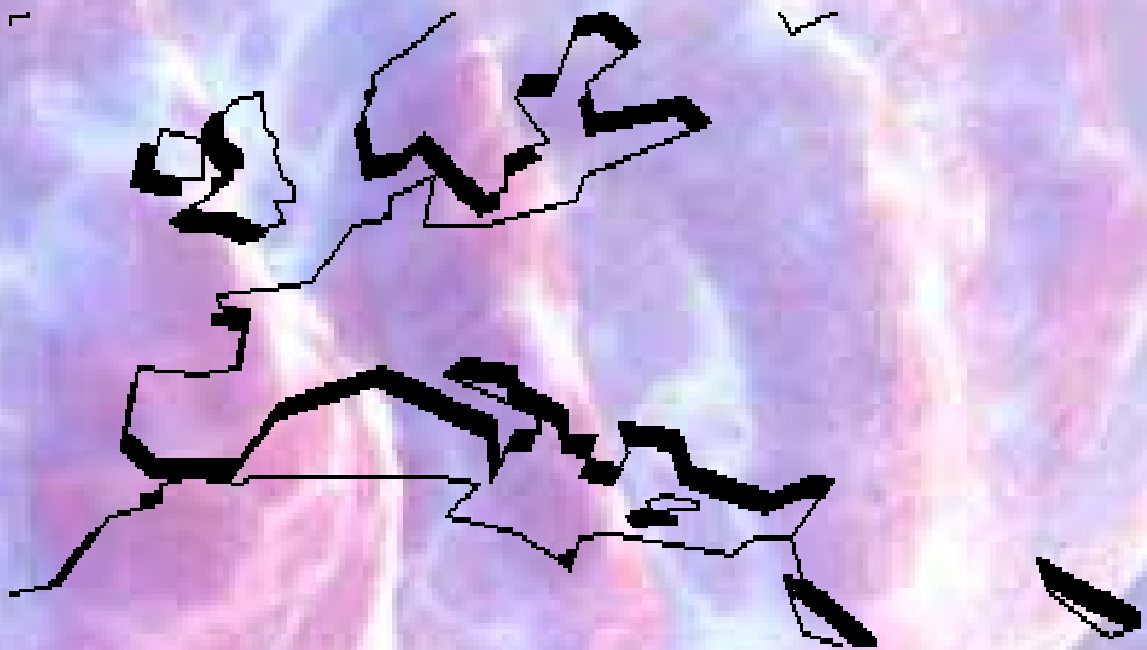


**POLIMORFISMOS DE DNA
MITOCONDRIAL
EN POBLACIONES ANTIGUAS
DE LA CUENCA MEDITERRÁNEA**



Eva Fernández Domínguez



Polimorfismos de DNA Mitocondrial en Poblaciones Antiguas de la Cuenca Mediterránea

Memoria presentada por

Dña. Eva Fernández Domínguez

para optar al grado de

Doctor en Biología

Dirigida por el **Doctor Daniel Turbón Borrega**, de la *Unitat d' Antropologia* del *Departament de Biologia Animal* de la *Universitat de Barcelona*.

Programa de Doctorado de *Biologia Animal II- Antropologia Biològica*. Bienio 1998-2000.

Daniel Turbón Borrega

Eva Fernández Domínguez

*Se considera irresoluble este misterio
por las mismas razones que deberían inducir a considerarlo solucionable*

(E.A. Poe)

A mis padres

Esta tesis doctoral ha sido fruto del esfuerzo conjunto de un equipo investigador multidisciplinar. Cada uno ha aportado su granito de arena y sin la colaboración de todos ellos este trabajo no hubiera sido posible. Mi más profundo agradecimiento:

A todos aquellos arqueólogos y antropólogos que han creído en este proyecto confiándonos sus muestras: Miquel Molist, Josep Anfruns, Joao Zilhão, Eva Chadwick, Jean Claude Margueron, Miguel Cortés, Marili Simón, Ma. Dolores Asquerino, Gonzalo Tranco, Luis Valdés, Isabel Arenal, Pilar Utrilla, Teresa Andrés y Carlos Mazo.

A los investigadores que sabiamente me han instruido en los aspectos técnicos de esta tesis: Alejandro Pérez-Pérez y Jaume García-Bour en la extracción y amplificación de DNA antiguo; Eva Prats del Institut de Biologia Molecular del C.S.I.C. en la clonación y cuantificación por *Real Time PCR*; Trino de Torres y José Eugenio Ortiz del Departamento de Ingeniería Geológica de la U.P.M. en la racemización de aminoácidos y Miguel Sánchez del Dpto. de Estadística de la U.C.M en el tratamiento estadístico de los datos.

A todo el equipo del Laboratorio de Genética Forense y Genética de Poblaciones del Departamento de Toxicología y Legislación Sanitaria de la U.C.M., en el que se ha desarrollado parte de este trabajo: Ana María López, Sara Álvarez, Maribel García, Carlos Baeza, Mirian Tirado, Rodrigo Guzmán, Jorge Abarca, y muy especialmente a Eduardo Arroyo por su impecable apoyo científico, logístico, moral y en definitiva por su amistad y valiosos consejos.

A Pedro Alberto Barrio por su ayuda en la edición y la maquetación de esta tesis. A Marisol Mesa por infundirme ánimos y por creer en este proyecto.

A la Societat de Recerca i Ciències de la Informació de la Generalitat de Catalunya por la concesión de una beca F.P.I., sin la cual probablemente este trabajo no hubiera podido realizarse.

Quisiera también expresar mi agradecimiento al Prof. Daniel Turbón, director de este trabajo, por depositar su amplia experiencia en este tema y su confianza en mi persona, por poner todos los medios disponibles a mi alcance y por orientarme científica y humanamente.

Finalmente quisiera agradecer a aquellas personas que han permanecido a mi lado durante este largo viaje, apoyándome y animándome:

Mi familia, y muy especialmente mis padres, José y Cándida. Mis compañeros de laboratorio Jordi Galbany, Laura Martínez, Elena Martínez, Vanesa Espurz, Olga Hiraldo y María João Neves. Mis amigos Merche, Luis Ángel, Marta, Miriam, Sonia, Amanda, Iván, Adrián, Iago, Alberto, Jesús, Luca, Jenny, Núria, Irene, Ester, Ma. José y muy especialmente a Juani.

A Manu, por acompañarme en la proximidad y en la distancia.

Índice

ÍNDICE

ÍNDICE	I-XII
INTRODUCCIÓN	1-116
1. EL DNA MITOCONDRIAL	1-26
1.1. Organización genómica	1-2
1.2. Características del mtDNA	3-13
1.2.1. Poliplasmia	3
1.2.2. Herencia matrilineal	3-5
1.2.3. Tasa de mutación.....	5-7
1.2.3.1. <i>Métodos filogenéticos de estima de la tasa de mutación</i>	5-6
1.2.3.2. <i>Análisis de pedigrees familiares</i>	6-7
1.2.4. Heteroplasmia	7-9
1.2.5. Neutralidad del mtDNA	9-11
1.2.6. Inserciones de fragmentos de mtDNA en el genoma nuclear	12-13
1.3. El mtDNA y el estudio de las poblaciones humanas.....	14-26
1.3.1. Polimorfismos del mtDNA y haplotipos mitocondriales	14-15
1.3.1.1. <i>Polimorfismos de restricción enzimática y polimorfismos de secuencia</i>	14-15
1.3.2. Técnicas de estudio del mtDNA.....	15-26
1.3.2.1. <i>Medidas de diversidad</i>	16-17
1.3.2.1.1. <i>Índices de diversidad</i>	16
1.3.2.1.2. <i>Distribución de las diferencias por parejas o mismatch distribution</i>	16-17
1.3.2.2. <i>Los haplogrupos mitocondriales</i>	17-20
1.3.2.3. <i>Relaciones filogenéticas entre los haplotipos mitocondriales. Median Networks</i>	21-24
1.3.2.3.1. <i>Topología de los networks</i>	22
1.3.2.3.2. <i>Datación de los cluster</i>	22-24
1.3.2.4. <i>Análisis filogeográficos</i>	24-26
1.3.2.4.1. <i>Mapas de frecuencias</i>	24-25
1.3.2.4.2. <i>Análisis fundador</i>	25-26
2. EL ORIGEN DEL ACERVO GENÉTICO DE LAS POBLACIONES EUROPEAS	27-46
2.1. La primera expansión fuera de África	28-30
2.2. La difusión del Neolítico en Europa.....	31-44
2.2.1. Neolítico y neolitización	31
2.2.2. Origen y difusión del Neolítico en Europa.....	31-33
2.2.3. Naturaleza de la expansión del Neolítico en Europa. Implicaciones genéticas.	33-44

2.2.3.1. Estudios de frecuencias de marcadores clásicos	35-37
2.2.3.2. Estudios de DNA mitocondrial	38-41
2.2.3.3. Estudios de Cromosoma Y	42-43
2.2.3.4. Estudios de simulación	43-44
2.2.4. Consideraciones acerca de las conclusiones derivadas de los estudios de variabilidad genética en poblaciones europeas	44
2.3. Expansiones post-neolíticas	45-46
3. DNA ANTIGUO	47-116
3.1. Definición de DNA antiguo	47
3.2. Historia	47-53
3.2.1. Los primeros pasos de una nueva disciplina	47-48
3.2.2. Hitos del DNA prehistórico	48-53
3.2.2.1. DNA antediluviano	49-53
3.3. Aplicaciones de los estudios de aDNA	53-64
3.3.1. Caracterización genética de especies extintas	53-59
3.3.2. Estudios poblacionales	59-60
3.3.3. Aplicaciones en el campo de la arqueología y la medicina forense	60-62
3.3.3.1. Diagnóstico de sexo	60-61
3.3.3.2. Relaciones familiares	61
3.3.3.3. Identificación personal	61-62
3.3.4. Epidemiología	63
3.3.5. Dieta	63
3.3.6. Identificación de flora y fauna	63-64
3.4. Preservación del DNA	65-76
3.4.1. Procesos de degradación del material genético	65-70
3.4.1.1. Hidrólisis	65-67
3.4.1.2. Daño oxidativo	68-70
3.4.2. Factores que influyen en la conservación del DNA	70-74
3.4.2.1. Material de estudio	70-71
3.4.2.1.1. Tipo de tejido	70-71
3.4.2.1.2. Tipo de material genético	71
3.4.2.2. Condiciones del enterramiento	71-73
3.4.2.2.1. Temperatura	71
3.4.2.2.2. Humedad	72-73
3.4.2.2.3. pH	73
3.4.2.2.4. Compuestos del suelo	73
3.4.2.3. Almacenamiento	73-74
3.4.3. Límite de preservación del DNA	74-76
3.5. Problemas metodológicos en la obtención de DNA antiguo	77-97
3.5.1. Escasez y fragmentación de las cadenas	77-78
3.5.2. Modificaciones moleculares	79-87
3.5.2.1. Lesiones que bloquean la polimerasa	79-80
3.5.2.1.1. Modificaciones oxidativas de las bases nitrogenadas y los residuos de azúcar ..	79
3.5.2.1.2. Puentes cruzados (Cross-links)	79-80
3.5.2.2. Lesiones que provocan la incorporación incorrecta de bases: "miscoding lesions"	80-87
3.5.2.2.1. Hot-spots de daño molecular	84-86
3.5.2.2.2. Posibles soluciones frente a las "miscoding lesions"	86-87
3.5.3. Inhibidores de la PCR	87-93

3.5.3.1. <i>Naturaleza de los inhibidores</i>	88-91
3.5.3.1.1. <i>Ácidos húmicos y fúlvicos</i>	88-89
3.5.3.1.2. <i>Residuos de porfirinas o productos derivados de su degradación</i>	89
3.5.3.1.3. <i>Productos de la reacción de Maillard</i>	89-90
3.5.3.1.4. <i>Productos de degradación del DNA</i>	90-91
3.5.3.2. <i>Eliminación de los inhibidores</i>	91-93
3.5.4. <i>Contaminación</i>	93-96
3.5.4.1. <i>Fuentes y etapas de riesgo de contaminación</i>	93-95
3.5.4.2. <i>Control de la contaminación</i>	95-96
3.5.5. <i>Jumping PCR</i>	96-97
3.6. Métodos de prospección molecular	98-108
3.6.1. <i>Análisis macroscópico y/o microscópico</i>	98-99
3.6.2. <i>Racemización de aminoácidos</i>	99-103
3.6.3. <i>Flash-Pirólisis y GC/MS</i>	103-104
3.6.4. <i>Detección de modificaciones en el DNA por GC/MS</i>	104-107
3.6.4.1. <i>Detección de bases modificadas</i>	105-106
3.6.4.2. <i>Detección de modificaciones en la estructura de azúcar</i>	107
3.6.5. <i>Inhibición de una PCR con DNA fresco</i>	107-108
3.6.6. <i>Espectrofotometría-UV y HPLC</i>	108
3.7. Criterios de autenticidad	109-116
3.7.1. <i>Infraestructura</i>	109-110
3.7.2. <i>Metodología</i>	110-112
3.7.3. <i>Interpretación de los resultados</i>	112
3.7.4. <i>Reproducibilidad</i>	112-113
3.7.5. <i>Pruebas adicionales</i>	113-116
OBJETIVOS	117-118
MATERIAL	119-168
1. CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LA MUESTRA	119-120
2. PRÓXIMO ORIENTE Y VALLE DEL NILO	121-138
2.1. El Neolítico Antiguo de Próximo Oriente	121-134
2.1.1. <i>La transición neolítica en el valle medio del Éufrates y Anatolia</i>	121-124
2.1.2. <i>Tell Halula</i>	124-128
2.1.3. <i>Tell Ramad</i>	129-131
2.1.4. <i>Dj'ade al Mughara</i>	132-133
2.1.5. <i>Açikli</i>	133-134
2.2. Yacimientos post-Neolíticos de Próximo Oriente	135-138
2.2.1. <i>Mari</i>	135-136
2.2.2. <i>Época meroítica en el Valle del Nilo. El yacimiento de Amir Abdallah</i>	137-138

3. PENÍNSULA IBÉRICA	139-160
3.1. El Neolítico Antiguo de la Península Ibérica	139-148
3.1.1. Gruta do Caldeirão	140-142
3.1.2. Sant Pau.....	142
3.1.3. Cueva de Nerja.....	143-148
3.2. El Mesolítico de la Península Ibérica.....	149-151
3.2.1. Concheros de Muge.....	149
3.2.2. Conchero de Toledo	150-151
3.3. El Paleolítico Superior de la Península Ibérica.....	151-152
3.3.1. El Pirulejo.....	151-152
3.3.2. Zafarraya	152
3.4. El Calcolítico y la Edad del Bronce de la Península Ibérica.....	153-159
3.4.1. Cueva de Abauntz	153-155
3.4.2. Sepulcro de Tres Montes.....	156-158
3.4.3. Cueva de Atxuri	159
3.5. La Edad Media. Necrópolis medieval de San Juan de Momoitio, Garai.....	160
.....	
4. MUESTRAS ANALIZADAS	161-168
MÉTODOS	169-310
1. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS	169
2. PROSPECCIÓN MOLECULAR.....	170-200
2.1. Contenido total y racemización de aminoácidos.....	171-177
2.1.1. Muestras estudiadas	171-173
2.1.2. Precauciones.....	173-174
2.1.2.1. <i>Precauciones en la obtención de la muestra</i>	173
2.1.2.2. <i>Precauciones en el proceso de racemización</i>	173-174
2.1.2.2.1. <u>Limpieza del material</u>	173-174
2.1.2.2.2. <u>Pureza de los reactivos</u>	174
2.1.3. Obtención de la muestra.....	174
2.1.4. Protocolo	175-177
2.2. Cuantificación de secuencias específicas de DNA mitocondrial por <i>Real Time PCR</i>	178-196
2.2.1. Principios teóricos de la cuantificación por <i>Real Time PCR</i>	178-181
2.2.2. Muestras estudiadas	181-182
2.2.3. Diseño de los cebadores y de la sonda.....	182-184
2.2.4. Obtención de estándares	184-187
2.2.4.1. <i>Clonación del producto de amplificación</i>	184-187
2.2.4.1.1. <u>Cuantificación del producto</u>	185-186

2.2.4.1.1.1. Cuantificación en gel.....	185
2.2.4.1.1.2. Cuantificación por espectrofluorimetría	185-186
2.2.4.1.2. <u>Estima del número de copias</u>	186-187
2.2.4.2. <i>Diluciones</i>	187
2.2.5. Construcción de la recta patrón	187-188
2.2.6. Optimización de las concentraciones de cebadores y de sonda.....	188-190
2.2.7. Diseño experimental	191-196
2.2.7.1. <i>Componentes del kit</i>	191-192
2.2.7.2. <i>Preparación de las reacciones de amplificación</i>	192
2.2.7.3. <i>Carga y cerrado de la placa</i>	192-193
2.2.7.4. <i>Preparación del Sistema de Detección</i>	193
2.2.7.5. <i>Obtención de los resultados en bruto</i>	194
2.2.7.6. <i>Edición y análisis de los resultados</i>	194-196
2.3. Detección de inhibidores de la PCR	197-200
2.3.1. Inhibición de PCR con DNA fresco	197-199
2.3.1.1. <i>Muestras estudiadas</i>	197-198
2.3.1.2. <i>Protocolo experimental</i>	199
2.3.2. Espectros de absorción de luz	200
3. LIMPIEZA SUPERFICIAL DE LAS MUESTRAS	201-203
3.1. Limpieza con arenadora	201-202
3.2. Irradiación con luz ultravioleta.....	202-203
4. PULVERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	204-207
4.1. Limpieza del material.....	204
4.2. Trituración	204-207
5. LAVADO DEL POLVO DE HUESO.....	208
6. DIGESTIÓN CON SOLUCIÓN DE LISIS	209-210
7. EXTRACCIÓN DEL DNA.....	211-213
7.1. Preparación del material	211-212
7.2. Extracción de DNA.....	212-213
8. CONCENTRACIÓN DEL DNA	214-216

9. AMPLIFICACIÓN DE SECUENCIAS DE LA REGIÓN HIPERVARIABLE I DEL DNA MITOCONDRIAL	217-230
9.1. Muestras estudiadas	217-221
9.2. Protocolo experimental.....	222-230
9.2.1. Cebadores de la reacción de amplificación.....	222-225
9.2.2. Reacción de amplificación	226-230
9.2.2.1. Precauciones.....	226
9.2.2.2. Preparación de las reacciones de amplificación	227-229
9.2.2.3. Programas de amplificación	229-230
10. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA.....	231-233
10.1. Fabricación de los geles de agarosa.....	231-232
10.2. Carga de las muestras en el gel	232-233
10.3. Visualización de los geles	233
11. AISLAMIENTO DEL PRODUCTO DE AMPLIFICACIÓN.....	234-241
11.1. Purificación de DNA de agarosa de bajo punto de fusión.....	234-241
11.1.1. Corte de las bandas del gel.....	234-236
11.1.2. Aislamiento del DNA.....	237-241
11.1.2.1. Precipitación con sales.....	237-238
11.1.2.2. Extracción mediante Kits comerciales.....	238-241
11.1.2.2.1. Concert Gel Extraction System (BRL-Life Technologies)	238-239
11.1.2.2.2. QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)	239-241
11.2. Purificación a partir de la mezcla de PCR (QIAquick PCR Purification Kit)	241
12. REACCIÓN DE SECUENCIA	242-247
12.1. Kits de secuenciación.....	242-244
12.2. Cuantificación del DNA molde para las reacciones de secuencia ..	244-245
12.3. Reacción de secuencia	245-246
12.4. Programas de secuenciación.....	246-247
13. ELIMINACIÓN DE LOS TERMINADORES DE REACCIÓN NO INCORPORADOS	248-256

13.1. Localización de los terminadores de reacción no incorporados.....	248-249
13.2. Protocolos para la eliminación de los terminadores no incorporados.....	250-251
.....	
13.2.1. Precipitación con etanol/acetato sódico	251-253
13.2.2. Precipitación con etanol/cloruro de magnesio.....	253-254
13.2.3. Precipitación con etanol	254-255
13.2.4. Precipitación con columnas (<i>DyeEx Spin columns, Qiagen®</i>)	255-256
14. CRITERIOS DE AUTENTICIDAD.....	257-282
14.1. Infraestructura	257-259
14.1.1. Análisis en un laboratorio exclusivo de DNA antiguo.....	257
14.1.2. Separación de las áreas de trabajo pre y post-PCR.....	257-258
14.1.3. Equipamiento de los laboratorios de DNA antiguo.....	258-259
14.2. Metodología.....	259-265
14.2.1. Empleo de instrumental y equipamiento exclusivo para el análisis de DNA antiguo.....	259-262
14.2.1.1. Limpieza de las áreas de trabajo.....	259
14.2.1.2. Material empleado.....	259-261
14.2.1.2.1. <u>Material de un solo uso</u>	259-260
14.2.1.2.2. <u>Material no desechable</u>	260-261
14.2.1.3. <u>Soluciones</u>	261-262
14.2.2. Eliminación de la capa superficial del hueso/diente previamente a la extracción del material genético	262
14.2.3. Análisis de cada espécimen por un único investigador.....	262-263
14.2.4. Procesado de controles o blancos.....	263-265
14.2.4.1. <u>Controles negativos de extracción</u>	263-265
14.2.4.1.1. <u>Amplificación conjunta de controles de extracción y muestras</u>	264
14.2.4.1.2. <u>Amplificación de los controles de extracción aisladamente</u>	265
14.2.4.2. <u>Controles negativos de amplificación</u>	265
14.3. Reproducibilidad	265-266
14.3.1. Replicación del experimento dentro del mismo laboratorio.....	265-266
14.4. Interpretación de los resultados	266-269
14.4.1. Sentido filogenético	266-268
14.4.1.1. <i>Comparación de las secuencias obtenidas con las del personal arqueológico y/o antropológico y con el personal de laboratorio</i>	267
14.4.1.2. <i>Comparación de la secuencia obtenida con una base de datos de secuencias actuales de la misma región geográfica o de regiones próximas</i>	268
14.4.2. Comparación de las secuencias obtenidas con las de su mismo grupo de amplificación y reamplificación.....	268
14.4.3. Eliminación de aquellas secuencias con más de una posición ambigua	269
14.5. Pruebas adicionales	269-282
14.5.1. Ensayos bioquímicos de preservación de otras macromoléculas de la misma muestra	269-270
14.5.2. Clonación bacteriana de los productos de amplificación y secuenciación de múltiples clones.....	270-282
14.5.2.1. <u>Muestras clonadas</u>	270-271
14.5.2.2. <u>Protocolo experimental</u>	271-282
14.5.2.2.1. <u>Sistema de clonación pGEM®-T Easy Vector System II (Promega)</u>	271-272

14.5.2.2.2. Selección de las colonias con plásmido.....	272
14.5.2.2.3. Selección de las colonias con inserto	273
14.5.2.2.4. A-Tailing.....	273-274
14.5.2.2.5. Reacción de ligado.....	274-276
14.5.2.2.6. Transformación	276-277
14.5.2.2.7. Selección de colonias con inserto mediante <i>Colony-PCR</i>	278-279
14.5.2.2.8. Minipreparaciones de DNA plasmídico.....	279-280
14.5.2.2.9. Secuenciación de los productos de clonación.....	281-282
14.5.3. Cuantificación del número de moléculas de DNA template amplificable presentes en un extracto	282
15. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	283-285
15.1. Eficiencias técnicas	283-285
15.1.1. Cálculo de eficiencias	283-284
15.1.2. Comparación de las eficiencias.....	285
16. ANÁLISIS POBLACIONAL	286-310
16.1. Construcción de una base de datos de secuencias actuales.....	286-293
16.1.1. Bases de datos utilizadas	286-287
16.1.1.1. <i>HVRbase</i>	286-287
16.1.1.2. <i>FHG Base</i>	287
16.1.2. Fiabilidad de las bases de datos.....	287-288
16.1.3. Composición de la base de datos.....	288-293
16.2. Subconjuntos de población antigua	294-295
16.3. Índices de diversidad	296-298
16.3.1. Número y porcentaje de sitios polimórficos.....	296
16.3.2. Haplotipos diferentes	296
16.3.3. Diversidad haplotípica.....	296-297
16.3.4. Número medio de diferencias por parejas y diversidad nucleotídica.....	297-298
16.4. Distribución de las diferencias por parejas (<i>Mismatch distribution</i>)	299-300
16.5. Análisis filogenético interpoblacional.....	301-303
16.5.1. Distancias genéticas	301-303
16.5.1.1. <i>Reconstrucción filogenética a partir de distancias genéticas</i>	302-303
16.6. Clusters	304-305
16.6.1. Poblaciones estudiadas.....	304
16.6.2. Descripción del método.....	305
16.7. Haplotipos	306-308
16.7.1. Reconstrucción filogenética a partir de haplotipos	306-308
16.7.1.1. <i>Distancias genéticas entre los haplotipos</i>	306
16.7.1.2. <i>Median Joining Networks</i>	307-308
16.7.2. Haplotipos compartidos entre poblaciones antiguas y actuales	308

16.8. Haplogrupos mitocondriales.....	309-310
16.8.1. Asignación de haplogrupos a las muestras.....	309
16.8.2. Frecuencias de haplogrupos	309-310
RESULTADOS	311-544
1. EXTRACCIONES.....	311-314
2. CONTENIDO TOTAL Y RACEMIZACIÓN DE AMINOÁCIDOS... 315-336	
2.1. Contenido total de aminoácidos	315-317
2.1.1. Aminoácidos estimados	315-317
2.2. Ratio de formas D y L	318-336
2.2.1. Relación entre ratios de racemización de diferentes aminoácidos	319
2.2.2. Racemización del ácido aspártico	319-336
2.2.2.1. <i>Relación de la ratio de racemización del ácido aspártico y el contenido total en formas D y L.....</i>	<i>319-321</i>
2.2.2.2. <i>Diferencias en la ratio de racemización por individuo y tejido</i>	<i>321</i>
2.2.2.3. <i>Diferencias por antigüedad y yacimiento.....</i>	<i>321-331</i>
2.2.2.4. <i>Relación entre la ratio de racemización del ácido aspártico y la preservación del material genético.....</i>	<i>332-335</i>
2.2.2.5. <i>Relación entre las ratios de racemización de diversos aminoácidos y contaminación.....</i>	<i>336</i>
3. CUANTIFICACIÓN DE SECUENCIAS ESPECÍFICAS DE mtDNA	337-342
.....	
3.1. Eficiencia de la cuantificación y causas de su fracaso.....	339-341
3.2. Resultados de cuantificación y procedencia de las muestras.....	341-342
3.3. Resultados de cuantificación y probabilidades de éxito en la obtención de información genética	342
4. DETECCIÓN DE INHIBIDORES DE LA PCR	343-353
4.1. Inhibición de una PCR con “DNA fresco”	343-345
4.1.1. Resultados de inhibición por individuo.....	346-347
4.1.2. Relación con la procedencia de las muestras	347-350
4.2. Espectros de absorción de luz.....	351-353
5. POLIMORFISMOS DE DNA MITOCONDRIAL	354-442

5.1. Amplificación, reamplificación y secuenciación de la región control del mtDNA.....	354-367
5.1.1. Eficiencias de amplificación, reamplificación y secuenciación.....	354-367
5.1.1.1. Tipo de tejido.....	356
5.1.1.2. Tipo de pieza dental.....	356-358
5.1.1.3. Longitud del segmento amplificado – Tipo de cebador.....	359-361
5.1.1.4. Tipo de polimerasa.....	361-362
5.1.1.5. Procedencia.....	362-366
5.1.1.6. Antigüedad y preservación.....	366-367
5.2. Secuencias de la Región Control del mtDNA.....	368-442
5.2.1. Secuencias obtenidas.....	368-372
5.2.2. Criterios de autenticidad	373-434
5.2.2.1. Blancos de extracción y amplificación.....	373-385
5.2.2.1.1. Blancos de extracción.....	373-381
5.2.2.1.1.1. Amplificación junto con las muestras	373-380
5.2.2.1.1.2. Amplificación de los controles aisladamente.....	381
5.2.2.1.2. Blancos de amplificación.....	382-385
5.2.2.2. Replicación de las muestras dentro del laboratorio.....	386-396
5.2.2.3. Sentido filogenético	397-405
5.2.2.3.1. Comparación de las secuencias obtenidas con las del personal arqueológico y/o antropológico y con el personal de laboratorio.....	397-400
5.2.2.3.2. Búsqueda de las secuencias obtenidas en una base de datos de secuencias actuales de la misma región geográfica o de regiones próximas	401-405
5.2.2.4. Eliminación de aquellas secuencias con más de una posición ambigua..	406-414
5.2.2.5. Clonación bacteriana de los productos de amplificación y secuenciación de múltiples clones.....	415-433
5.2.2.5.1. Secuencias obtenidas	415-432
5.2.2.5.2. Análisis de los resultados.....	433
5.2.2.6. Ensayos bioquímicos de preservación de otras macromoléculas de la misma muestra.....	433
5.2.2.7. Cuantificación del número de moléculas de DNA template amplificable presentes en un extracto.....	433-434
5.2.3. Secuencias definitivas	435-442
5.2.3.1. Distribución de las mutaciones en los sitios variables y hot spots mutacionales... ..	439-442
6. ANÁLISIS POBLACIONAL	443-544
6.1. Índices de diversidad	443-458
6.1.1. Número y porcentaje de sitios polimórficos.....	443-446
6.1.2. Haplotipos diferentes	446-450
6.1.3. Diversidad haplotípica	450-456
6.1.4. Número medio de diferencias por parejas y diversidad nucleotídica.....	454-458
6.2. Distribución de las diferencias por parejas.....	459-471
6.3. Análisis filogenético interpoblacional.....	472-526
6.3.1. Distancias genéticas	472-479
6.3.1.1. Reconstrucción filogenética a partir de distancias genéticas	480-484
6.3.2. Clusters.....	485-487
6.3.3. Haplotipos	488-526
6.3.3.1. Reconstrucción filogenética a partir de haplotipos.....	488-522
6.3.3.1.1. Neighbor-Joining y UPGMA.....	488-508
6.3.3.1.2. Median Joining Networks.....	509-522
6.3.3.2. Haplotipos compartidos entre poblaciones antiguas y actuales	523-526

6.4. Haplogrupos mitocondriales.....	527-544
6.4.1. Asignación de haplogrupos a las muestras.....	527-532
6.4.2. Frecuencias de haplogrupos	533-544
DISCUSIÓN	545-630
1. CONSIDERACIONES METODOLÓGICAS	547-604
2. DISCUSIÓN DE LOS OBJETIVOS PLANTEADOS	547-630
2.1. Objetivos metodológicos	547-604
2.1.1. Adecuación de los protocolos de extracción, amplificación y secuenciación de DNA antiguo desarrollados con anterioridad en nuestro equipo de investigación para el estudio de muestras de otras regiones geográficas y de considerable mayor antigüedad.....	547-553
2.1.1.1. <i>Modificaciones orientadas a minimizar el riesgo de contaminación</i>	548-550
2.1.1.2. <i>Modificaciones orientadas a la detección del DNA contaminante</i>	550-552
2.1.1.3. <i>Modificaciones orientadas a incrementar la eficiencia en la recuperación de DNA antiguo</i>	552-553
2.1.2. Extracción de DNA, amplificación y secuenciación de un segmento de mtDNA de un número representativo de individuos de época neolítica de Próximo Oriente y de época neolítica y post-neolítica de la Península Ibérica.....	554-560
2.1.2.1. <i>Muestreo adecuado</i>	554-558
2.1.2.1.1. <u>Disponibilidad de la muestra</u>	554-557
2.1.2.1.2. <u>Relaciones familiares intra-grupales</u>	557-558
2.1.2.2. <i>Procedimiento experimental adecuado</i>	558-559
2.1.2.3. <i>Valoración de los resultados obtenidos</i>	560
2.1.3. Evaluación del estado de preservación general de las muestras a estudiar mediante la aplicación de diversas técnicas	561-583
2.1.3.1. <i>Contenido total de aminoácidos y racemización del ácido aspártico</i>	562-579
2.1.3.1.1. <u>Porcentaje y contenido total de aminoácidos</u>	562-565
2.1.3.1.2. <u>Racemización de aminoácidos</u>	565-579
2.1.3.1.2.1. Variabilidad en la tasa de racemización.....	567-570
2.1.3.1.2.2. Cinética de racemización del ácido aspártico	570-579
2.1.3.2. <i>Cuantificación de secuencias específicas de DNA mitocondrial</i>	580-583
2.1.4. Evaluación de la influencia de ciertas variables en la obtención de resultados.....	584-592
2.1.4.1. <i>Variables que afectan a la preservación del DNA</i>	584-591
2.1.4.1.1. <u>Tipo de muestra</u>	584-587
2.1.4.1.2. <u>Procedencia</u>	587-591
2.1.4.2. <i>Procedimiento experimental</i>	591-592
2.1.5. Valoración general de la autenticidad de los resultados obtenidos	593-604
2.1.5.1. <i>Precauciones técnicas</i>	594
2.1.5.2. <i>Pruebas prospectivas</i>	594-595
2.1.5.3. <i>Detección de la contaminación</i>	595-603
2.1.5.3.1. <u>Contaminación detectada en los blancos</u>	595-596
2.1.5.3.2. <u>Contaminación no detectada en los blancos</u>	597-603
2.1.5.3.2.1. Contaminación previa al análisis.....	597-598
2.1.5.3.2.2. Contaminaciones puntuales	598-603
2.1.5.4. <i>Sentido filogenético</i>	603-604

2.2. Objetivos filogenéticos y poblacionales	605-630
2.2.1. Comparación mediante métodos estadísticos y filogenéticos de la población antigua entre sí y con otras poblaciones actuales	605-615
2.2.1.1. <i>Próximo Oriente</i>	606-614
2.2.1.2. <i>Península Ibérica</i>	614-615
2.2.2. Origen de la diversidad mitocondrial europea	616-628
2.2.2.1. <i>Expansiones neolíticas desde Próximo Oriente</i>	616-622
2.2.2.2. <i>Contribución genética africana al acervo genético europeo</i>	622-626
2.2.2.3. <i>Las expansiones del Paleolítico</i>	627-629
2.2.3. Evaluación de la posible contribución de los Neandertales al acervo genético humano moderno mediante la detección de secuencias neandertalenses de mtDNA en las muestras antiguas estudiadas	629-630
CONCLUSIONES	631-638
BIBLIOGRAFÍA	639-670
APÉNDICE	671-674
Abreviaturas	671-674