del material genético de un organismo se encuentra localizado en el núcleo de la célula, pero existe una pequeña proporción de ADN en el interior de las mitocondrias (ADN_{mt}). Este ADN_{mt} tiene una longitud aproximada de 16.500 pb, lo que supone un 0,0005% del genoma nuclear humano. Se conoce su secuencia completa en humanos y en un gran número de vertebrados (Anderson et al., 1981, 1982; Bibb et al., 1981, Andrews et al. 1999). La mayor parte del genoma mitocondrial codifica proteínas que intervienen en la división del propio orgánulo, salvo una pequeña región de unos 1.100 pb de longitud, no codificante, denominada *región control*. La secuencia de esta pequeña región es la que normalmente se analiza en los estudios evolutivos.

Los estudios evolutivos se han centrado en gran medida en el ADN mitocondrial (ADN_{mt}), ya que presenta una serie de ventajas para la reconstrucción de la historia de las poblaciones. Por ello vamos a describir primeramente las características del ADN_{mt}:

1) El ADN_{mt} tiene una tasa de cambio evolutivo muy elevada, lo que supone que las mutaciones se acumulan de un modo mucho más rápido que en el genoma nuclear, sobre todo en la región control. Por ello, es útil para estudiar la historia evolutiva reciente de las poblaciones, ya que incluso en periodos de tiempo muy cortos se habrán acumulado cambios.

2) El ADN_{mt} se trasmite exclusivamente por la línea materna, lo que permite trazar genealogías de un modo más directo que en el caso del ADN nuclear, en el cual se da recombinación entre cromosomas homólogos (Figura 2).

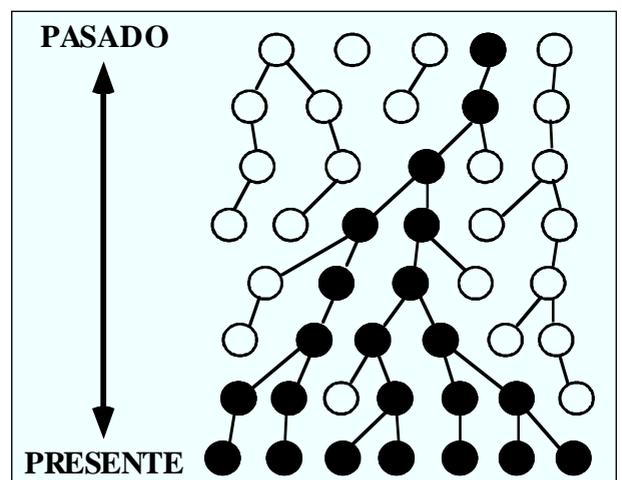


Figura 2: Transmisión del ADN_{mt}: los linajes actuales del ADN_{mt} pueden remontarse a un único antecesor (Stoneking, 1993). Círculos vacíos: linajes del ADN_{mt} que se han extinguido (cuando una mujer no tiene hijos o únicamente hijos varones). Círculos sólidos: linajes que descienden desde un antepasado común y llegan hasta el presente.

3) Dada su herencia materna, el ADNmt es un genoma haploide (no existen dos copias homólogas, cada una proveniente de un parental, como en el caso de los genes nucleares). Esto tiene el mismo efecto que si se redujera a la mitad el tamaño de la población reproductora. Por tanto, el efecto de la deriva genética es mucho más importante en la transmisión de los linajes mitocondriales (Birky et al., 1983).

4) Hay centenares de mitocondrias en el citoplasma de una célula y en cada mitocondria hay diversas copias de ADNmt. Esto supone una ventaja en los estudios de ADN antiguo ya que el ADN recuperado es muy inferior al que encontraríamos en una muestra moderna.

Los métodos más comunmente utilizados en el análisis de ADNmt en el campo del ADN antiguo son: a) La secuenciación de fragmentos de distinta longitud de la región control o bucle-D (denominados HVR-I y HVR-II) y b) Los polimorfismos de restricción (RFLPs): el uso de enzimas de restricción permite identificar la presencia o ausencia de un conjunto de mutaciones, que constituyen el haplotipo individual (Izagirre et al., 1998). Los haplotipos se han clasificado en diferentes agrupamientos, llamados haplogrupos, que son específicos de las distintas variantes geográficas de la especie humana (caucasoides, africanos, asiáticos), por lo que ofrecen mayor facilidad para inferir relaciones filogenéticas entre poblaciones (Torroni et al. 1996). c) Actualmente se ha propuesto el uso combinado de la secuencia HVR-I y el tipaje de variantes diagnósticas de la región codificante (Richards et al., 2000).

El ADNmt en los estudios de ADN antiguo

Los principales problemas técnicos con que nos encontramos en los estudios de ADN antiguo son:

a) *escasa cantidad de ADN conservado*: en muestras muy antiguas o mal conservadas, a veces no es posible hallar ningún rastro de ADN. En algunos casos, el ADN representa únicamente entre el 0.1 y el 1% del ADN que se esperaría encontrar en una muestra moderna (Tuross, 1994).

b) *variación entre muestras*: la cantidad de ADN varía de una muestra a otra, incluso en un mismo yacimiento. Esto origina un problema metodológico importante, ya que las condiciones de análisis pueden tener distinta efectividad en cada muestra.

c) *degradación del ADN*: el ADN se degrada en función del tiempo y de las condiciones externas (pH del suelo, temperatura, humedad, calor) (Lindahl, 1993; Kelman & Moran, 1996). Como consecuencia de estos factores ambientales, el ADN sufre diversas alteraciones químicas, entre las cuales destacaremos: 1) la hidrólisis, que provoca una fragmentación del ADN, por lo que frecuentemente sólo se pueden recuperar fragmentos de 100-150 pb, con relativa independencia de la antigüedad de

la muestra; 2) la oxidación, lo que provoca pérdida de algunas bases nucleotídicas, que dejan espacios vacíos en la secuencia del ADN. Ésta constituye la principal modificación, calculándose que en una muestra antigua hasta un 10% de la pirimidinas están afectadas por oxidación.

Para una mejor preservación del ADN resulta crítico que inmediatamente después de la muerte del individuo, el tejido quede "protegido" en un ambiente anóxico y seco. Teóricamente es difícil que el ADN sobreviva al proceso de degradación más allá de 100.000 años (Lindahl, 1993).

d) *contaminación*: la escasa cantidad de ADN recuperado de las muestras antiguas y su estado fragmentario, provoca que pequeñas cantidades de ADN contaminante, se amplifiquen preferencialmente. La contaminación puede tener distinto origen: 1) *bacteriano*: el material genético de los microorganismos se puede mezclar con el ADN original del organismo. 2) *del sustrato*: las muestras procedentes de yacimientos arqueológicos, suelen estar mezcladas con compuestos orgánicos e inorgánicos del suelo, como ácidos húmicos, metales pesados o sales en elevadas concentraciones, que interfieren en los análisis posteriores en el laboratorio. 3) *ADN humano* proveniente de las personas que han manipulado los restos previamente (los arqueólogos por ejemplo) o de los investigadores del laboratorio (por descamación de células epidérmicas, gotitas de saliva). 4) *contaminación durante la amplificación*; ésta es la más peligrosa, ya que el ADN amplificado se extiende por el laboratorio y se propaga por el aire en forma de aerosoles (*amplificones*).

Por ello, cuando se trabaja con ADN hay que tomar una serie de precauciones tales como: separación física de los espacios, uso de material estéril, realización de varios extractos/individuo y de diversos controles de contaminación (durante la extracción y la amplificación) (Izagirre et al., 1998).

EL POBLAMIENTO DE EUROPA DESDE LA PERSPECTIVA GENÉTICO-MOLECULAR

Como hemos mencionado previamente, el análisis genético de las poblaciones actuales pretende reconstruir la genealogía de los genes. La metodología que se sigue en el análisis filogeográfico consiste en: 1) identificar los linajes fundadores (aquellos que son idénticos en la población progenitora y en la población descendiente) y 2) la datación de los principales eventos evolutivos de esas genealogías, principalmente acontecimientos demográficos (efectos fundacionales, expansiones o migraciones). Este tipo de análisis fue propuesto por primera vez por Torroni et al., 1993.

Los datos genéticos de las poblaciones actuales, sugieren que la diversidad del ADNmt actual es el resultado de acontecimientos evolutivos ocurridos en el pasado (Simoni et al., 2000). Algunos autores sugieren que la mayoría de las secuencias de las poblaciones actuales de Europa occidental,

proceden de la primera ocupación de Europa por el *Homo sapiens* “moderno” durante el Paleolítico Superior (hace unos 45.000 años). Sin embargo, existen otros acontecimientos que han podido modelar la variabilidad genética europea; por un lado, la difusión de la economía agrícola desde el Próximo Oriente, durante el Neolítico (hace unos 10.000 años) y por otro, las re-expansiones poblacionales ocurridas tras la última glaciación en Europa (revisión en Barbujani, 2002, en este volumen).

Sobre la difusión del Neolítico, hay autores que apoyan un modelo de difusión demica, según el cual las comunidades productoras del Próximo Oriente incrementarían su tamaño poblacional, dispersándose a otros lugares (Ammerman & Cavalli-Sforza, 1984). En el proceso de dispersión, apenas se mezclarían con las poblaciones indígenas mesolíticas de Europa. Por el contrario, otros autores apoyan un modelo de difusión cultural, según el cual, los cambios tecnológicos ocurrieron sin movimientos poblacionales significativos (Zvelebil M., 1986).

Los datos genéticos actuales (ADNmt) son controvertidos y algunos autores sugieren que la contribución del Neolítico al pool génico europeo ha sido sobreestimada en los estudios de polimorfismos clásicos (grupos sanguíneos, proteínas) y que solamente entre el 15 y 25 % de los linajes mitocondriales actuales proceden del Neolítico, mientras que los principales linajes proceden del Paleolítico Superior (entre el 85 y 75%) (Richards et al. 1996 y 2000; Barbujani, 2002).

La metodología analítica actual permite analizar los procesos evolutivos ocurridos en cada parte del genoma, por ejemplo analizar cada linaje mitocondrial individualmente. Según los modelos teóricos (Figura 3), una expansión demográfica a partir de un pequeño número de fundadores (Figura 3a), crea una genealogía “estrellada” (Figura 3b), en la que la mayoría de la diversidad se genera justamente en el momento de la expansión (cuando el tamaño efectivo de la población es pequeño y la deriva más intensa) (Avice, 2000).

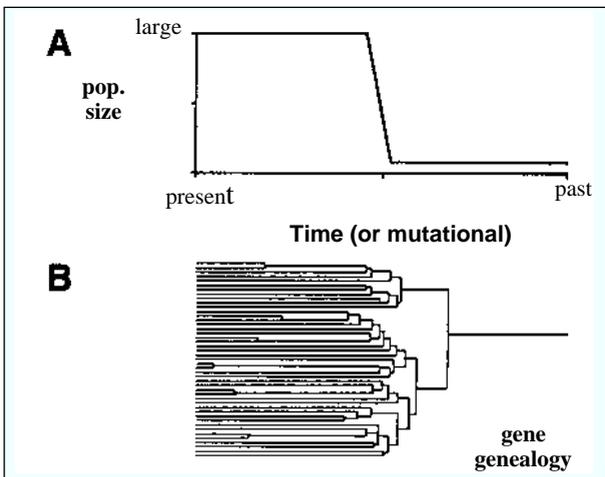


Figura 3: Efectos hipotéticos sobre la genealogía de un gen (ADNmt u otro) de una expansión poblacional brusca (Avice, 2000).

En el caso del ADNmt se han descrito diversos casos de árboles con genealogía estrellada, que nos hablan de expansiones poblacionales. Por ejemplo la filogenia correspondiente a los haplogrupos V y H (cuya diversidad se ha atribuido a las expansiones ocurridas desde el Sur de Europa, tras la última glaciación hace unos 12.000 años) (Richards et al. 2000).

No obstante, la principal discusión actualmente se basa en la datación de estos eventos demográficos. Estos cálculos requieren de la aplicación de modelos que asumen múltiples supuestos. Con las limitaciones que supone este método, se ha propuesto la siguiente interpretación de la diversidad del ADNmt en Europa (Richards et al., 2000) (Figura 4):

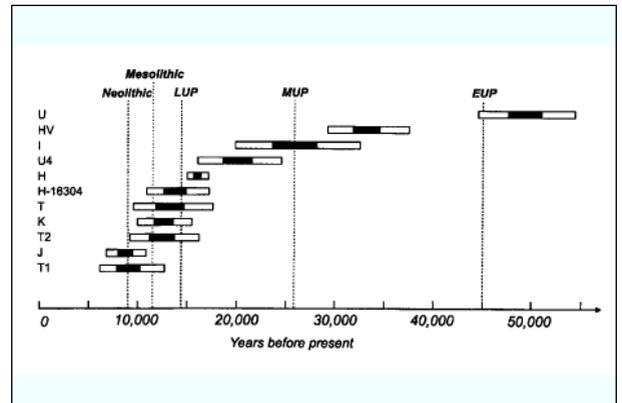


Figura 4: Rango temporal para los principales haplogrupos del ADNmt en Europa. EUP: Early Upper Paleolithic; MUP: Middle Upper Paleolithic; LUP: Lower Upper Paleolithic. (Richards et al., 2000).

El Haplogrupo U, es un haplogrupo de origen africano, que se introdujo en Europa desde el Próximo Oriente con la llegada del hombre moderno (hace unos 40.000-50.000 años). El resto de los haplogrupos (I, X, H y K) se habrían originado a mediados del Paleolítico Superior, en el periodo del último Máximo Glaciar (hace unos 20.000 años), momento en que hay una gran dispersión de poblaciones en Europa.

Tras la última glaciación (entre los 10.000 y 15.000 años) se observa una nueva diversificación de los linajes mitocondriales, la cual se ha relacionado con la reexpansión de las poblaciones desde las zonas refugio en el Sur de Europa.

Coincidiendo con la difusión de la economía Neolítica, se propone que algunos haplogrupos, como por ejemplo el haplogrupo J, se introdujeron en Europa desde el Próximo Oriente, hace unos 10.000 años. Las mutaciones acumuladas en este linaje permiten distinguir subgrupos dentro de J (como J1, J2), cuya difusión se ha relacionado con dos rutas migratorias: 1) a lo largo del mediterráneo y de Europa atlántica (los subgrupos J2 y J1b), y 2) por el centro y N de Europa (subgrupos J1a y J*) (Richards et al. 1998).

Sin embargo, no hay que olvidar que esta reconstrucción evolutiva se ha realizado infiriendo

el pasado a partir del presente, pero esta reconstrucción tiene algunas limitaciones, impuestas por las restricciones de estos modelos teóricos (por ejemplo: se asume un determinado modelo demográfico y unos valores para las tasas de mutación, se consideran únicamente los linajes que han persistido hasta la actualidad y se ignoran los linajes desaparecidos, ya que no están representados en la diversidad genética actual).

Teniendo en cuenta estas limitaciones, hay que ser muy prudentes a la hora de establecer relaciones entre las poblaciones presentes y pretéritas. La complejidad de la evidencia fósil y genética nos debiera recordar que puede haber muchos orígenes y que éstos pueden estar dispersos geográfica y temporalmente. Por ello, sería más adecuado establecer modelos poblacionales y no a nivel macrogeográfico (Foley, 1998).

En este contexto, el análisis de ADN de restos antiguos abre la posibilidad de abordar directamente algunas cuestiones de la historia de las poblaciones. A continuación se exponen sendos ejemplos de este tipo de enfoque: por un lado, un estudio de ADNmt realizado por nosotros en diversas poblaciones prehistóricas del País Vasco, y por otro lado, el análisis de las secuencias de ADNmt de fósiles de neandertales.

ESTUDIOS DE ADN ANTIGUO

1. ORIGEN Y EXPANSIÓN DEL HAPLOGRUPO V DEL ADNmt: DATOS MOLECULARES DE POBLACIONES PREHISTÓRICAS DEL PAÍS VASCO

Como hemos mencionado inicialmente son varios los posibles acontecimientos demográficos que han modelado la variabilidad genética europea (primera colonización del *Homo sapiens* moderno, difusión de la economía neolítica y reexpansiones poblacionales tras la última glaciación). En relación al último proceso demográfico (las reexpansiones poblacionales), se ha propuesto una hipótesis migracionista para explicar el origen y expansión de uno de los linajes del ADNmt (haplogrupo V).

Esta hipótesis, propuesta por Torroni y cols (1998), considera que el haplogrupo V se originó en el Sudoeste de Europa y desde aquí se dio una expansión a otros lugares de Europa, en sentido Noreste, coincidiendo con la difusión de la cultura Magdaleniense, hace entre 10.000 y 15.000 años B.P

Los datos de ADNmt obtenidos por nosotros en diversas poblaciones prehistóricas del País Vasco, nos ha permitido discutir y matizar esta hipótesis de Torroni, establecida exclusivamente sobre la base de datos genéticos de poblaciones actuales (Izagirre y de la Rúa, 1999).

Hemos analizado los haplogrupos del ADNmt, en 4 colecciones esqueléticas que proceden de

distintos yacimientos del País Vasco (Vizcaya, Alava y Navarra), cuya cronología se sitúa entre el Neolítico y la edad del Bronce. En la tabla 1 se presentan los resultados obtenidos en los yacimientos prehistóricos del País Vasco. De estos datos resulta digno de destacar que en ninguno de los yacimientos prehistóricos analizados se han encontrado los haplogrupos I, V y W.

Yacimientos n*	H	I	J	K	U	V	W	T+X	Otros	N.D.
SJAPL (Alava) (n=63)	23	-	10	14	11	-	-	3	-	2
Pico Ramos (Bizkaia) (n=24)	9	-	4	4	3	-	-	4	-	-
Urratxa (Bizkaia) (n=5)	2	-	1	-	2	-	-	-	-	-
Longar (Navarra) (n=29)	11	-	-	6	4	-	-	4	2	2
Aizpea (Navarra) (n=1)	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-

n*: nº individuos analizados.

Tabla 1: Haplogrupos de ADNmt en grupos humanos prehistóricos del País Vasco. Frecuencias absolutas de los haplogrupos del ADNmt (Izagirre & de la Rúa, 2000).

La ausencia del haplogrupo V en poblaciones prehistóricas contrasta con las frecuencias descritas en la población actual del País Vasco, en donde encontramos valores que oscilan entre el 3.3 y 20% (Bertranpetit et al., 1995; Corte-Real et al. 1998; Torroni et al., 1998).

Este resultado contrasta asimismo con la hipótesis propuesta por Torroni et al. (1998), donde consideran que el haplogrupo V del ADNmt se originó en el Sudoeste de Europa a finales del Paleolítico Superior, hace 10.000-15.000 años.

Esta discrepancia en la frecuencia del haplogrupo V descrita en los grupos actuales y prehistóricos del País Vasco, puede tener diversas explicaciones (Izagirre y de la Rúa, 1999):

1) La existencia de heterogeneidad en la población del País Vasco. Los datos existentes sobre haplogrupos de ADNmt son escasos para discutir esta problemática. (se necesitaría un muestreo más amplio y una metodología de análisis más robusta).

2) Que el tiempo de origen del haplogrupo V fuera más reciente que el propuesto por Torroni y cols (1998): 10.000-15.000 B.P, lo que explicaría su ausencia en las muestras prehistóricas estudiadas. A este respecto existe un gran debate sobre el establecimiento de las tasas de divergencia. Valores entre un 7 y 22%/millón de año, registrados en la bibliografía conducirían a estimaciones de tiempos de divergencia muy variables.

3) Que el haplogrupo V fuera introducido en el País Vasco por un proceso de inmigración ocurrido hace menos de 4.000 años, que es la datación del yacimiento más reciente analizado en nuestro estudio.

A la vista de nuestros resultados sobre ADNmt, consideramos que la hipótesis de Torroni et al.

(1998) sobre el origen y expansión del haplogrupo V está poco fundamentada y resulta discutible la interpretación que hacen del registro arqueológico. Estos autores fundamentan, en parte, la pretendida “expansión poblacional” en el hecho de que el parecido existente en el arte y las industrias magdalenenses (10.000 B.P) del sudoeste de Francia y otras regiones europeas (Bélgica, el Rin, Suiza, Moravia y Polonia), podría explicarse por la existencia de una migración humana ocurrida a finales del Paleolítico.

Sin embargo, para nosotros resulta más aceptable considerar que simplemente se dio una expansión de las áreas de habitación en Europa después del último periodo glacial (~12.000-10.000 B.P), que ocurrió en dirección sur-norte, ya que la mejoría climática favoreció la ocupación de áreas (en norte y medio Europa), que hasta entonces habían estado escasamente habitadas por grupos de cazadores dispersos en amplios territorios (Straus, 1996).

Por tanto, en relación al origen y expansión del haplogrupo V, los datos de ADNmt obtenidos en las poblaciones prehistóricas, cuestionan la interpretación de Torroni en términos migracionistas. Una posible explicación es que:

- la mutación que define el haplogrupo V (4577 N/a III), pudo alcanzar valores muy elevados en algunas regiones del País Vasco (Gipúzkoa, 20%), por efecto de la deriva genética, lo que explicaría la heterogeneidad observada para este haplogrupo entre distintas muestras (entre 0 y 20%).

- estas variaciones en la frecuencia debieron ocurrir en el periodo pre-mesolítico (> 11.000 B.P) cuando el tamaño efectivo de los grupos humanos era suficientemente pequeño como para que la deriva genética tuviera un efecto apreciable

- esta explicación es compatible con la datación atribuida al origen de la mutación, pero no es preciso recurrir a modelos migracionistas para explicar su distribución en las poblaciones indoeuropeas.

Este trabajo sobre ADN en poblaciones prehistóricas muestra la importancia de disponer de datos genéticos de poblaciones antiguas para contrastar algunos de los supuestos asumidos en la interpretación de la historia evolutiva de las poblaciones. Pero sólo cuando se disponga de datos genéticos en un mayor número de poblaciones prehistóricas, se podrán plantear hipótesis interpretativas más concluyentes sobre la historia de las poblaciones humanas. En este sentido, nuestra investigación va encaminada al análisis de grupos humanos de la región cantábrica, área de gran interés por ser una de las zonas “refugio” del Mesolítico en el continente europeo, y por tanto fundamental para la resolución de las diversas hipótesis existentes actualmente, sobre la evolución de las poblaciones europeas.

2. ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE ADNmt EN RESTOS NEANDERTALES

El origen de la humanidad contemporánea ofrece aún gran número de incógnitas, sin embargo el desarrollo de nuevas metodologías de análisis ha permitido encauzar el debate existente desde principios de siglo. Los análisis realizados en algunos restos fósiles de neandertales, se plantearon la cuestión de si los neandertales se extinguieron al ser reemplazados por el *Homo sapiens* “moderno”, sin contribuir genéticamente a la línea evolutiva de la humanidad actual o si por el contrario hubo intercambio de genes, de forma que los neandertales contribuyeron en cierta medida al ADN de nuestro ancestro.

En 1997, por primera vez, se obtuvieron datos genéticos procedentes de fósiles neandertales. Primeramente se consiguió extraer y secuenciar un fragmento de ADNmt del neandertal procedente de la cueva de Feldhofer en Alemania (Krings et al., 1997 y 1999). Posteriormente, en el año 2000, se obtuvieron secuencias de ADNmt de otros 2 fósiles neandertales procedentes de la cueva de Mezmaiskaya en el Norte del Cáucaso (Ovchinnikov et al., 2000) y de la cueva de Vindija en Croacia (Krings et al., 2000).

Primer análisis molecular de un fósil neandertal: Feldhofer (Alemania)

El primer estudio molecular de un fósil neandertal se llevó a cabo en 1997 sobre el neandertal-tipo descubierto en 1856 en Feldhofer (Alemania) (Krings et al., 1997 y 1999). Este análisis requirió un laborioso proceso metodológico realizado en paralelo en dos laboratorios independientemente.

La extracción del ADN se realizó a partir de un fragmento de 0.4 g. de hueso cortical compacto. Se amplificaron 13 fragmentos cortos solapantes (de unas 105 pb) de la región control (HVR I) del ADNmt. Los productos amplificados fueron clonados en plásmidos y se secuenciaron 30 clones (123 fragmentos de secuencias). La comparación y alineamiento de los fragmentos permitió constituir una secuencia de 379 pb perteneciente al fósil neandertal.

La secuencia del fósil se comparó con una secuencia de referencia humana (secuencia consenso o de Anderson) y asimismo se comparó con 994 linajes mitocondriales pertenecientes a poblaciones humanas actuales y con 16 linajes de chimpances. Los resultados indicaron que las diferencias entre la secuencia del neandertal y la de los humanos actuales (27 ± 2.2 sustituciones) es aproximadamente tres veces la existente entre la media de los humanos actuales (8 ± 3.1) y es la mitad de la existente entre chimpancés y humanos (55 ± 3) (Figura 5).

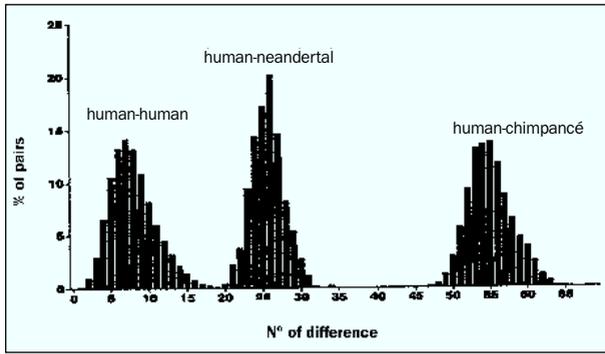


Figura 5: Comparación de las secuencias de ADNmt entre humanos actuales (994), el fósil neandertal de Feldhofer (1) y chimpancés (16), (Krings et al., 1997).

Para establecer la relación existente entre la secuencia de ADNmt del neandertal y los ADNmt de las poblaciones humanas actuales se realizó un **análisis filogenético**, cuyo resultado muestra que la divergencia de la secuencia del ADNmt del neandertal es anterior a la divergencia de los ADNmt de los humanos actuales (Figura 6).

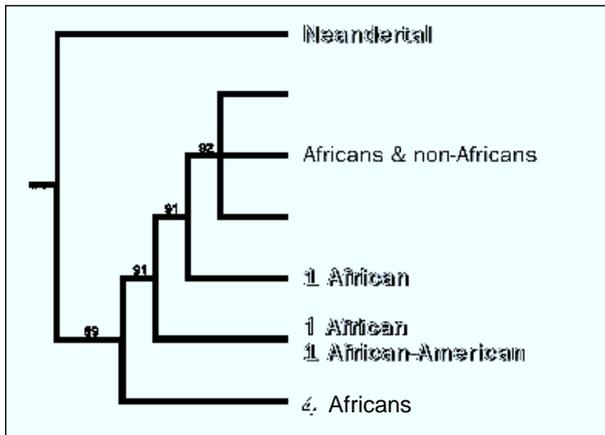


Figura 6: Árbol filogenético en el que se incluye la secuencia del ADNmt del neandertal de Feldhofer y 986 linajes humanos actuales (estructura esquemática obviando ramificación interna). Raíz del árbol: 16 linajes de ADNmt de chimpancé (Krings et al., 1997).

Este análisis filogenético concuerda con el establecido en base a la comparación entre pares de secuencias y la conclusión a la que se llegó es que la secuencia del ADNmt del neandertal se sitúa fuera de la variación del ADNmt de los humanos modernos.

Con estos datos genéticos calcularon la **edad del linaje mitocondrial del antecesor común de neandertal/humano moderno**, utilizando el principio del reloj molecular, según el cual la diferencia genética entre dos especies es una medida del tiempo transcurrido desde que divergieron de un antecesor común. La velocidad de evolución se estableció tomando como referencia la divergencia entre humanos y chimpancés (4-5 m.a.)

Se calculó una fecha de 550.000 - 690.000 B.P. para la divergencia de los linajes mitocondriales del neandertal y de los humanos modernos. Y una fecha de 120.000 - 150.000 B.P. para la edad

del antecesor común de los humanos modernos. Por tanto, la edad del antecesor común de neandertal/humano moderno es cuatro veces mayor que la de los humanos actuales.

Sobre la pregunta de si **existió intercambio de genes entre los neandertales y los primeros humanos modernos?**, los resultados del análisis molecular del neandertal atenúan esta posibilidad, pero no la excluyen. Los autores de este estudio consideran que medio millón de años de evolución independiente de dos formas humanas altamente especializadas, hacen improbable tal intercambio.

El análisis de más especímenes neandertales resultaba esencial para conocer la diversidad genética de estas formas humanas y la relación entre ellos y los humanos modernos.

Los neandertales de Mezmaiskaya (N. Cáucaso) y de Vindija (Croacia)

El neandertal del Mezmaiskaya (N. Cáucaso) es de los últimos ejemplares de esta especie, con una datación de 29.195 ± 965 BP. El ADN extraído presentaba una preservación excepcional, por lo que la amplificación se llevó a cabo en dos fragmentos solapantes de 232 y 256 pb y la secuenciación se realizó directamente, sin necesidad de clonación (Ovchinnikov et al., 2000).

La secuencia del ADNmt del neandertal del Cáucaso muestra una divergencia de 3.48% con respecto al de Alemania. Es decir hay 12 mutaciones entre ambas secuencias, valor más elevado que el que existe entre pares de secuencias de muestras actuales de los 3 continentes (menos de 1% de los pares de europeos y de asiáticos actuales difieren en 12 o más posiciones, y un 37% de los africanos difieren en 12 o más posiciones) (Tabla 2).

	Africanos	Asiáticos	Europeos	N.Feldhofer
Neandertales (Feld.y Vind.)	33.9±2.8	33.5±2.1	35.3±2.1	
Vindija				9
Mezmaiskaya				12

Tabla 2: Diferencias entre pares de secuencias (3 muestras neandertales: Feldhofer, Vindija y Mezmaiskaya, y 663 humanos actuales africanos, asiáticos y europeos) (Krings et al., 2000).

El análisis filogenético sitúa a los dos neandertales en un clado separado de los humanos modernos, lo que apoya la hipótesis de que existió muy poco flujo génico (intercambio de genes) entre neandertales y humanos modernos (Figura 7).

El neandertal del Vindija (Croacia), cuya datación es >42.000 B.P. fue secuenciado a partir de los fragmentos obtenidos por clonación (357 pb de HRVI y 288 de HRVII). La comparación de las secuencias de los neandertales de Vindija y de Feldhofer arrojó diferencias en 9 posiciones (Tabla

2). Por otro lado, se vio que sus secuencias no están más próximas a los europeos de lo que están a africanos y asiáticos, lo que puede considerarse una prueba a favor de la hipótesis de reemplazamiento.

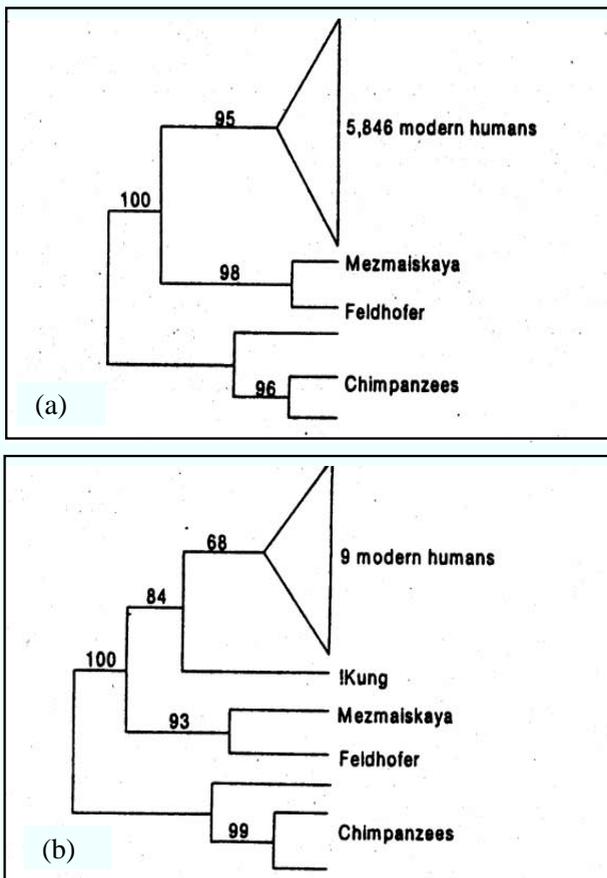


Figura 7: Relaciones filogenéticas de los dos neandertales (Feldhofer y Mezmaiskaya) y los humanos modernos. (a) Árbol neighbour-joining (5.846 muestras humanas actuales); (b) Árbol máxima parsimonia (3 muestras africanas, 3 asiáticas y 3 europeas elegidas al azar). Raíz del árbol establecida con 3 secuencias de chimpancés. Los nº señalan frecuencias bootstrap (%) a partir de 1,000 réplicas. (Ovchinnikov et al., 2000).

El árbol filogenético obtenido agrupa a ambos neandertales (Vindija y Feldhofer), separándolos de los humanos modernos (figura no mostrada). Estos resultados no excluyen la posibilidad de que hubiera habido cruzamientos entre neandertales y humanos modernos, pero muestran que incluso si los hubo, los linajes mitocondriales de los neandertales no han contribuido al pool génico de los humanos actuales.

En este debate, resulta necesario comparar las secuencias de ADNmt de los neandertales con las de fósiles de *Homo sapiens* moderno. Hasta el momento, el único trabajo publicado ha consistido en el análisis de secuencias del ADNmt de fósiles australianos de *Homo sapiens* moderno datados entre 8.000 y 62.000 años (Adcock et al., 2001).

La secuencia del fósil australiano LM3 (62.000 BP, *Homo sapiens* moderno) es muy divergente respecto a las de otros fósiles australianos analiza-

dos y a los humanos actuales. Este resultado plantea la problemática de la extinción de una línea de ADNmt que existió en un humano moderno (62.000 B.P) pero que está ausente en los australianos actuales. Sin embargo este análisis ha sido objeto de críticas y se necesitará de la existencia de mayor número de datos de fósiles del *Homo sapiens* moderno para valorar si hubo en alguna medida, intercambio genético entre ambas formas humanas (neandertal y hombre moderno).

AGRADECIMIENTOS

La realización de la parte de este trabajo correspondiente a nuestra investigación, ha sido posible gracias al proyecto de la UPV/EHU 00154.310-EA-8130/2000 y al proyecto del MCYT (BOS 2000-0408).

Agradecemos asimismo de los directores/as de los yacimientos que nos confiaron su estudio antropológico: Aizpea (A. Cava), Longar (J. Armandariz), Pico Ramos (L. Zapata), San Juan ante Portam Latinam (J.I. Vegas) y Urratxa (M. Muñoz).

BIBLIOGRAFÍA

- ADCOCK G.J., DENNIS E.S., HUTTLEY G.A., JERMIIN L.S., PEACOCK W.J., THORNE A. 2001. Mitochondrial DNA sequences in ancient Australians: implications for modern human origins. *Proceedings of National Academy Sciences USA* **98**, 537-542.
- AMMERMAN, A.J. & CAVALLI-SFORZA, L.L. 1984. *The Neolithic transition and the Genetics of population in Europe*. Princeton University Press. Princeton.
- ANDERSON, S., BANKIER, A.T., BARRELL, B.G., BRUIJIN, M.H.L., COULSON, A.R., DROUIN, J., EPERON, I.C., NIERLICH, D.P., ROE, B.A., SANGER, F., SCHREIER, PH., SMITH, A.J.H., STADEN, R. and YOUNG, I.G. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, **290**, 457-465.
- ANDERSON, S., BRUIJIN, M.H.L. DE, COULSON, A.R., EPERON, I.C., SANGER, F. and YOUNG, I.G. 1982. Complete sequence of bovine mitochondrial DNA. Conserved features of the mammalian mitochondrial genome. *Journal of Molecular Biology*, **156**, 683-717.
- ANDREWS R.M., KUBACKA I., CHINNERY PF., LIGHTOWLERS R.N., TURNBULL D.M.. 1999. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nature Genetics*, **23**, 147.
- AVISE, J.C. 2000. *Phylogeography. The history and formation of species*. Harvard University Press.
- BARBUJANI, G. (2002). Geographical patterns of nuclear and mitochondrial variation in Europe. *XV Congreso de Estudios Vascos*. Donostia 2001. En este volumen.
- BERTRANPETIT, J., SALA, J., CALAFELL, F., UNDERHILL, PA., MORAL, P. and COMAS, D. 1995. Human mitochondrial DNA variation and the origin of the Basques. *Annals of Human Genetics*, **59**, 63-81.

- BIBB, M.J., ETEN, R.A. van, WRIGHT, C.T., WALBERG, M.W. and CLAYTON, D.A. 1981. Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA. *Cell*, **26**, 167-180.
- BIRKY, C.W. JR., MARUYAMA, T. and FUERST, P. 1983. An approach to population and evolutionary genetic theory for genes in mitochondria and chloroplasts, and some results. *Genetics*, **103**, 513-527.
- CÔRTE-REAL, H.B.S.M., MACAULAY, V.A., RICHARDS, M.B., HARITI, G., ISSAC, M.S., CAMBON-THOMSEN, A., PAPIHA, S., BERRTRANPETIT, J. and SYKES, B. 1996. Genetic diversity in the Iberian Peninsula determined from mitochondrial sequence analysis. *Annals of Human Genetics*, **60**, 331-350.
- FOLEY, R. 1998. The context of human genetic evolution. *Genome Research*, **8**, 339-347.
- IZAGIRRE, N. y 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. *American Journal of Human Genetics*, **65**, 199-207.
- IZAGIRRE, N. y DE LA RÚA, C. 2000. Aportación de la biología molecular en el estudio antropológico de las poblaciones humanas del pasado: análisis del ADN mitocondrial. *Revista Española de Antropología Biológica*, **21**, 1-10.
- IZAGIRRE, N. y DE LA RÚA, C. 2001. Avances y aplicaciones en el estudio del ADN de restos paleontológicos. *Revista Española de Paleontología*, **16** (1), 89-97.
- IZAGIRRE, N., DURÁN, L.M., DE LA RÚA, C. (1998). Genética y Arqueología: Análisis molecular de ADN procedente de restos arqueológicos. *Munibe (Antropología-Arqueología)*, **50**, 3-14.
- KELMAN, Z. and MORAN, L. 1996. Degradation of ancient DNA. *Current Biology*, **6**, 223.
- KRINGS M., CAPELLI C., TSCHENTSCHER F., GEISERT H., MEYER S., VON HAESELER A. GROSSSCHMIDT K., POSSNERT G., PAUNOVIC M. 2000. A view of the Neandertal genetic diversity. *Nature Genetics* **26**, 144-146
- KRINGS, M., GEISERT, H., SCHMITZ, R.W., KRAINITZ, H. and PÄÄBO, S. 1999. DNA sequence of the mitochondrial hypervariable region II from the Neandertal type specimen. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **96**, 5581-5585.
- KRINGS, M., STONE, A., SCHMITZ, R.W., KRAINITZ, H., STONEKING, M. and PÄÄBO, S. 1997. Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell*, **90**, 19-30.
- LINDAHL, T. 1993. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, **362**, 709-715.
- OVCHINNIKOV, I.V., GÖTHERSTRÖM, A., ROMANOVA, G.P., KHARITONOV, V.M., LIDÉN, K. and GOODWIN, W. 2000. Molecular analysis of Neandertal DNA from the northern Caucasus. *Nature*, **404**, 490-493.
- RICHARDS, M.; MACAULAY, V., HICKEY, E.; VEGA E.; SYKES, B.; GUIDA, V.; RENGÓ, C.; SELLITO, D.; CRUCIANI, F.; ...; TORRONI A.; BANDEL, H.J. 2000. Tracing European founder lineages in the Near eastern mtDNA pool. *American Journal of Human Genetics*, **67**, 1251-1276.
- RICHARDS M.; CORTE-REAL H., FORSTER P; MACAULAY V.; WILKINSON-HERBOTS H.; DEMAINE A.; PAPIHA S.; HEDGES R.; BANDEL H.-J.; SYKES B. 1996. Paleolithic and Neolithic lineages in the European mitochondrial gene pool. *American Journal of Human Genetics*, **59**, 185-203.
- RICHARDS M.B.; MACAULAY V.A.; BANDEL H.-J.; SYKES B.C. 1998. Phylogeography of mitochondrial DNA in western Europe. *Annals of Human Genetics* **62**, 241-260.
- SIMONI L.; CALAFELL F.; PETTENER D.; BERTRANPETIT J.; BARBUJANI G. 2000. Geographic patterns of mtDNA diversity in Europe. *American Journal of Human Genetics*, **66**, 262-278.
- STONEKING, M. 1993. DNA and recent human evolution. *Evolutionary Anthropology* **2**, 60-73.
- STRAUS, L (1996). *Humans at the end of the Ice Age*. Plenum Publishing, New York.
- TORRONI A.; HUOPONEN K.; FRANCALACCI P; PETROZZI M.; MORELLI L.; SCOZZARI R.; OBINU D.; SAVONTAUS M.-L.; WALLACE D.C. 1996. Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations. *Genetics*, **144**, 1835-1850.
- TORRONI A.; SCHURR T.G., CABELL M.F.; BROWN M.D.; NEEL J.V.; LARSEN M.; SMITH D.G.; VULLO C.M.; WALLACE D.C. 1993. Asian affinities and continental radiation of the four founding Native American mtDNAs. *American Journal of Human Genetics*, **53**, 563-590.
- TORRONI, A., BANDEL, H.J., D'URBANO, L., LAHERMO, P., MORAL, P., SELLITO, D., RENGÓ, C., FORSTER, P., SAVONTAUS, M.L., BONNÉ-TAMIR, B. AND SCOZZARI, R. 1998. mtDNA analysis reveals a major late Paleolithic population expansion from southwestern to northeastern Europe. *American Journal of Human Genetics*, **62**, 1137-1152.
- TUROSS, N. 1994. The biochemistry of ancient DNA bones. *Experientia* **50**, 530-535.
- ZVELEBIL M. 1986. Mesolithic prelude and Neolithic revolution. In Zvelebil M. (eds). *Hunter in transition. Mesolithic societies of temperate Eurasia and their transition to farming*. Cambridge University Press, pp 5-16.