

Análisis de haplogrupos de DNAm_t en restos dentales del Neolítico y Bronce catalán

GARCÍA SÍVOLI C¹⁻², MONTIEL R¹⁻³,
MALGOSA MORERA A¹

Rev. Esp. Antrop. Fís. (2003/4) **24**: 109-122

Aceptado: 2 marzo 2005

¹ Departament de Biologia Animal de Biologia Vegetal i d'Ecologia, Unitat d'Antropologia, Universitat Autònoma de Barcelona, España.

² Facultad de Odontología, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

³ CIRN e Departamento de Biologia. Universidade dos Açores, Portugal

Palabras clave: Haplogrupos mitocondriales, ADN antiguo, piezas dentales, Neolítico, Bronce, Catalunya

En este trabajo se presentan los resultados del análisis de ADN mitocondrial (mtDNA) de restos humanos del yacimiento prehistórico de Mas d'en Boixos (Penedés, Barcelona). El objetivo del presente estudio es aportar datos para la caracterización, desde el punto de vista molecular, de la población antigua de Cataluña. Se procedió a la extracción de ADN de 18 dientes de 17 individuos (5 neolíticos y 12 del bronce). Fueron analizados 9 sitios de restricción (PCR / RFLPs) de la zona codificante del mtDNA para examinar la distribución de los haplogroups europeos. También, se amplificó y secuenció un segmento de región HVI (16190-16420) del D- Loop a partir de cuatro fragmentos solapantes. Los datos obtenidos sirven para entender la variación en el tiempo y el espacio del mtDNA en las poblaciones antiguas de la región de Cataluña, así como las relaciones filogenéticas con otras poblaciones.

© 2004 Sociedad Española de Antropología Física

Introducción

El DNA mitocondrial (DNAm_t) humano es un genoma circular de aproximadamente 16.569 pares de bases de longitud y cuya secuencia es conocida en su totalidad (Anderson *et al.*, 1981). La mayor parte de este genoma codifica para 37 genes (2 ARNr, 22 ARNt y 13 proteínas). Pero contiene también una zona que no codifica ningún gen; es un pequeño fragmento de unos 1.100 pb que representa alrededor del 7% del DNAm_t, conocido como región de control o D-Loop. El hecho de que esta región no sea codificante es relevante porque no está sujeta a una gran presión selectiva, lo que aumenta la probabilidad de encontrar diferencias al comparar individuos; y, por lo tanto, es de particular importancia en estudios poblacionales (Montiel, 2001).

El DNAm_t, conocido también "como el otro genoma humano" (Johns, 1995), presenta unas características muy particulares que lo diferencian del nuclear y le confiere cierta ventaja en el estudio de las relaciones de las poblaciones humanas. Entre esas características podemos citar:

- Herencia materna (Lodish *et al.*, 1995): de este modo, las mutaciones se acumulan de manera secuencial en la radiación de las diferentes líneas maternas (Johnson *et al.*, 1983). Sin embargo, un estudio reciente sobre la miopatía mitocondrial, realizado en un paciente de 28 años, reveló que esta afección fue transmitida por vía paterna (Schwartz y Vissing., 2002), A pesar que se trata de un caso muy puntual, establece alguna duda sobre la heredabilidad exclusivamente materna del DNAm_t.

- Presenta una alta tasa de mutación (10 veces superior al promedio del DNA nuclear), especialmente, dentro de la región de control o D-Loop (Elson *et al.*, 2001), lo que permite observar diferencias incluso entre poblaciones estrechamente emparentadas (Izaguirre, 1988).
- Cada célula eucariota presenta entre 3.000 y 5.000 copias del genoma mitocondrial, lo cual favorece su conservación y recuperación.

Por consiguiente, durante más de dos décadas los investigadores de diferentes disciplinas, han estado utilizando datos procedentes del DNA_{mt} para reconstruir la historia evolutiva del hombre y de otras especies (Lewin, 1994; Wallace, 1997; Cavalli-Sforza, 1998; Kiberstis, 1999; Stoneking, 1990; Lalueza *et al.*, 2002).

Así mismo, han surgido abundantes trabajos relacionados con el análisis del DNA_{mt} que tienen como objetivo estudiar el origen, la variabilidad genética y las migraciones de distintas poblaciones antiguas (Pääbo y Wilson, 1988; Rogan y Salvo, 1990; Hagelberg *et al.*, 1991; Horai *et al.*, 1993; Haeseler *et al.*, 1995; Hänni *et al.*, 1995; Ribeiro-Dos-Santos *et al.*, 1996; Morell, 1998; Torroni *et al.*, 1998, 2001; Quintana-Murci *et al.*, 1999; Montiel, 2001; Saillard *et al.*, 2000; Gibbons, 2001; Kaestle y Smith, 2001; Pennisi, 2001; Relethford, 2001; Derbeneva *et al.*, 2002; Ingman, *et al.*, 2000), y modernas (Torroni *et al.*, 1992, 1996; Corte-Real *et al.*, 1996; Easton *et al.*, 1996; Macaulay *et al.*, 1999; Melton *et al.*, 1997; Pereira *et al.*, 2000; Simoni *et al.*, 2000; Stoneking, 2000; Brakez *et al.*, 2001; Elson *et al.*, 2001; Finnilä *et al.*, 2001; Watkins *et al.*, 2001; Malhi *et al.*, 2002; Oota *et al.*, 2002; Santos, 2002; Yao *et al.*, 2002). Estos trabajos atestiguan que el DNA mitocondrial, al igual que la región no recombinante del cromosoma Y (Mesa *et al.*, 2000; Malaspina *et al.*, 1998; Underhill *et al.*, 2000; Chikhi *et al.*, 2002), puede ser utilizado como marcador genético, siendo muy eficaz en el estudio de la historia filogenética de las poblaciones humanas (Martínez-Conde y Mayor, 2002).

Desde comienzos de la década de los ochenta se ha estudiado la posibilidad de recuperar el DNA de restos antiguos. De hecho, se ha logrado secuenciar DNA de un abundante número de organismos, entre ellos podemos nombrar: el cuagga (*Equus quagga*) a partir de un tejido taxidermizado (Higuchi *et al.*, 1984); restos humanos congelados (Monsalve, *et al.*, 2002), y los más célebres, por su importancia dentro del estudio de la evolución de la especie humana, el *Homo neanderthalensis* (Kriings *et al.*, 1997, 1999; Ovchinnikov *et al.*, 2000; Schmitz *et al.*, 2002). Así, la recuperación y análisis de DNA de restos preservados natural o artificialmente ha constituido un nuevo campo de investigación científica denominado DNA antiguo o “ancient DNA”. Al respecto, podemos acotar que el desarrollo de la técnica para la replicación *in vitro* del DNA mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa ó PCR, ha proporcionado una de las herramientas más poderosas en el campo del DNA antiguo, pues permite obtener millones de copias de un segmento determinado a partir de pocas moléculas, e incluso en teoría a partir de una sola (Mullis y Faloona, 1987).

Recientemente la publicación de las secuencias de DNA antiguo del yacimiento paleontológico de Mungo (Australia) ha causado controversia entre los investigadores. Esta nueva polémica se centra en aspectos tales como la preservación del DNA (Caldararo, 2002). En este sentido, dentro de los estudios de la preservación del DNA en restos esqueléticos, la posibilidad de recuperar DNA a partir de las piezas dentales es particularmente interesante, pues la extrema dureza del esmalte dental hace que sean todavía más resistentes que los huesos y en consecuencia ofrecen grandes ventajas en comparación con el tejido óseo, resultando ser un resto biológico de gran utilidad, pues puede presentar una buena eficiencia en la recuperación y amplificación de DNA (Montiel, 2001).

La posibilidad de obtener datos de polimorfismos genéticos en material óseo y particularmente del dentario de procedencia arqueológica, permiten un nuevo enfoque en la interpreta-

ción de la variabilidad genética de las poblaciones del pasado (Izaguirre, 1998). Para ello es necesario identificar, en las muestras analizadas, el haplogrupo al que pertenece su DNA mitocondrial y de ser posible el haplotipo. Un haplogrupo es un conjunto monofilético de tipos mitocondriales que comparten características comunes y que puede ser identificado con enzimas de restricción, que indican la presencia o ausencia de sitios de corte distribuidos alrededor del genoma mitocondrial (Torrioni *et al.*, 1996). Por su parte, los haplotipos son definidos por la secuencia del DNA, así que una caracterización completa requiere la secuenciación de todo el genoma. No obstante, se ha demostrado que la caracterización de los haplotipos mediante la secuenciación de la región de control, es un método útil para estudios filogenéticos (Vigilant *et al.*, 1991) y muy adecuado en la caracterización de DNA antiguo (Stone y Stoneking, 1998; Montiel, 2001).

Resulta interesante destacar que existe una correlación entre la presencia y ausencia de sitios de restricción que definen los haplogrupos y determinados polimorfismos en la secuencia de la región de control. Esta correlación ha sido observada por diversos investigadores en individuos de distintas partes del mundo (Chen *et al.*, 1995; Torrioni *et al.*, 1996; Macaulay *et al.*, 1999) y puede ser utilizada para autenticar el DNA mitocondrial antiguo (Stone y Stoneking, 1998; Montiel *et al.*, 2001; Montiel, 2001).

En la presente investigación se estudia el DNA procedente de los restos dentarios del yacimiento arqueológico de Mas d' en Boixos, situado en el municipio de Pacs (Alt Penedés). Las diversas excavaciones de urgencia realizadas desde 1997 han permitido la localización de más de 200 estructuras, cuya cronología abarca desde el Neolítico antiguo cardial hasta época Ibérica (Bouso *et al.*, 2001).

El estudio antropológico del yacimiento, se ha basado hasta el momento en el análisis de 5 individuos de época Neolítica y 39 del Bronce; de estos últimos, 24 proceden de una única estructura: un hipogeo de enterramiento colectivo, mientras que el resto se halló en tumbas individuales o dobles. La serie estudiada refleja una población con un sistema de economía mixta de pastoreo y, posiblemente, con una relativa aportación de alimentos provenientes de actividades agrícolas (Alfonso *et al.*, 2004). Las características morfológicas se han analizado a la luz de la comparación con series poblacionales. El análisis genético también podría contribuir a explicar las relaciones interpoblacionales de la población de Mas d' en Boixos en el contexto de las poblaciones catalanas y peninsulares del II y III milenio. Además, los cambios que se reflejan en las poblaciones en relación a los aspectos culturales, no siempre proceden de la introducción de nuevos genomas en el pool genético de la población; es posible que provoquen cambios en él debido a la endogamia, selección, etc.

Por otro lado, los datos obtenidos a partir del estudio antropológico indican que los individuos del Bronce forman un grupo homogéneo. Sin embargo, los individuos procedentes del hipogeo presentan un ritual funerario diferente. Diversas hipótesis han sido planteadas al respecto:

- I) Se trata de un episodio puntual con un incremento de la tasa de mortalidad, lo que provocaría la necesidad de inhumar una gran cantidad de individuos simultáneamente.
- II) Los individuos inhumados en el hipogeo pertenecen a un grupo social diferente y, por lo tanto, recibían un tratamiento específico en el momento de la muerte.
- III) Los individuos inhumados en el hipogeo presentan algún tipo de relación de parentesco.

En consecuencia, el análisis de las secuencias y de los haplogrupos del DNAMt de los restos dentales provenientes del yacimiento de Mas d' en Boixos nos permitirá, en primer lugar, profundizar y ampliar el conocimiento que hasta ahora se tiene del proceso neolitizador de la

región. En tal sentido, el objetivo general de este trabajo de investigación, es caracterizar genéticamente, a través del estudio del DNAm, la población esquelética de Mas d' en Boixos; contribuyendo, así, en la reconstrucción filogenética de las poblaciones antiguas de la región de Cataluña. En segundo lugar, se pretende analizar la existencia de eventuales cambios en la etapa del Bronce y finalmente determinar si los individuos del hipogeo guardan algún tipo de relación de parentesco.

Material y método

De un total de 44 individuos (39 del Bronce y 5 del Neolítico) estudiados del yacimiento de Mas d' en Boixos, se seleccionaron para la extracción y análisis del DNAm 18 piezas dentales de 17 individuos, 5 del Neolítico y 12 del Bronce. Todos los individuos del Bronce pertenecen al Hipogeo o estructura 35; los individuos del Neolítico pertenecen a entierros individuales y dobles. La diferencia entre el número total de individuos del Bronce (39) y el número de individuos analizados en el presente estudio (12) obedece, únicamente, a los criterios de selección de las piezas dentales. Al seleccionar los dientes se evitó escoger dientes con fisuras profundas y patologías extensas (caries, por ejemplo) que comprometieran la integridad de la cámara pulpar. De igual manera, se evitó seleccionar, en la medida de lo posible, piezas dentales con un desarrollo incompleto del tercio apical radicular, así como aquellas piezas dentales tratadas con sustancias químicas usadas para la preservación y restauración de restos óseos ya que pueden ser, también, fuentes de contaminación (Nicholson, *et al.*, 2002). Para ello se contó con la ayuda de una lupa estereoscópica de 10 aumentos con luz incidente (Olympus S260). Esta cuidadosa selección, al igual que la separación de las fases de trabajo: en pre y post-PCR, entre otras consideraciones metodológicas para prevenir y detectar la contaminación en DNA antiguo (Montiel *et al.*, 2001), es útil para disminuir el riesgo de amplificar DNA contaminante procedente tanto de fuentes naturales como de amplificaciones previas (*carryover*). En los dientes que presentan estas condiciones se espera una mejor preservación del DNA (DeGusta *et al.*, 1994). Los dientes se sumergieron en ácido acético al 30%. Seguidamente se lavaron con agua ultrapura (Milli-Q), se sumergieron en hipoclorito de sodio al 10%; y por último, se irradiaron con luz ultravioleta (254nm) durante 10 min por cada lado. Para la extracción y amplificación del DNA se siguieron los procedimientos descritos por Montiel (2001). Las extracciones fueron llevadas a cabo en grupos de 6 y 7 muestras, más un control negativo de extracción (blanco de extracción). Los extractos resultantes fueron sujetos a amplificación, añadiendo en el proceso un control negativo de reactivos de PCR (blanco de PCR). Cuando fue necesario realizar una reamplificación mediante una segunda ronda de PCR, se utilizó un control de reamplificación del extracto (blanco de reamplificación). A partir de cuatro fragmentos solapantes (Tabla 1), fue amplificado, purificado y secuenciado un segmento de 231 bp de la región Hipervariable I (HVS I) del D-Loop.

Fragmento	Primers
G - 119 pb	L16303: 5'-AAACCTACCCACCCCTTAACAG-3' H16379: 5'-CAAGGGACCCCTATCTGAGG-3'
C - 125 pb	L16209: 5'-CCCCATGCTTACAAGCAAGT-3' H16291: 5'-TACTATGACTGTTAAGGGTGG-3'
D - 125 pb	L16313: 5'-CACCCCTAACAGTACATAGTAC-3' H16401: 5'-TGATTTACAGGAGGATGGTG-3'
B - 130 pb	L16287: 5'-CACTAGGATACCAAAACC-3' H16379: 5'-CAAGGGACCCCTATCTGAGG-3'

Tabla 1. Fragmentos solapantes y sus respectivos *primers* utilizados en la amplificación y secuenciación del segmento del D-Loop. Las coordenadas indican la posición del nucleótido en 3' relativamente a la secuencia de referencia de Cambridge

Para la alineación se ha seguido la numeración de la secuencia de referencia de Cambridge (CRS) (Anderson *et al.* 1981).

La secuenciación fue llevada a cabo en el Departamento de Genética y Microbiología de la UAB. Se utilizó un secuenciador automático Alflexpress (Pharmacia) usando el *primer* H-16379 para el fragmento B; el L-16209 para el fragmento C; el H-16401 para el fragmento D y el H-16379 para el fragmento G. Las secuencias fueron alineadas a partir de

los cromatogramas de la secuencia directa y reversa, utilizando para ello el programa BioEdit Versión 5.0.9 (Hall, 1999) y usando como referencia la secuencia de Cambridge (CRS) (Anderson *et al.*, 1981). Así mismo, se recurrió a la clonación como técnica alternativa para la secuenciación de las muestras usándose para la reacción un vector plasmídico (pGEM-T), la enzima T4 DNA ligasa, y células competentes \propto DH5 (*Escherichia coli*). Al igual que la secuenciación, la clonación se realizó en el Departamento de Genética y Microbiología de la UAB.

Haplogrupos	Sitios polimórficos								
	1715 <i>Dde I</i>	4577 <i>Nla III</i>	7025 <i>Alu I</i>	8994 <i>Hae III</i>	9052 <i>Hae II</i>	10394 <i>Dde I</i>	12308 <i>Hinf I</i>	13704 <i>Bst 0I</i>	15606 <i>Alu I</i>
X	-	+	+	+	+	-	-	+	-
I	-	+	+	+	+	+	-	+	-
V	+	-	+	+	+	-	-	+	-
H	+	+	-	+	+	-	-	+	-
W	+	+	+	-	+	-	-	+	-
K	+	+	+	+	-	+	+	+	-
U	+	+	+	+	+	-	+	+	-
J	+	+	+	+	+	+	-	-	-
T	+	+	+	+	+	-	-	+	+

Tabla 2. Definición de los haplogrupos sobre la base de la presencia (+) o ausencia (-) de los sitios de restricción analizados (descritos por Montiel, 2001). Numeración según la secuencia de referencia de Cambridge.

Para el análisis de los haplogrupos fueron usados 9 sitios polimórficos de restricción (RFLPs): X,I -1715 *DdeI*, V -4577 *NlaIII*, H -7025 *Alu I*, W -8994 *Hae III*, K -9052 *Hae II*, EUR -10394 *DdeI*, U +12308 *HinfI*, J -13704 *Bst0I*, y T -15606 *Alu I*., presentados en la Tabla 2. El número indica la posición de la diana de restricción siguiendo la numeración de Anderson y col. (1981). Estos sitios, entre otros, permiten definir 9 haplogrupos europeos. Para analizar estos lugares polimórficos se emplearon 9 pares de *primers*, descritos en la Tabla 3. Los resultados, en cuanto a la frecuencia de haplogrupos, fueron comparados con los de otras poblaciones antiguas usando el test exacto de Fischer (Raymond y Rousset, 2001). Las series consideradas fueron: tres series Vascas datadas entre el Neolítico y la edad del Bronce: Longar, Nafarroa (Neolítico), (LON); Pico Ramos, Bizkaia (Calcolítico), (PR) y Urratxa, Bizkaia (Bronce), (URR), (Izaguirre y De la Rúa, 1999); y por otro lado, una muestra de una villa medieval de Cataluña (Plaça Vella, Terrassa), (Montiel, 2001). Los datos moleculares de poblaciones antiguas del Bronce y fundamentalmente del Neolítico Catalán son inexistentes. Por esta razón, se tomó como referencia series del Neolítico y Bronce español correspondientes al País Vasco y así, poder observar, semejanzas o diferencias moleculares de la población antigua de Mas d'en Boixos, con otras relacionadas temporalmente.

La muestra Medieval de Cataluña se tomó en cuenta debido a que son los únicos datos existentes, hasta ahora, de poblaciones antiguas en la región. Además de las poblaciones antiguas, se incluyó en el análisis comparativo series de poblaciones europeas actuales; a saber: Galicia (GALI), (Salas *et al.* 1998); y Barbagia (BAR), una población de la Cerdeña central, (Francalacci *et al.*, 1999). Estas poblaciones fueron seleccionadas debido a la alta frecuencia del haplogrupo H observadas en las mismas y en correspondencia con los resultados del presente análisis (ver Resultados y Discusión). Como uno de los autores del presente trabajo (CG) es potencialmente la principal fuente natural de contaminación (Hummel y Herrmann, 1994; Keyser-Tracqui *et al.*, 2002), es importante identificar y secuenciar el DNA del mismo. A partir de una muestra de sangre se amplificó un segmento de 443 pb de la región HVSI situado entre las posiciones 16978 y 16420, se utilizaron los *primers* L15997 y H16401, y las condiciones de amplificación descritas

Sitios polimórficos	Primers
1715 <i>Dde I</i>	L1698: 5'-TAGCCCCAAACCCACTCCAC-3' H1776: 5'-CTTTCCTTGCGGTACTATATC-3'
*4577 <i>Nla III</i>	L4538: 5'-CACTCATCACAGCGCTAAGC-3' H4621: 5'-TGGCAGCTTCTGTGGAAC-3'
*7025 <i>Alu I</i>	L6968: 5'-CCGTAGGTGGCCTGACTGGC-3' H7052: 5'-TGATGGCAAATACAGTCCT-3'
*8994 <i>Hae III</i>	L8927: 5'-TTCTTACCACAAGGCACACC-3' H9014: 5'-AGGTGGCCTGCAGTAATGT-3'
9052 <i>Hae II</i>	L9020: 5'-ACGCCTAACCGCTAACATTAC-3' H9082: 5'-AGATGATAAGTGTAGAGGGAAG-3'
*10394 <i>Dde I</i>	L10366: 5'-ATCCTAGCCCTAAGTCTGGC-3' H10420: 5'-GTCGAAATCATTCGTTTTGT-3'
*12308 <i>Hinf I</i>	L12237: 5'-CACAAGAACTGCTAACTATGC-3' H12309: 5'-ATTACTTTTTATTGGAGTTGCCAAGATT-3'
13704 <i>Bst OI</i>	L13640: 5'-TCACCCTAACAGGTCAACC-3' H13720: 5'-ATGAGAAATCCTGCGAATAG-3'
15606 <i>Alu I</i>	L15561: 5'-CCCACATCAAGCCGAATG-3' H15625: 5'-GATGAGGATGGATAGTAATAGG-3'

Tabla 3. Sitios de restricción, y las secuencias de los respectivos primers utilizados en el análisis, * descritos por Montiel (2001)

individuos (MB 00 99-202.2; MB E35. I. 3 y MB E35. I. 4) de un tamaño de: 51 pb (C); 55 pb(C) y 94 pb(D) de longitud. El tamaño reducido de las secuencias se debe fundamentalmente a los problemas inherentes a la secuenciación de fragmentos cortos y por otro a la baja eficiencia de la secuenciación a partir de cantidades de DNA sub-óptimas. Sin embargo, el análisis de las secuencias obtenidas, mostró la ausencia de diferencias con la secuencia de referencia de Cambridge (CRS) (Anderson *et al.*, 1981) (Tabla 4). Es de destacar que el reducido tamaño de las secuencias no permitió hacer una inferencia fiable del haplogrupo al que podrían pertenecer. A pesar de ello, cabe destacar que la secuencia del individuo MB 00 99-202.2 es la más antigua publicada en la actualidad en restos peninsulares. En vista de los resultados tan exiguos alcanzados por el método de secuenciación directa, se recurrió a la clonación como técnica alternativa. 6 amplificaciones del segmento B (130 pb) fueron sometidas a esta técnica; no obstante, los resultados fueron negativos. La baja eficiencia de la clonación de fragmentos amplificados a partir del DNA antiguo puede ser debida a la escasa cantidad que se produce durante la PCR; lo que está en relación con la fragmentación y mala preservación del mismo, hecho este descrito por varios investigadores (Handt *et al.*, 1994; Pääbo y Wilson, 1988). Con respecto a los haplogrupos, todos los individuos se analizaron para H, K, así como para la mutación 10934 (EUR). En los extractos correspondientes a los individuos, MB 00-128; MB E35. I. 7 y MB E35. I. 11, no se analizaron más haplogrupos debido a la falta de eficiencia en las amplificaciones anteriores (Tabla 5). Los demás extractos se analizaron hasta la caracterización, al menos, de dos sitios de restricción. Los extractos relacionados con los individuos, MB 00-88.2; MB00 99-202.2 y MB E35. I. 3 no se han podido caracterizar completamente debido, fundamentalmente, a que los extractos estaban agotados. Es importante destacar, a efectos de la autenticación, que en los dos extractos del individuo MB 00-88.1, se obtuvo el mismo resultado. Se caracterizaron 11 extractos (10 individuos) y se obtuvieron resultados parciales para 4 individuos, mientras que para 3 fue imposible amplificar ninguno de los fragmentos ni siquiera los de la región control o D-Loop. Así pues, se ha podido determinar el haplogrupo de 10 individuos. Todos ellos pertenecen al haplogrupo H, el haplogrupo más frecuente en la serie del Bronce y también en la po-

por Pereira *et al.* (2000). La amplificación automática se ha efectuado utilizando la técnica desarrollada por Applied Biosystems en un secuenciador ABI 373 A Stretch. La secuencia fue alineada manualmente usando la secuencia de referencia de Cambridge (CRS, Anderson *et al.*, 1981).

Resultados y discusión

De los 18 extractos analizados (en uno de los casos -MB 00-88.1- se repitió la extracción) únicamente a partir de 10 fue posible amplificar (Figura 1), purificar y secuenciar fragmentos del D-Loop. Solamente se obtuvieron 3 secuencias (dos del segmento C, 125 pb y una del segmento D, 125 pb) de tres

blación europea actual (Figura 2, Tabla 5). Los resultados globales de Mas d' en Boixos muestran una elevada frecuencia del haplogrupo H. La elevada frecuencia del haplogrupo H encontrada en las muestras de nuestro estudio es consistente con la descripción de los principales linajes del genoma mitocondrial desde las primeras expansiones humanas en la Península Ibérica (Maca-Meyer *et al.*, 2001). En el próximo Oriente se ha hallado una mayor diversidad de la secuencia de los sujetos que presentan el haplogrupo H, calculándose por tanto, tiempos de divergencias mayores, lo que ha llevado a la conclusión de que este haplogrupo se originó en el Próximo Oriente hace 25.000-30.000 años desde donde se expandió posteriormente hacia Europa (Torroni *et al.*, 1998), por lo tanto, no es de extrañar el encontrar una representatividad elevada del haplogrupo H en las muestras objeto de nuestro estudio (Figura 3). La distribución de los haplogrupos, así como los resultados del test exacto de Fischer entre las frecuencias de haplogrupos de las diferentes poblaciones antiguas se presentan en las Tablas 6 y 7. Para esta prueba, las muestras que presentaban haplogrupos indeterminados de las series de Mas d' en Boixos (MBN, MBB) y de la serie Vasca de Longar, Nafarroa (LON) fueron excluidas.

Debido a el tamaño de la muestra (N=5) del Neolítico de Mas d' en Boixos (MBN), la misma no presentó diferencias con otras poblaciones antiguas (Tabla 7), con la excepción de la población del Bronce de Mas d' en Boixos (MBB). La población del Bronce mostró diferencias significativas con 3 de las 5 muestras con las que fue comparada debido probablemente a la alta frecuencia del haplogrupo H. Los datos combinados de Mas d' en Boixos (MBT) no presentaron diferencias significativas con ninguna de las otras muestras aquí analizadas. Estos resultados

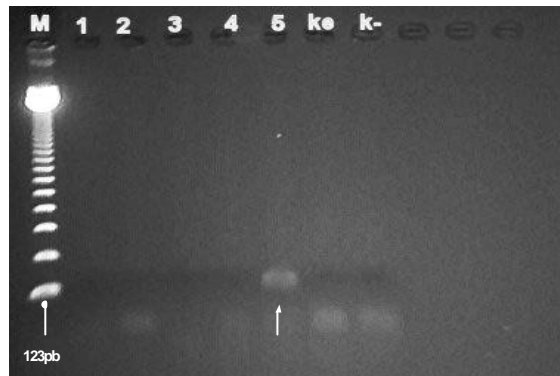


Figura 1. Electroforesis de amplificación del segmento C del D-Loop de 5 extractos (carriles 1-5) de DNA antiguo, el respectivo blanco de extracción (KE) y el blanco de PCR (K-); M, marcador de peso molecular (múltiplos de 123pb). En el carril 5 se observa la amplificación del extracto correspondiente al individuo MB OO 99-202.2

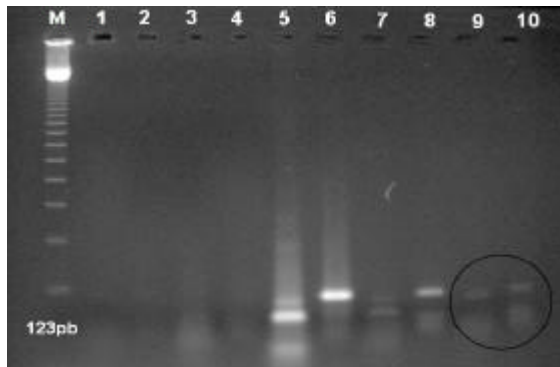


Figura 2. Caracterización del haplogrupo H mediante el análisis del sitio de restricción: - 7025 *Alu* I. Cada muestra se colocó pareada en el siguiente orden: digerida, no-digerida. En los primeros carriles (1-4) correspondientes a las muestras: MBOO.88.1 y MBOO.88.2, no se logró visualizar la digestión. En los Carriles 5 y 6, correspondientes al control positivo, y carriles 7 y 8, correspondientes a la muestra MBOO.99.202.2, se observan dos bandas, la banda de menor tamaño indica la digestión en el lugar polimórfico (+, no H). En la muestra MBE35.1.1 (carriles 9y10) no se observa digestión (-); la diferencia de tamaño entre las bandas (en círculo negro) se debe a la digestión del sitio no polimórfico que presenta este fragmento. Por lo tanto, el individuo MBE35.1.1 pertenece al haplogrupo H.

muestran una escasa variabilidad, en cuanto a los haplogrupos, de la serie de Mas d' en Boixos. Sin embargo, existen series europeas actuales que muestran una alta frecuencia del haplogrupo H, como son Galicia (GALI) con un 63 % y Barbagia (BAR) con un 64 %, y por ello se han escogido para establecer un análisis comparativo. Esta alta frecuencia puede estar relacionada con la endogamia, incrementada, principalmente, por factores culturales o por el aislamiento geográfico. En la Tabla 8 se presenta el análisis de significancia, en función de la distribución del haplogrupo H, entre Mas d' en Boixos Bronce (MBB), las poblaciones Europeas mencionadas anteriormente y una muestra de la población actual de Cataluña (CAT). En lo que respecta a nuestro estudio, no existe afinidad del haplogrupo de unos de los autores (CG) del trabajo con ninguno de los haplogrupos obtenidos. Quedando así descartada cualquier contaminación con el del DNAm_t del autor del trabajo de laboratorio (ver Tabla 4).

			POSICIÓN													
			1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	HAPLOGRUPO
			6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	CHARACTERIZADO
			1	1	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	POR RFLPs
			6	8	3	4	6	9	9	9	0	2	8	8	8	
			3	9	6	0	9	0	1	3	3	0	7	7	7	
EXT	INDIVI.	SEQ.	A	T	T	A	C	C	C	C	A	A	G			
		CRS	A	T	T	A	C	C	C	C	A	A	G			
		SCG	G	C		T	
5	MB.202.2	C.5				<	?	.	>						I, J, o K	
8	MB.E35.13	D.18								<	.	.	.	>	H	
9	MB.E35.14	C.15			<	>					I, J, o K	

Tabla 4. Secuencias amplificadas de la región control de tres individuos de Mas d' en Boixos. El punto indica la presencia del mismo nucleótido que en la secuencia de referencia (CRS); <> indican el principio y final de la secuencia. Debido al tamaño de las secuencias no se dispone de los sitios característicos para los Haplogrupos I, J y K. SCG= Secuencia Carlos García.

Conclusiones

Se ha obtenido DNA de un mínimo de 14 individuos del yacimiento de Mas d' en Boixos como mínimo, mientras que para tres individuos no se ha conseguido ninguna amplificación positiva. Se debe tener en cuenta que las muestras con menos eficiencia en la amplificación pertenecen al Neolítico (MBN): restos con un deficiente estado de conservación.

A partir de las amplificaciones de la región de control o D-Loop se obtuvieron resultados en un 50% de las extracciones, obteniendo 3 secuencias entre 51 y 94 pares de bases; incluyendo la secuencia más antigua que se tiene, hasta ahora, del Neolítico catalán, y quizás, de la Península Ibérica.

El haplogrupo más frecuente es el haplogrupo H; no existiendo diferencias, posiblemente debido al bajo número de muestras, entre la población antigua y actual de Cataluña. Se observa sin embargo una diferencia en cuanto a la frecuencia del haplogrupo H entre las muestras Neolíticas y del Bronce. La frecuencia de H en la serie Neolítica es del 20% aunque podría alcanzar, en el mejor de los casos, un 60%, mientras que en la serie del Bronce llegaría a un 92%.

Análisis de DNAm en restos dentales

INDIVIDUO	EXTRACTO	ÉPOCA	DIENTE	D-LOOP					FRAGMENTO AMPLIFICADO / LUGAR DE RESTRICCIÓN					HAPLOGRUPO	
				C	D	G	B	H / 7025 Alu I	Eur / 10394 Dde I	K / 9052 HaeII	J / 13704 Est 01	T / 15606 Aul	U / 12308 Hirfl		X / 17115 DdeI
MB OO-88.1	1	NEOLÍTICO	CANINO	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	-	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	H
MB OO-88.2	2	NEOLÍTICO	CANINO	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	+	N.A.	N.A.	-	N.A.	N.A.	N.A.	I, J, O, K
MB OO-728	3	NEOLÍTICO	CANINO	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	-	N.A.	N.A.	N.A.	?
MB OO 99-202.1	4	NEOLÍTICO	CANINO	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	-	N.A.	N.A.	-	N.A.	N.A.	N.A.	H, U, V, W, O, X
MB OO 99-202.2	5	NEOLÍTICO	CANINO	*	*	N.A.	*	+	N.A.	N.A.	-	N.A.	N.A.	N.A.	I, J, O, K
MB OO-88.10	18	NEOLÍTICO	PREMOLAR	*	N.A.	*	N.A.	-	N.A.	N.A.	-	N.A.	N.A.	N.A.	H0
MB E35.1.1	6	BRONCE	INCISIVO	N.A.	*	N.A.	*	-	N.A.	N.A.	-	N.A.	N.A.	N.A.	H
MB E35.1.2	7	BRONCE	PREMOLAR	N.A.	*	N.A.	*	-	N.A.	N.A.	-	N.A.	N.A.	N.A.	H
MB E35.1.3	8	BRONCE	INCISIVO	*	*	N.A.	*	N.A.	N.A.	N.A.	-	N.A.	N.A.	N.A.	I, J, O, K
MB E35.1.4	9	BRONCE	INCISIVO	*	*	N.A.	N.A.	-	N.A.	N.A.	-	N.A.	N.A.	N.A.	H
MB E35.1.5	10	BRONCE	PREMOLAR	*	*	N.A.	*	-	N.A.	N.A.	-	N.A.	N.A.	N.A.	H
MB E35.1.6	11	BRONCE	INCISIVO	N.A.	*	N.A.	*	-	N.A.	N.A.	-	N.A.	N.A.	N.A.	H
MB E35.1.7	12	BRONCE	INCISIVO	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	-	N.A.	N.A.	N.A.	?
MB E35.1.8	13	BRONCE	INCISIVO	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	-	N.A.	N.A.	-	N.A.	N.A.	N.A.	H
MB E35.1.9	14	BRONCE	PREMOLAR	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	-	N.A.	N.A.	-	N.A.	N.A.	N.A.	H
MB E35.1.10	15	BRONCE	INCISIVO	*	*	N.A.	*	-	N.A.	N.A.	-	N.A.	N.A.	N.A.	H
MB E35.1.11	16	BRONCE	PREMOLAR	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	-	N.A.	N.A.	N.A.	?
MB E35.1.12	17	BRONCE	INCISIVO	*	*	N.A.	*	-	N.A.	N.A.	-	N.A.	N.A.	N.A.	H

Tabla 5. La caracterización de los haplogrupos se hizo mediante la presencia (+) o ausencia (-) de 8 de los 9 sitios de restricción. Los resultados definitivos se indican en **negrita**. Los extractos de cada individuo se presentan en el orden en el que fueron analizados. El sitio de restricción V-4577 NcoIII no fue analizado debido principalmente a que los extractos estaban agotados. N.A. = alícuotas en las que no se obtuvo amplificación después de al menos un intento. ? = haplogrupo indeterminado. (R) = individuo repetido. Casilla en blanco = extracto agotado.

No obstante, futuros trabajos serán necesarios para aclarar esta alta frecuencia del haplogrupo H observada en la población del Bronce de Mas d' en Boixos (MBB). Consecuentemente, se hace necesario analizar más individuos para definir esta particular característica; así como continuar con el análisis de los individuos en los cuales el haplogrupo no está totalmente definido.

HAPLO-GRUPO	NEOLÍTICO (MB)		BRONCE (MB)		TOTAL (MB)		PR		URR		LON		PV	
	(n= 5)		(n= 12)		(n= 17)		(n= 24)		(n= 5)		(n= 29)		(n= 24)	
	I	%	I	%	I	%	I	%	I	%	I	%	I	%
H	1	20	9	75	10	58.8	9	37.5	2	40	11	37.9	8	33.3
I, J ó K	2	40	1	8.3	3	17.6	8	33.3	1	20	6	20.6	8	33.3
OTROS	1	20	0	0	1	5.8	7	29.1	2	40	10	34.4	8	33.3
?	1	20	2	16.6	3	18	-	-	-	-	2	6.8	-	-

Tabla 6. Distribución de los haplogrupos en diferentes poblaciones antiguas. Neolítico, Bronce, Total = series de Mas d' en Boixos.; PR, URR, LON = series Vascaas datadas entre el Neolítico y la edad del Bronce; PV = población medieval de Cataluña; ? = haplogrupos indeterminados.

	MBN	MBB	MBT	PV	PR	URR	LN
MBN	0.0000	0.0011	0.0023	0.0000	0.0000	0.0000	0.0017
MBB	0.0404	0.0000	0.0011	0.0006	0.0006	0.0018	0.0006
MBT	0.1553	0.7701	0.0000	0.0015	0.0020	0.0018	0.0015
PV	0.1000	0.0116	0.0601	0.0000	0.0000	0.0000	0.0022
PR	0.1000	0.0171	0.1227	0.1000	0.0000	0.0000	0.0018
URR	0.1000	0.0793	0.2621	0.1000	0.1000	0.0000	0.0000
LN	0.6472	0.0195	0.0968	0.7265	0.7295	0.1000	0.0000

	MBN	MBB	MBT	PV	PR	URR	LN
MBB	+						
MBT	-	-					
PV	-	+	-				
PR	-	+	-	-			
URR	-	-	-	-	-		
LN	-	+	-	-	-	-	

Tabla 7. Test exacto de diferenciación poblacional basado en la distribución de los haplogrupos. En la parte superior se muestra el valor de P (debajo de la diagonal) y su error estándar (encima de la diagonal). En la parte inferior, el signo + denota que entre las poblaciones analizadas existe diferencia significativa ($p < 0.05$). La población más diferenciada resultó ser la de Mas d' en Boixos Bronce. MBN= Mas d' en Boixos Neolítico; MBB= Mas d' en Boixos Bronce; MBT= Mas d' en Boixos Total; PV= Plaça Vella; PR= Pico Ramos; URR= Urratza; LN= Longar Nafarroa.

Es interesante destacar que no se observó ninguna incompatibilidad entre los resultados obtenidos a través de las secuencias y los haplogrupos. Todo ello indica que los resultados muestran una marcada homogeneidad en la población estudiada, particularmente en la población del Bronce. En esta población, la presencia mayoritaria del haplogrupo H, podría indicar una mayor endogamia, denotando relaciones de parentesco muy estrechas entre sus miembros. Por otra parte, la serie del Neolítico muestra una mayor variación genética a nivel del DNAm.

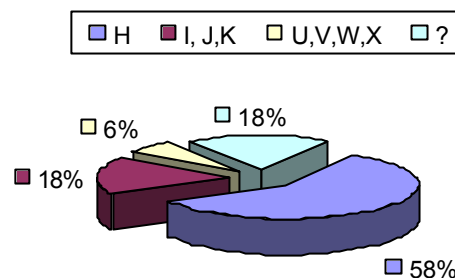
La continuidad de este trabajo es fundamental para que los datos obtenidos nos ayuden a entender la variación en el tiempo y en el espacio del DNAm en las poblaciones antiguas de Cataluña, así como también, las relaciones filogenéticas con otras poblaciones, aspecto éste

último que nos permitirá esclarecer la entrada de los haplogrupos, y su variación en la región de Cataluña.

HAPLOGRUPOS	POBLACIÓN CONTEMPORÁNEA			
	GALI	BAR	CAT	MBB
	n = 92	n = 45	n = 90	n = 12
	%	%	%	%
X	1,1	0,0	2,2	-
I, K, J	13,4	4,4	18,9	8,3
V	3,2	8,9	3,3	-
H	63,0	64,0	44,4	75,0
U	11,9	4,5	11,1	-
T	2,1	8,9	13,3	-
W	2,1	0,0	0,0	-
?	-	-	-	16,6

Tabla 8. Distribución (%) del haplogrupo H en diferentes poblaciones contemporáneas Europeas. Considerando la proporción del haplogrupo H, la población del Bronce de Mas d' en Boixos (MBB) no presentó diferencias significativas con estas poblaciones (GALI, $p=0,1589072$; BAR, $p=0,1589072$ y CAT, $p=0,3492063$); ? =haplogrupo indeterminado.

Figura 3. Distribución de los haplogrupos en Mas d' en Boixos. El haplogrupo H muestra un 58% (N=18), la más alta frecuencia.



Bibliografía

- ALFONSO J, SUBIRA E, MALGOSA A (2004) Estudi preliminar de les restes antropològiques del Mas d' en Boixos (Pacs Alt Penedès). *Tribuna D' Arqueologia* (2000-2001). Edició del Departament de Cultura de la Generalitat de Catalunya. Barcelona. 33-48.
- ANDERSON S, BANKIER AT, BARRELL BG, BRUIJN MHL, COULSON AR, DROVIN J, EPERON IC, NIERLICH DP, ROE BA, SANGER F, SCHREIER PH, SMITH AJH, STADEN R, YOUNG IG (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* **290**: 457-464.
- BOUSO M, ESTEVE X, FARRÉ J, FELIU J, MESTRES J, SENABRE M (2001) Mas d' en Boixos-1 (Pacs del Penedés, Alt Penedés). *Jornadas D' Arqueologia 2001. Intervencions arqueològiques i paleontològiques a les comarques de Barcelona (1996-2001)*, La Garriga.
- BRAKEZ Z, BOSCH E, IZAABEL H, AKHAYAT D, COMAS D, BERTRANPETIT J, CALAFELL F(2001) Human mitochondrial DNA sequence variation in the Moroccan population of the Souss area. *Ann. Hum. Biol.* **28** (3): 295-307.
- CALDARARO N (2002) Ancient DNA and Human origins: The role of gene sequence variation in the species concept. *Human Nature Review* **2**: 317-321.
- CAVALLI-SFORZA LL (1998) The DNA revolution in population genetics. *Trends in Genetics* **14**(2):60-65.
- CÔRTE-REAL H, MACAULAY V, RICHARDS M, HARITI G, ISSAD A, CAMBON-THOMSEN A, PAPIHA S, BERTRANPETIT J, SYKES B (1996) Genetic diversity in the Iberian Peninsula determined from mitochondrial sequence analysis. *Ann. Hum. Genet.* **60**: 331-350.
- CHEN Y, TORRONI A, EXCOFFIER L, SANTA-CHIARA-BENERECETTI, WALLACE D (1995) Analysis of mtDNA variation in African populations reveals the most ancient of all human continent-specific haplogroups. *Am. J. Hum. Genet.* **57**: 133-149.
- CHIKHI L, NICHOLS R, BARBUJANI G, BEAUMONT M (2002) Y genetic data support the Neolithic demic diffusion model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99** (17): 11008-11013.
- DEGUSTA D, COOK CH, SENSABAUGH G (1994) Dentin as a source of ancient DNA. *Ancient DNA Newsletter.* **2** (1): 13.
- DERBENEVA O, STARIKOVSKAYA E, WALLACE D, SUKERNIK R (2002) Traces of Early Eurasians in the Mansi of Northwest Siberia Revealed by Mitochondrial DNA analysis. *Am. J. Hum. Genet.* **70**: 1009-1014.
- EASTON R, MERRIWETHER D, CREWS D, FERRELL R (1996) mtDNA Variation in the

- Yanomami: Evidence for Additional New World Founding Lineages. *Am. J. Hum. Genet.* **59**:213-225.
- ELSON J, ANDREWS R, CHINNERYP, LIGHTOWLERS R, TURNBULL D, HOWELL N (2001) Analysis of European mtDNAs for Recombination. *Am. J. Hum. Genet.* **68**: 145-153.
- FINNILÄ S, LEHTONEN M, MAJAMAA K (2001) Phylogenetic network for European mtDNA. *Am. J. Hum. Genet.* **68**: 1475-1484.
- FRANCALACCI P, MONTIEL R, MALGOSA A (1999) A mitochondrial DNA database: applications to problems of nomenclature and population genetics. En: *Genomic diversity: applications in human population genetics*. SS Papiha, R Deka, R Chakraborty, Eds. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York. p. 103-119.
- GIBBONS A (2001) But Did They Mate? *Science*. **291**:1726-1729.
- HAESLER VON A, SAJANTILA A, PÄÄBO S (1995) The genetical archaeology of the human genome. *Nature Genetics*. **14**:135-140.
- HAGELBERG E, BELL L, ALLEN T, BOYDE A, JONES S, CLEGG J (1991) Analysis of ancient bone DNA: techniques and applications. *Proc. R. Soc. Lond. B.* **333**: 399-407.
- HALL TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* **41**:95-98.
- HANDT O, HÖSS M, KRINGS M, S PÄÄBO (1994) Ancient DNA methodological challenges. *Experientia* **50**: 524-529.
- HÄNNI C, BEGUE A, LAUDET V, STÉHELIN D (1995) Molecular Typing of Neolithic Human Bones. *J. of Archaeological Science* **22**:649-658.
- HIGUCHI R, BOWMAN B, FREIBERGER M, RYDER O, WILSON A (1984) DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature*. **312**: 282-284.
- HORAI S, KONDO R, NAKAGAWA-HATTORO Y, HAYASHI S, SONODA S, TAJIMA K (1993) Peopling of the Americas, founded by four major lineages of mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Evol.* **10**: 23-47.
- HUMMEL S, HERRMANN B (1994) General aspects of sample preparation. En: *Ancient DNA*. B Herrmann y S Hummel, Eds. Springer Verlag, New York. p. 59-68.
- INGMAN M, KAESSMANN H, PÄÄBO S, GYLLENSTEN U (2000) Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. *Nature*. **408**: 708-713.
- IZAGIRRE N (1998) *Aplicación de la biología molecular en el estudio antropológico de las poblaciones humanas del pasado: Análisis del ADN mitocondrial*. Tesis doctoral, Universidad del País Vasco. Bilbao.
- IZAGIRRE N, DE LA RÚA C (1999) An mtDNA Analysis in Ancient Basque Populations: Implications for Haplogrup V as a Marker for a Major Paleolithic Expansion from Southwestern Europe. *Am. J. Hum. Genet.* **65**: 199-207.
- JOHNS D (1995) Mitochondrial DNA and Disease. *New England Journal of Medicine*. **333**(8):638-644.
- JOHNSON M, WALLACE D, FERRIS S, RATAZZI M, CAVALLI-SFORZA L (1983) Radiation of human mitochondrial DNA types analyzed by restriction endonuclease cleavage patterns. *J. Mol. Evol.* **19**: 255-271.
- KAESTLE F, SMITH D (2001) Ancient Mitochondrial DNA Evidence for Prehistoric Population Movement: The Numic Expansion. *Am. J. Phys. Anthropol.* **115**:1-12.
- KEYSER-TRACQUI C, RICAUT F, CRUBEZY E, LUDES B (2002) Populations anciennes et ADN ancien : état actuel de la question. *Antropo 2* :1-8.
- KIBERSTIS P (1999) Mitochondrial Make A Comeback. *Science*. **283**:1475.
- KRINGS M, SCHMITZ H, KRAINITZKI H, PÄÄBO S (1999) DNA sequence of the mitochondrial hypervariable region II from the Neanderthal type specimen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **96**: 5581-5585.
- KRINGS M, STONE A, SCHMITZ R, KRAINITZKI H, STONEKING M, PÄÄBO S (1997) Neanderthal DNA sequence and the origin of modern humans. *Cell*. **90**: 19-30.
- LALUEZA-FOX C, SHAPIRO B, BOVER P, ALCOVER JA, BERTRANPETIT J (2002) Molecular phylogeny and evolution of the extinct bovid *Myotragus balearicus*. *Mol. Phylogenet. Evol.* **25** (3):501-10.
- LEWIN R (1994) *Evolución humana*. Salvat ciencia, Barcelona, España. 417 pp.
- LODISH H, BALTIMORE D, BERK A, ZIPURSKY S, MATSUDAIRA P, DARNELL J (1995) *Mo-*

- lecular Cell Biology*. Scientific American Books, New York. 545 pp.
- MACA-MEYER N, GONZÁLEZ A, LARRUGA J, FLORES C, CABRERA V (2001) Major Genomic Mitochondrial Lineages Delineate Early Human Expansions. *Genetics* **2**:13.
- MACAULAY V, RICHARDS M, HICKEY E, VEGA E, CRUCIANI F, GUIDA V, SCOZZARI R, BONNÉ-TAMIR B, SYKES B, TORRONI A (1999) The emerging tree of West Eurasian mtDNAs: a synthesis of control-region sequences and RFLPs. *Am. J. Hum. Genet.* **64**: 232-249.
- MALASPINA P, CRUCIANI F, CIMINELLI B, TERRENTO L, SANTOLAMAZZA P, ALONSO A, BANYKO J, BRDICKA R, GARCÍA O, GAUDINO Ç, GUANTI G, KIDD K, LAVINHA J, AVILA M, MANDICH P, MORAL P, QAMAR R, MEDÍ S, RAGUSA A, STEFANESCU G, CARAGHIN M, TYLER-SMITH C, SCOZZARI R, NOVELLETTO A (1998) Network Analyses of Y-Chromosomal Types in Europe, Northern Africa, and Western Asia Reveal Specific Patterns of Geographic Distribution. *Am. J. Hum. Genet.* **63**: 847-860.
- MALHI R, ESHLEMAN J, GREENBERG J, WÉISS D, SCHULTZ B, KAESTLE F, LORENZ J, KEMP B, JOHNSON J, SMITH D (2002) The Structure of Diversity Within New World Mitochondrial DNA Haplogroups: Implications for the prehistory of North America. *Am. J. Hum. Genet.* **70**: 905-919.
- MARTÍNEZ-CONDE A, MAYOR P (2002) *La Mitochondria Humana*. (<http://www.lab314.com>)
- MELTON T, WILSON M, BATZER M, STONEKING M (1997) Extent of Heterogeneity in Mitochondrial DNA of European Populations. *J. Forensic Sci.* **42**(3):437-446.
- MESA N, MONDRAGÓN M, SOTO I, PARRA M, DUQUE C, ORTIZ-BARRIENTOS D, GARCÍA L, VELEZ I, BRAVO M, MÚNERA J, BEDOYA G, BORTOLINI M-C, RUIZ-LINARES A (2000) Autosomal, mtDNA, and Y-chromosome diversity in Amerinds: pre-and post-Columbian patterns of gene flow in South America. *Am. J. Hum. Genet.* **67**: 1277-1286.
- MONSALVE M, STONE A, LEWIS C, REMPEL A, RICHARDS M, STRAATHOF D, DEVINE D (2002) Brief Communication: Molecular Analysis of the Kwäday Dän Ts'ínchi Ancient Remains Found in a Glacier in Canada. *Am. J. Phys. Anthropol.* **119**: 288-291.
- MONTIEL R (2001) *Estudio diacrónico de la variabilidad del DNA mitocondrial en población Catalana*. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona. (<http://www.tdcat.cesca.es/TDCat-0726101-095837>)
- MONTIEL R, MALGOSA A, FRANCALACCI P (2001) Authenticating Ancient Human Mitochondrial DNA. *Human Biology.* **73** (5):689-713.
- MORELL V (1998) Genes May Link Ancient Eurasians, Native Americans. *Science*. **280**:530.
- MULLIS K, FALOONA F (1987) Specific synthesis of DNA in Vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.* **155**: 335-350.
- NICHOLSON G, TOMIUK J, CZARNETZKI A, BACHMAN L, PUSCH C (2002) Detection of Bone Glue Treatment as a Major Source of Contamination in Ancient DNA Analyses. *Am. J. Phys. Anthropol.* **118**:117-120.
- OOTA H, TAKASHI K, JIN F, YUASA I, WANG L, UEDA S, SAITOU N, STONEKING M (2002) Extreme mtDNA Homogeneity in Continental Asian Populations. *Am. J. Phys. Anthropol.* **118**:146-153.
- OVCHINNIKOV IV, GÖTHERSTRÖM A, ROMANOVA GP, KHARITONOV KLIDÉN VM, GOODWIN W (2000) Molecular analysis of Neanderthal DNA from the northern Caucasus. *Nature.* **404**: 490-493
- PÄÄBO S, WILSON A (1988) Polymerase chain reaction reveals cloning artifacts. *Nature.* **334**: 387-388.
- PÄÄBO S, GIFFORD J, WILSON A (1988) Mitochondrial DNA sequences from a 7000-year old brain. *Nucleic Acids Res.* **16** (20): 9775-9787.
- PENNISI E (2001) Tracking the sexes by Their Genes. *Science*. **291**:1733-1734.
- PEREIRA L, PRATA M, AMORIM A (2000) Diversity of mtDNA lineages in Portugal: not a genetic edge of European variation. *Ann. Hum. Genet.* **64**: 491-506.
- POINAR GO Jr., POINAR HN, CANO RJ (1994) DNA from amber inclusions. En: *Ancient DNA*. B. Herrmann y S. Hummel, Eds. Springer Verlag, New York. p. 92-103.
- QUINTANA-MURCI L, SEMINO O, BANDELT H, PASSARINO G, MCELREAVEY K, SANTA-CHIARA-BENERECETTI A (1999) Genetic evidence of an early exit of *Homo sapiens sapiens*

- from Africa through eastern Africa. *Nature Genetics*. **23**: 437-147.
- RAYMOND M, ROUSSET F (2001) *GENEPOP ver 3.3: population genetics software for exact tests and ecumenicism*. Institut des Sciences de l'Evolution. Université de Montpellier II, France.
- RELETFORD J (2001) Ancient DNA and the origin of modern humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **9** (2): 390-391.
- RIBEIRO DOS SANTOS A, SANTOS S, MACHADO L, GUAPINDAIA V, ZAGO M (1996) Heterogeneity of mitochondrial DNA haplotypes in pre-Columbian natives of the Amazon region. *Am. J. Phys. Anthropol.* **101**: 29-37.
- ROGAN PY, SALVO J (1990) Study of Nucleic Acids Isolated From Ancient Remains. *Yearbook of Physical Anthropology*. **33**: 195-214.
- SAILLARD J, FORSTER P, LYNNERUP N, BANDELDT H-J, NORBY S (2000) mtDNA Variation among Greenland Eskimos: The Edge of the Beringia Expansion. *Am. J. Hum. Genet.* **67**: 718-726.
- SALAS A, COMAS D, LAREU M, BERTRANPETIT J, CARRACEDO A (1998) mtDNA analysis of the Galician population: a genetic edge of European variation. *European Journal of Human Genetics*. **6** (4): 365-375.
- SANTOS C (2002) *Haplogrupos del DNAm t en la población de las Azores (Portugal)*. Memoria del trabajo de investigación. Universitat Autònoma de Barcelona Barcelona (inédito).
- SCHMITZ R, BONANI G, SMITH F (2002) "New research at the Neandertal type site in the Neander Valley of Germany". Paper presented at the Annual Meeting of the Paleoanthropology Society. Denver, March 19-20.
- SCHWARTZ M, VISSING J (2002) Brief Report: Paternal Inheritance of Mitochondrial DNA. *New England Journal of Medicine*. **347** (8).
- SIMONI L, CALAFELL F, PETTENER D, BERTRANPETIT J, BARBUJANI G (2000) Geographic patterns of mtDNA diversity in Europe. *Am. J. Hum. Genet.* **66**: 262-278.
- STONE A, STONEKING M (1998) mtDNA analysis of a prehistoric Oneota population: implications for the peopling of the New World. *Am. J. Hum. Genet.* **62**: 1153-1170.
- STONEKING M (1990) Departure of Human Mitochondrial DNA variation from neutral Expectations: An Alternative Explanation. *J. Mol. Evol.* **31**: 343-346.
- STONEKING M (2000) Hypervariable sites in the mtDNA control region are mutational hotspots. *Am. J. Hum. Genet.* **67**: 1029-1032.
- TORRONI A, BANDELDT H-J, MACAULAY V, RICHARDS M, CRUCIANI F, RENGO C, MARTINEZ-CABRERA V, VILLEMS R, KIVISILD T, METSPALU E, PARIK J, TOLK HV, TAMBETS K, FORSTER P, KARGER B, FRANICALACCI P, RUDAN P, JANICIJEVIC B, RICKARDS O, SAVONTAUS ML, HUOPONEN K, LAITINEN V, KOIVUMAKI S, SYKES B, HICKEY E, NOVELLETTO A, MORAL P, SELBITTO D, COPPA A, AL-ZAHERI N, SANTACHIARA-BENERECETTI AS, SEMINO O, SCOZZARI R (2001) A signal, from human mtDNA, of postglacial recolonization in Europe. *Am. J. Hum. Genet.* **69**: 844-852.
- TORRONI A, BANDELDT H-J, D'URBANO L, LAHERMO P, MORAL P, SELBITTO D, RENGO C, FORSTER P, SAVONTAUS M, BONNÉ-TAMIR B, SCOZZARI R (1998) mtDNA analysis reveals a major late Paleolithic population expansion from southwestern to northeastern Europe. *Am. J. Hum. Genet.* **62**: 1137-1152.
- TORRONI A, HUOPONEN K, FRANICALACCI P, PETROZZI M, MORELLI L, SCOZZARI R, OBINU D, SAVONTAUS L, WALLACE D (1996) Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations. *Genetics*. **144**: 1835-1850.
- TORRONI A, SCHURR T, YANG C, SZATHMARY E, WILLIAMS R, SCHANFIELD M, TROUP G, KNOWLER W, LAWRENCE D, WEISS K, WALLACE D (1992) Native American mitochondrial DNA analysis indicates that the Amerind and the Nadene populations were founded by two independent migrations. *Genetics*. **130**: 153-162.
- UNDERHILL P, SHEN P, JIN A, PASSARINO L, YANG G, KAUFFMANN W, BONNÉ-TAMIR B, BERTRANPETIT J, FRANICALACCI P, IBRAHIM M, JENKIS T, KIDD J, MEDI S, SEIELSTAD M, WELLS R, PIAZZA A, DAVIS R, FELDMAN M, CAVALLI-SFORZA L, OEFNER P (2000) Y Chromosome sequence variation and the history of human populations. *Nature Genetics*. **26**: 358-361.
- VIGILANT L, STONEKING M, HARPENDING H, HAWKES K, WILSON A (1991) African populations and the evolution of human mitochondrial DNA. *Science*. **253** (5027): 1503-1507.

- WALLACE D (1997) Mitochondrial DNA in Aging and Disease. *Scientific American*. **228**: 22-29.
- WATKINS W, RICKER C, BAMSHAD M, CARROLL M, NGUYEN S, BATZER M, HARPENDING H, ROGERS A, JORDE L (2001) Patterns of Ancestral Human Diversity: An Analysis of *Alu*-Insertion and Restriction-Site Polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* **68**: 738-752.
- YAOY G, KONG QP, BANDELT H-J, KIVISILD T, ZHANG Y-P (2002) Phylogeographic Differentiation of Mitochondrial DNA in Han Chinese. *Am. J. Hum. Genet.* **70**: 635-651.

Abstract

In this work we present the results of mitochondrial DNA (mtDNA) analyses on human remains from the prehistoric site of Mas d' en Boixos (Penedés, Barcelona) in order to characterize the population. DNA from 18 teeth belonging to 17 individuals (5 Neolithic and 12 Bronze Age) was extracted, and diagnostic restriction sites of mtDNA were analyzed by PCR / RFLPs in order to examine the distribution of European mtDNA haplogroups. Also, a segment from the HVI region (16190-16420) of the D-Loop has been analyzed amplifying and sequencing four overlapping fragments. The obtained data will serve to understand the variation in time and space of the mtDNA in old populations of the region of Catalonia, as well as the phylogenetic relationships with other populations.

mtDNA haplogroups analysis in Neolithic and Bronze Age Catalan dental remains

Key words: mitochondrial haplogroups, ancient DNA, teeth, Neolithic, Bronze Age, Catalonia