

Conclusiones

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES METODOLÓGICAS

Diseño experimental

1. Los protocolos experimentales de extracción, amplificación y secuenciación de DNA antiguo deben adecuarse a la antigüedad, procedencia y tipo de muestra. El nuestro, sobre los protocolos convencionales, ha incorporado unas mejoras destinadas principalmente a minimizar la contaminación, a detectar e identificar la fuente de origen de ésta y a aumentar la eficiencia en la recuperación de material genético. La aplicación de tales mejoras ha aumentado la eficiencia de amplificación y disminuido el porcentaje de contaminación, respecto a anteriores estudios realizados por el mismo equipo de investigación.

2. Con el procedimiento experimental desarrollado en el presente estudio, es posible obtener secuencias de DNA antiguo de hasta 10000 años de antigüedad. Se ha conseguido, asimismo, recuperar DNA endógeno en el 43% de los extractos analizados, con una eficiencia de amplificación del 17.69%.

3. Entre los factores del diseño experimental, el tipo de *Taq polimerasa* y el diseño de los cebadores de amplificación son los que más influyen en la obtención de resultados. La polimerasa con actividad correctora de errores *Taq Expand High Fidelity* de Roche® proporciona menor eficiencia de amplificación aunque también menor porcentaje de contaminación en los controles de *PCR*, respecto a la polimerasa sin actividad correctora de la casa Biotools®, por lo que su empleo resulta más adecuado en la recuperación de DNA antiguo. El diseño de amplificación empleado en el presente trabajo –consistente en ocho cebadores que amplifican dos fragmentos superpuestos, de aproximadamente 150pb cada uno, de la región HVSI del mtDNA mediante dos reacciones de amplificación anidadas–, se ha probado efectivo para la amplificación de DNA extraído de muestras de hasta 10000 años de antigüedad. Los resultados sugieren que el segundo de los fragmentos –desde la posición 16126 hasta la 16258– presenta una

mayor eficiencia de amplificación que el primero –desde la posición 16258 hasta la 16369–.

4. En los estudios poblacionales de DNA antiguo existen principalmente dos tipos de sesgo que pueden afectar a las conclusiones obtenidas: el *sesgo muestral* y el *metodológico*. El *sesgo muestral* viene determinado por la disponibilidad de la muestra en el registro arqueológico y por las potenciales relaciones de parentesco entre individuos de un mismo yacimiento, lo que se traduce en una disminución de la diversidad del conjunto. El *sesgo metodológico* es consecuencia de la preservación diferencial del DNA en diferentes yacimientos arqueológicos, e incluso en un mismo yacimiento. Ambos tipos de sesgos deben ser tenidos en cuenta en la interpretación de los resultados obtenidos y en la formulación de hipótesis ulteriores.

Métodos de prospección molecular

Porcentaje de aminoácidos y racemización del ácido aspártico

5. En las muestras antiguas en las que se analizó el contenido y racemización de aminoácidos, no hay relación entre la cantidad total de ácido aspártico y su grado de racemización en la fracción colágeno-insoluble. El resultado sugiere que la racemización del ácido aspártico se produce en el interior de la hélice de colágeno, así como en sus extremos (telopéptidos), y en las proteínas asociadas al colágeno (*NCPs*).

6. Puede obtenerse información genética endógena de material antiguo a partir de una relación D/L aspártico superior a 0.1, lo que contradice los resultados de POINAR *et al.* 1996. La tasa de racemización está influida por numerosos parámetros de la muestra y del entorno, muchos de ellos desconocidos aún. En el presente trabajo se pudo comprobar la influencia de seis factores sobre la tasa de racemización:

- Antigüedad
- Yacimiento
- Fase arqueológica del yacimiento
- Tejido (diente o hueso)
- Fracción del diente (diente total o dentina)
- Edad del individuo en el momento de la muerte

La falta de estandarización de la técnica de racemización no permiten considerar este procedimiento, en su planteamiento actual, como un método efectivo de prospección molecular.

Cuantificación por Real Time PCR

7. El diseño de cuantificación de DNA empleado en la presente tesis doctoral presenta una eficiencia de un 70%, en cuanto a predicción de obtención de resultados fiables a partir de muestras antiguas. De este resultado se desprende que la cuantificación de secuencias específicas de mtDNA por *Real Time PCR* es un buen método de prospección molecular. Dado que la cuantificación se basa en la reacción de *PCR*, la presencia de moléculas inhibitoras en los extractos es el principal factor responsable de su fracaso.

Test de inhibición

8. El “test de inhibición” empleado en el presente estudio –consistente en la adición de extractos de DNA antiguo a una *PCR* con DNA fresco–, es de gran utilidad prospectiva, al permitir descartar, de forma rápida y sencilla, los extractos de DNA antiguo que no ofrecen garantías de amplificación.

Preservación

9. La eficiencia de amplificación, y, en definitiva, la capacidad de recuperar información genética a partir de muestras antiguas, está condicionada por diversos factores, todos ellos relacionados con el estado de preservación del material genético en la misma.

10. Las diferencias halladas en la eficiencia de amplificación de las diferentes piezas dentales, probablemente estén asociadas a una preservación diferencial del DNA en los diferentes tejidos de las mismas. Esta eficiencia de amplificación es sensiblemente superior en las piezas emergidas que en los gérmenes dentales. En cuanto a los tipos de diente, los caninos y el tercer molar son los de mayor eficiencia de amplificación.

11. Existen diferencias significativas en las eficiencias de amplificación entre yacimientos arqueológicos, lo que está asociado al distinto tipo de preservación y de acumulación de moléculas inhibidoras en cada ambiente.

12. En muestras de un mismo yacimiento, puede haber diferencias individuales en la eficiencia de amplificación, así como en la presencia o ausencia de inhibidores en los extractos. Tales diferencias están asociadas a las características de cada individuo, a su ubicación dentro del yacimiento o a una combinación de ambos factores.

13. Los resultados obtenidos sugieren que en los ambientes secos, aunque cálidos, el DNA se preserva mejor que en los entornos húmedos y más templados.

14. La degradación del material genético en los extractos de DNA antiguo estudiados ha impedido la amplificación de fragmentos de mtDNA de tamaño superior a 150pb. A pesar de ello, fue posible reconstruir un número importante de secuencias informativas, de aproximadamente 300pb, de muestras de hasta 10000 años de antigüedad.

Autenticidad

15. Solo la valoración conjunta de los procedimientos prospectivos y de autenticación aporta solidez a las secuencias de DNA antiguo.

16. La mayoría de los extractos estudiados presentan un elevado número de moléculas de DNA molde, por lo que la posibilidad de que las secuencias recuperadas de los mismos manifiesten daño molecular es muy pequeña.

Contaminación

17. El empleo de ciertas precauciones durante la manipulación de la muestra permite minimizar la introducción de contaminación, aunque no evitarla totalmente.

18. La ausencia de contaminación en los blancos no garantiza la ausencia de contaminación durante el proceso experimental.

- 19.** La amplificación de los controles de extracción junto con las muestras conlleva un aumento del número de controles contaminados, probablemente por procesos de *carry over*. La amplificación de los controles de extracción sin las muestras resulta por lo tanto altamente recomendable.
- 20.** Las secuencias de los controles de extracción y de amplificación que proporcionaron resultado positivo de amplificación, demuestran que la contaminación puntual por amplicones de anteriores reacciones es la principal fuente de contaminación.
- 21.** La caracterización genética del personal que ha tenido algún tipo de contacto con la muestra (arqueólogos, antropólogos, personal de museos...) es clave para identificar la contaminación no detectada en los blancos.
- 22.** Los resultados sugieren que los principales factores responsables de la aparición de posiciones con dobles nucleótidos en las secuencias son la contaminación puntual por el investigador que lleva a cabo el procedimiento experimental y el *carry over* entre muestras.
- 23.** Hay razones para pensar que las secuencias con posiciones ambiguas en las que no existe concordancia entre ambos segmentos –uno representado en la base de datos y el otro no– pueden tener su origen en una contaminación por *carry over*. En este sentido la “concordancia” entre la información genética de ambos fragmentos, determinada por su representación en bases de datos de secuencias de poblaciones actuales, puede ayudar a la detección de este tipo de contaminación.
- 24.** La comparación de las secuencias obtenidas en un mismo grupo de amplificación y/o reamplificación, puede ayudar a la detección de contaminación por *carry over* introducida durante la amplificación y no detectada en los controles.
- 25.** En ausencia de clonación de los productos de amplificación, resulta preferible eliminar las secuencias directas con más de una posición ambigua.

CONCLUSIONES POBLACIONALES

26. La distancia de Reynolds y el análisis cluster muestran que los tres conjuntos muestrales definidos (“Paleolítico”, “Neolítico de Oriente Próximo” y “Neolítico de la Península Ibérica”) se encuentran filogenéticamente más próximos entre sí que a las poblaciones actuales.

27. Los tres conjuntos muestrales presentan, en general, un gran número de haplotipos no representados o de baja frecuencia en las poblaciones actuales.

28. Aunque las poblaciones antiguas difieren de las actuales, los procedimientos de reconstrucción filogenética sitúan a los haplotipos antiguos como estrechamente relacionados con los actuales, e indican que, antiguas y modernas, proceden de un acervo genético común.

29. Las muestras neolíticas de Oriente Próximo presentan una alta diversidad genética, semejante a la de las poblaciones actuales de la misma región geográfica.

30. Las muestras neolíticas de Oriente Próximo son de composición y frecuencia de haplotipos y haplogrupos distinta a la de la población actual de la misma región geográfica. Se infiere que en Oriente Próximo se ha producido un cambio en la composición genética desde el Neolítico.

31. La presencia de haplotipos poco frecuentes actualmente, comunes a algunas muestras del yacimiento neolítico de Tell Ramad y a la población Drusa del actual Israel, sugiere una muy probable relación matrilineal entre ambos.

32. La presencia de variantes mitocondriales subsaharianas en la muestra neolítica de Oriente Próximo analizada, apunta a que el flujo génico entre esta región y el continente africano se ha venido produciendo desde antes del Neolítico.

33. Los haplogrupos propuestos como marcadores de la expansión neolítica hacia Europa desde Oriente Próximo –especialmente el haplogrupo J–, no se encuentran presentes en la muestra antigua obtenida de esta área geográfica. Si descartamos el

sesgo muestral como causa, los resultados sugieren que: 1) o bien las poblaciones neolíticas que se expandieron en Europa pertenecían a una fase arqueológica posterior, o 2) que la subestructura actual del haplogrupo J no tiene su origen en el Neolítico.

34. Teniendo en cuenta solamente la composición de linajes de las muestras neolíticas de Oriente Próximo, resulta igualmente posible que la diversidad mitocondrial de las poblaciones europeas proceda: 1) de las expansiones demográficas del Neolítico; 2) de una continuidad genética desde el Paleolítico.

35. Las muestras antiguas de la Península Ibérica aquí analizadas tienen composición y frecuencia de haplotipos y haplogrupos diferente a la de las poblaciones Ibéricas actuales, lo que sugiere que, desde el Neolítico se ha producido un cambio en la composición genética de estas poblaciones.

36. La presencia del motivo 16126C-16311C –común actualmente en poblaciones de Próximo Oriente– en muestras del estrato solutrense de la Cueva de Nerja y en los yacimientos calcolíticos de Tres Montes y Abauntz, mueve a pensar en un vínculo por vía matrilineal entre estas poblaciones antiguas y las poblaciones actuales de Oriente Próximo. La falta de información de otros períodos impide datar la potencial conexión. Sin embargo, la ausencia de este motivo en nuestra muestra neolítica de Próximo Oriente podría indicar que esta conexión fuera posterior al Neolítico PPNB.

37. La presencia de casi un 50% de linajes subsaharianos L1b, L2 y L3 en los yacimientos calcolíticos de Abauntz y Tres Montes, en Navarra, sugiere la existencia en el pasado de un flujo genético importante desde África hacia esta región geográfica. La baja frecuencia de estos linajes en la población actual española apunta a que se ha producido un recambio genético desde el Calcolítico. La entrada de linajes africanos pudo darse durante el Paleolítico, durante el Neolítico, o durante ambos períodos. La presencia de secuencias filogenéticamente relacionadas en yacimientos calcolíticos de la Península Ibérica y en muestras neolíticas y calcolíticas de Oriente Próximo apunta al Neolítico como momento más probable de entrada en la península de estos linajes.

38. El haplogrupo V –supuestamente originario de la franja pirenaico-cantábrica–, está ausente en las muestras de época calcolítica de los yacimientos navarros de Abauntz y Tres Montes. Los resultados sugieren que las elevadas frecuencias actuales del mencionado haplogrupo en esta zona se deben, probablemente, a otros factores como la deriva genética y el efecto fundador.

39. En conjunto, los resultados obtenidos evidencian que desde el Neolítico se ha producido un cambio en la composición mitocondrial de las poblaciones de Siria y de la Península Ibérica. Las conclusiones derivadas de la diversidad del mtDNA en poblaciones actuales deberían tener este factor en consideración.

40. Ninguna de las secuencias antiguas recuperadas, parciales o completas, exhibe un patrón mutacional comparable al de los especímenes de Neandertal estudiados hasta la fecha. El resultado viene a sugerir que, de haberse producido una contribución neandertalense al acervo genético europeo, ésta se habría perdido antes del Neolítico.