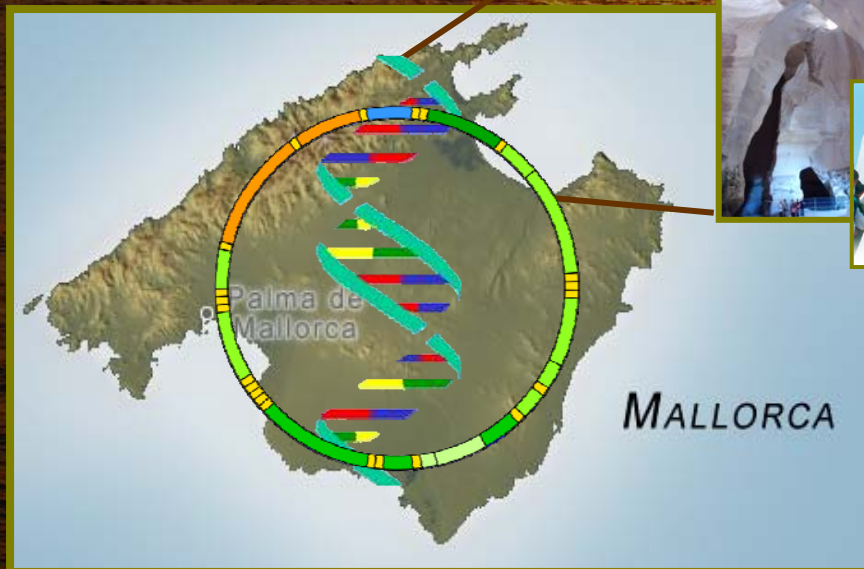




Universitat Autònoma de Barcelona

Unitat d'Antropologia Biològica
Departament de Biologia Animal, Biologia Vegetal i Ecologia.

*Bahía de Alcúdia, Mallorca:
Un crisol genético
en el Mediterráneo.*



Nancy Díaz de Villabona
Tesis Doctoral
Barcelona-España
2009



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

**“BAHIA DE ALCÚDIA,
MALLORCA:
UN CRISOL GENÉTICO EN EL
MEDITERRÁNEO”.**

MEMORIA DE LA TESIS DOCTORAL

NANCY DIAZ DE VILLABONA

**DIRECTORES:
DRA. ASSUMPCIÓ MALGOSA I MORERA.
DR. RAFAEL MONTIEL DUARTE.**

Dra. Assumpció Malgosa i Morera, Profesora titular de *l'Unitat d'Antropologia Biològica, Departament de Biologia Animal, Biologia Vegetal i Ecologia de l'Universitat Autònoma de Barcelona* y **Dr. Rafael Montiel Duarte**, investigador del Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO) del CINVESTAV-IPN, Irapuato, Guanajuato, México.

CERTIFICAN

Que el trabajo titulado "**Bahía de Alcudia, Mallorca: "Un Crisol genético en el Mediterráneo"**", presentado por Nancy Díaz de Villabona, para obtener el grado de Doctor, ha sido realizado bajo nuestra dirección, en la *Unitat d'Antropologia Biològica de l'Universitat Autònoma de Barcelona* y ha cumplido con los requisitos establecidos, por lo que autorizamos su presentación ante el tribunal calificador.

Dra. Assumpció Malgosa i Morera

Dr. Rafael Montiel Duarte.

Nancy Díaz de Villabona

**Bellaterra, Barcelona
2009**

Resumen

En este trabajo se presentan los resultados del análisis de DNA mitocondrial (mtDNA) de restos humanos 3 Necrópolis (Son Real y S'illot des Porros, pertenecientes al período Talayótico y Can Reiners, de la época tardorromana alto-medieval), situadas en la Bahía de Alcudia, al norte de la Isla de Mallorca (Archipiélago Balear). El objetivo del presente estudio es aportar datos para la caracterización, desde el punto de vista molecular, de las poblaciones antiguas de Mallorca. Se procedió a la extracción de DNA de dientes de 134 individuos (94 del período talayótico y 40 del período alto medieval). Fueron analizados 9 sitios de restricción (PCR / RFLPs) de la zona codificante del mtDNA para examinar la distribución de los haplogrupos europeos. Así mismo, se amplificó y secuenció un segmento de región HVI (16190-16420) del D-Loop. Los datos obtenidos sirven para entender la variación en el tiempo y el espacio del mtDNA en las poblaciones antiguas Mallorca, así como las relaciones filogenéticas con otras poblaciones.

Palabras clave: Haplogrupos mitocondriales, ADN antiguo, piezas dentales, Talatótico, Mallorca.

El futuro tiene muchos nombres.
Para los débiles es lo inalcanzable.
Para los temerosos, lo desconocido.
Para los valientes..... la oportunidad.

Victor Hugo.



Agradecimiento Especial
a la Universidad de Los Andes, Mérida- Venezuela,
mi Ilustre Alma Mater, por haberme concedido la beca
para la realización de este Doctorado y a
la *Universitat Autònoma de Barcelona* por abrirme
sus puertas al saber.

Agradecimiento...

El hasta ayer anhelado, es hoy una realidad que me es difícil describir, por haber sido una experiencia llena de sentimientos profundos que me han permitido ver desde otra perspectiva..... la vida, por lo que agradezco:

A Dios Todopoderoso, Padre Celestial, por los desafíos que me has permitido enfrentar con fuerza y coraje, por oír mis oraciones y darme tu bendición. **A mi Niño Jesús** y a las virgencitas **Coromoto, Guadalupe y Rosa Mística**, por esa fuerza espiritual que llena siempre mi espíritu.

A los pobladores de **Son Real, S'illot des Porros y Can Reiners** por permitirme estudiar su DNA y conocer a través de él..... **Su historia**.

*A l'Assumpció Malgosa, directora de la tesis. Gràcies per la teva confiança, per donar-me sempre l'oportunitat d'encaminar-me pel fascinant i enigmàtic món del DNA antic, sabent l'aliena que era. Gràcies pel teu suport moral quan més ho vaig necessitar i perquè mai et va faltar, és paraula d'amistat i força per a seguir endavant amb aquest desafió... **Mai t'oblidaré amiga, t'estimo molt!!!**.*

A **Rafael Montiel**, mi codirector de tesis, gracias por tu dedicación, por estos años de aprendizaje dentro de mi formación científica, por estar accesible para ayudarme a resolver mis dudas y vacilaciones, por esas tertulias sabatinas de las que tanto pude aprender y por darme tu apoyo cuando pensaba que todo estaba perdido...**Gracias, sobre todo, por ser mi amigo**.

*A la **María Pilar i Maria Eulalia**, per demostrar-me que un somriure i una abraçada a temps fan oblidar les hores baixes. Moltes gràcies per tot i per fer-me sentir com a casa meva...**Les estimo molt!!!**.*

A **Elizabeth, Jordi C. y a Luis** por esa ayuda tan desinteresada que me brindaron cuando menos lo esperaba... **Les deseo la mejor**.

*A Tots els professors i companys de l'Unitat d'Antropologia Biològica de la UBA, a la **Jessi i al Xavier**, per estar sempre allà, facilitant-nos les coses i cuidant sempre els detalls especials que van fer agradable la meva permanència en' Unitat.*

A Ti **Marc**, porque siempre tuviste tiempo de mostrarme tu amistad. Quiero agradecerte tu ayuda desinteresada y tantas horas de trabajo compartido, acumulando anécdotas que permanecerán en el tiempo y a ti **Merche**, porque a pesar de que el tiempo compartido fue muy corto, terminó siendo suficiente para apreciar tus cualidades y cimentar una linda amistad... **Que molt aviat pugui saber que vosaltres també...ho han assolit**

A **Andrea**, por la amistad que nos une. Te deseo lo mejor y aunque me encuentre en la otra orilla del océano, podrás contar conmigo. Amiga...Lucha por lo que quieres, que la constancia te dará el éxito.

A mis amigos **Justo Miguel, Patricio, Carlos, María Fernanda, Manuel, Lorena, Leonel, Pauli, Fernando y Luz Yolanda**, porque nunca faltó en ustedes esa palabra de ánimo y de confianza para seguir adelante.

A ti **Adriana**, por plasmar la belleza del Mediterráneo, en la portada de la tesis.

Las palabras me faltan para agradecerle a una familia muy especial que nos acogió y nos hizo sentir en todo momento, parte de ella....., a ustedes **Kiko, Sra. Mercedes, David e Inés Albert, Julia, Luís, Mariana, Luisito, Lidia, Isa y Greg....GRACIAS** por el apoyo, el cariño y la amistad que desinteresadamente nos han brindado, por los momentos hermosos y significativos que hemos compartido, que segura estoy, pese al tiempo y el lugar donde nos encontremos, serán perennes e imborrables porque para nosotros, ustedes son y serán siempre muy especiales..... **Els estimo i els estrany molt!**

A **Edu...** Palabras no tengo para agradecerte ese apoyo incondicional y esos sentimientos que me han permitido saber que la amistad es un tesoro sagrado, por ese cariño que no sólo me has dado a mí, sino también a mi familia y muy especialmente a mi hijo, para quien seguirás siendo su **bruja aburrida...**Amiga, a pesar de las altas y bajas que tuvimos con nuestro trabajo, hemos salido adelante y seguiremos así, a ver si algún día desde este lado del océano, Carlos Gustavo nos tiende la mano...**Te quiero mucho, comadre.**

A **mis padres** por su abnegación y amor incondicional, por esperar con ilusión y confiar en mí, a **mis hermanos Rafa, Clara, Zarahí, Marifrancis y Mabel**, por el ánimo y el apoyo incondicional que nunca me faltó para seguir adelante..... Gracias mi linda familia. Esté donde esté donde, siempre ocuparan un lugar muy especial en mi corazón. A Dios le agradezco la bendición de tenerlos... **Los adoro**

A mi **Hijo querido**, por ser mi pilar más importante, mi inspiración más preciada y mi mayor estímulo. Me siento muy orgullosa de ti. Sueño con que te prepares no sólo por la exigencia de la vida misma y por la ilustración intelectual que puedas alcanzar, sino también por la experiencia humana que te permitirá tener control contigo mismo, creciendo con humildad y fuerza moral. Perdona hijo querido, por las horas que no te dediqué y por los momentos que no entendiste, pero quiero que sepas que tu alegría, tu dulzura y tu comprensión me dieron las fuerzas para alcanzar esto que hoy te entrego..... Mi humilde ejemplo. Recuerda hijo que demostrando excelencia en las pequeñas cosas, es donde el hombre signa su verdadera grandeza...**Te adoro mi cielo y que Dios y la Virgen te bendigan siempre,**

A **Juanca...** que puedo yo decirte mi amor, si todo esta dicho!!!. Gracias por tu comprensión, por tu apoyo incondicional, por tu preocupación, por saber esperar

con paciencia, por respetar mis momentos y mostrarme que a tu lado, la palabra miedo, no existe. Sólo Dios sabe cuan agradecida te estaré siempre por el sacrificio que has hecho por mi. Por todas esas cosas que sólo nos pertenecen y que no sabría como describirlas...**Te amo!**

A mis Seres queridos que ya no están, pero que desde el cielo nos miran y nos cuidan, con amor.

NO IMPORTA LA INMENSIDAD DEL RETO
LO IMPORTANTE ES LOGRAR LO QUE TE HAS PROPUESTO.

NANCY JABIBE

INDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCION	
1.1 Factores Evolutivos	2
1.2 El DNA Antiguo y la Paleogenética	5
1.3 El DNA Antiguo y los Sistemas genéticos	7
1.3.1 EL mtDNA	7
1.3.1.1 Características del genoma mitocondrial (mtDNA)	10
1.3.1.2 Linaje mitocondrial europeo	13
1.3.1.3 Linajes mitocondriales en África, Oceanía, América y Asia	15
1.4 Aplicación de los estudios de aDNA	17
1.5 Fuentes principales para la obtención de aDNA	19
1.6 Problemática asociada al análisis de aDNA	22
1.6.1 Degradación <i>post-mortem</i> y Daño Molecular	23
1.6.2 Presencia de sustancias inhibidoras de la PCR	24
1.6.3 Contaminación	26
1.7 Autenticación del aDNA	27
1.8 Caracterización arqueológica de las necrópolis estudiadas	29
1.8.1 Época Talayótica	30
1.8.1.1 Necrópolis de Son Real	32
1.8.1.2 Necrópolis de S'Illot des Porros	33
1.8.2 Época Alto-Medieval	35
1.8.2.1 Necrópolis de Can Reiners	36
2. OBJETIVOS	38
2.1 Objetivo General	39
2.1.1 Objetivos metodológicos	39
2.1.2 Objetivos filogenéticos y poblacionales	40
3. MUESTRAS Y METODOLOGIA	42
3.1 Muestras analizadas	43
3.1.1 Muestras dentarias	44
3.1.2 Muestras óseas	45
3.2 Metodología	45
3.2.1 Protocolo experimental	45
3.2.2 Obtención de la muestra	49

3.2.2.1 Lavado y esterilización de la superficie externa de las muestras.	49
3.2.2.2 Obtención del polvo dentario y óseo	51
3.2.2.2.1 Polvo dentario	51
3.2.2.2.2 Polvo óseo	53
3.3 Extracción orgánica: purificación y concentración del DNA	55
3.3.1 Fase de purificación	55
3.3.2 Fase de concentración	56
3.4 Caracterización genética	59
3.4.1 Análisis de polimorfismos de restricción (RFLPs)	59
3.4.2 Detección de productos amplificados	61
3.4.3 Análisis de la región hipervariable 1 del mtDNA (HVS-I)	64
3.4.3.1 Purificación de los fragmentos de secuenciación	65
3.4.3.1.1 Purificación con geles de agarosa	65
3.4.3.1.2 Purificación con Kit comercial	67
3.4.3.2 Secuenciación de productos amplificados	68
3.4.3.2.1 Eliminación de terminadores de la reacción de secuenciación	68
3.5 Muestras inhibidas	69
3.6 Caracterización genética del investigador	70
3.7 Análisis Estadísticos	70
3.7.1 Región codificante (RFLPs)	70
3.7.2 Región de control ó HVS-I de mtDNA	71
4. RESULTADOS	75
4.1 Metodología y criterios de autenticidad	76
4.1.1 Procesamiento de blancos extracción y de amplificación	78
4.1.2 Replicación de muestras en el laboratorio	79
4.1.3 Replicación de muestras en el laboratorio independiente	80
4.1.4 Valoración de la efectividad de las muestras analizadas	80
4.1.5 Determinación de variabilidad mitocondrial entre las muestras de un mismo grupo o set de extracción	81
4.2 Análisis intrapoblacional	90
4.2.1 Región codificante del mtDNA	90
4.2.2 Región control o HVS-I	93
4.2.3 Análisis de Correspondencia RFLPs/HVS-I	99
4.3 Caracterización genética del investigador	101

4.4	Análisis interpoblacional	101
4.4.1	Región codificante	101
4.4.1.1	Frecuencias de haplogrupos en poblaciones antiguas	101
4.4.1.2	Frecuencias de haplogrupos en poblaciones antiguas y contemporáneas	103
4.4.1.3	Frecuencias de haplogrupos en poblaciones antiguas y contemporáneas del Archipiélago Balear	109
4.4.1.4	Análisis de Componentes principales	111
4.4.1.5	Diversidad genética	115
4.4.1.6	Distancias genéticas	116
4.4.1.7	Test exacto de diferenciación poblacional	121
4.4.2	Región control del mtDNA o HVS-I	122
4.4.2.1	Índices de diversidad	122
4.4.2.1.1	Diversidad genética	122
4.4.2.1.2	Nº de haplotipos diferentes	123
4.4.2.1.3	Diversidad del número de sitios polimorficos	126
4.4.2.1.4	Diversidad nucleotídica y Nº medio de diferencias por pareja	127
4.4.3	Reconstrucción filogenética	131
4.4.3.1	Distancias genéticas	131
4.4.3.2	Redes medias (<i>Networks</i>)	138
4.4.3.2.1	Redes filogenéticas con fragmento de 156 pb (16209-16365)	140
4.4.3.2.2	Redes filogenéticas con fragmento de 126pb (16243-16365)	156
4.4.3.2.3	Redes filogenéticas a partir de secuencias obtenidas entre series antiguas	162
4.4.4	Haplotipos únicos y compartidos entre poblaciones antiguas y actuales	164
4.4.5	Análisis de la HVS-I de las series antiguas y poblaciones contemporáneas del Archipiélago Balear	169
5.	DISCUSIÓN	172
5.1	Metodología	173
5.2	Eficiencia en la recuperación de material genético.	178
5.3	Criterios de autenticidad.	180
5.4	Análisis filogenéticos y poblacionales.	182
6.	CONCLUSIONES	202
7.	BIBLIOGRAFÍA	207

Abreviaturas

A: Adenina

a.C.: antes de Cristo

aDNA: DNA antiguo

BP: *before present*

C: Citocina

CP: Comunicación Personal

CR: Can Reiners

CRS: *Cambridge Reference Sequence*

d.C.: después de Cristo

D-loop: mitochondrial Displacement loop

DNA: *Deoxyribonucleic Acid.*

F: *Primer Forward*

G: Guanina

HVS-I: Región hipervariable I del DNA mitocondrial

HVII: Región hipervariable II del DNA mitocondrial

H: *mitochondrial DNA Heavy strand*

IP: S'Illot des Porros

KE: Blanco de Extracción

K: Blanco de Amplificación

L: *mitochondrial DNA Light strand*

mtDNA: genoma mitocondrial

NRY: porción no recombinante del cromosoma Y

O₂: *Peroxide radical*

OH: *Hydroxyl radical*

pb: pares de bases

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

R: *Primer Reverse*

RNA:

RFLPs: *Restriction Fragment Length Polymorphisms*

SR: Son Real

SNPs: *Single nucleotide polymorphisms*

T: Timina

UAB: Universidad Autónoma de Barcelona

UV: luz ultravioleta

YHRD: *Y-Chromosome Haplotype Reference Database*

Unidades de medida:

µl: microlitro

µg: microgramo

g: gramo

Km: Kilómetro

mg: miligramo

ml: mililitro

mM: milimolar

rpm: revoluciones por minuto

pmol: picomol

Reactivos:

BSA: Bovine Serum Albumin

dNTPs: deoxyribonucleotide bases

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

HCl: Ácido Clorhídrico

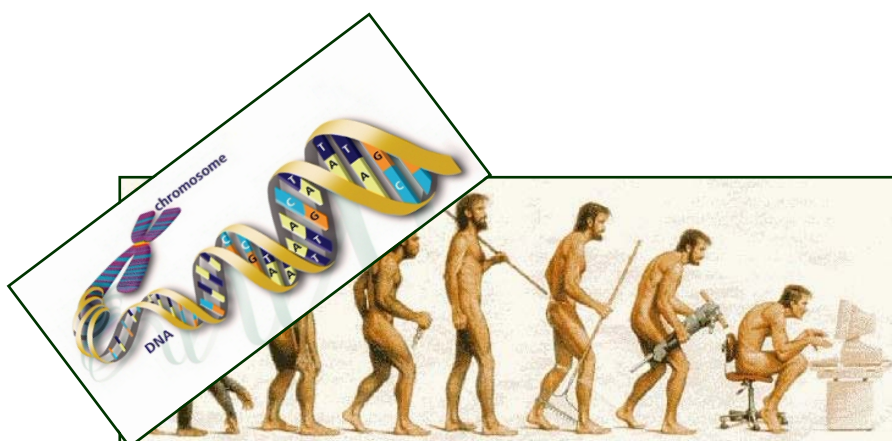
Mg₂Cl: Cloruro de Magnesio

SDS: Dodecil sulfato de sodio

PK: proteinasa K

Taq: *Termus aquaticus*

Tris: Hidroximetil aminometano



1.- INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN.

Durante más de una década, investigadores de diferentes disciplinas han tratado de describir la variabilidad genética del hombre, mediante el análisis de la dinámica y la genética poblacional, valiéndose para ello de distintos marcadores genéticos y técnicas moleculares de vanguardia, y aplicándolas a distintos conjuntos de poblaciones antiguas y modernas de varios continentes (Cavalli-Sforza *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1995; Watson *et al.*, 1997; Comas *et al.*, 1998; Torroni *et al.*, 1998; Stone y Stoneking, 1999; Simoni *et al.*, 2000; Montiel 2001; Brakez *et al.*, 2001; Vona *et al.*, 2001; Santos, 2002; Yao *et al.*, 2002; Salas *et al.*, 2002, Keyser-Tracqui *et al.*, 2003; Cordaux *et al.*, 2003; Dupanloup *et al.*, 2004; Rajkumar *et al.*, 2004; Lima *et al.*, 2004; Swarkar *et al.*, 2005; Solórzano, 2006; Gao *et al.*, 2007, entre otros). Con ello se pretende contribuir a la reconstrucción de la historia evolutiva del hombre y de otras especies (Wallace, 1997; Cavalli-Sforza, 1998), demostrando que el conocimiento de la variabilidad genética representa el sustrato que facilita la comprensión del proceso evolutivo del hombre.

1.1 FACTORES EVOLUTIVOS.

La evolución molecular es un proceso histórico a través del cual los genes acumulan cambios en su secuencia nucleotídica, debido a eventos estocásticos y selectivos (González *et al.*, 2002). La huella genética dejada en las poblaciones pretéritas, es el producto de la interacción de factores aleatorios relacionados con el tiempo y factores biológicos, por ello son susceptibles a cambios que se dan a través de cuatro factores evolutivos fundamentales:

- **Selección natural:** teoría clásica de evolución propuesta por Darwin por medio de la cual se explica la evolución biológica, partiendo del principio de que las condiciones medio ambientales tales como el clima, la temperatura, la alimentación, entre otros, favorecen o dificultan la supervivencia y por ende, la reproducción de organismos vivos según sean sus peculiaridades. Como proceso biológico, representa el origen de

las adaptaciones fenotípicas y una herramienta importante de cambio evolutivo (Perfectti *et al.*, 2009), estableciendo las diferencias poblacionales, favoreciendo la expansión de los alelos de manera diferencial (Plaza, 2004), jugando un importante rol en la evolución del genoma mitocondrial humano (Kivisild, 2006).

No obstante, hoy en día la teoría sintética de la evolución define el concepto de selección natural como la reproducción diferencial de los genotipos en una población y expresa que no es la única razón o causa de evolución (Templeton, 1982).

- **Deriva genética:** Se considera un factor estocástico que puede cambiar las características de las especies ya que produce una alteración o modificación de la composición genética de una población de forma aleatoria y que generalmente es observable en poblaciones pequeñas y aisladas. Autores como Cavalli-Sforza y colaboradores (1994), parten del principio que la velocidad de deriva genética en poblaciones con estas características, es alta de una generación a otra. En los casos de deriva genética extrema, se producen dos efectos: el fundador y el cuello de botella.

En el primero de los casos (efecto fundador) es la deriva génica producida cuando un grupo reducido se separa de una población para fundar una nueva población. El efecto cuello de botella, se produce en aquellas poblaciones que reducen de forma drástica su tamaño, incrementándose las fluctuaciones aleatorias en las frecuencias alélicas.

- **Migración o flujo génico:** Entre los factores evolutivos que afectan la estructura genética de las poblaciones se encuentran, también la migración, que implica salida y/o ingreso de individuos, y por ende, de sus genes a/de la población, es decir, es lo que se conoce como flujo génico, con el cual se pueden afectar la estructura genética de las

poblaciones y su patrimonio genético, reduciendo con el tiempo la diversidad poblacional e implicando, a su vez, nuevos intercambios reproductivos (Cavalli-Sforza *et al.*, 1994).

Mutación: Se trata de cambios permanentes heredables y estables que alteran la secuencia del DNA y que pueden o no introducir nuevas funciones. De estos cambios deriva la clave de la diversidad genética sobre la cual actúa la selección natural, y también la deriva (Sarmiento, 2001; Plaza, 2004).

Salvo que ocurra en un sitio de alta tasa de mutación, una mutación que se encuentre en individuos de dos o más regiones geográficas distintas, indica que dicha mutación ocurrió en un ancestro común de los pobladores de tales regiones, es decir, que ocupaba un mismo espacio físico en algún momento y que posteriormente emigraron a diferentes regiones que ahora ocupan. Por el contrario, una mutación que sólo aparezca en los individuos de una región, indica que esa mutación ocurrió después de que los pobladores emigraran, separándose físicamente de los pobladores de las otras regiones.

De la interacción de las fuerzas evolutivas, resulta el llamado acervo genético de las poblaciones actuales (Bosch *et al.*, 2003). Los estudios de genética de poblaciones humanas antiguas muestran que la acción de las fuerzas evolutivas como la deriva genética y el efecto fundador, han generado divergencias genéticas que se observan al analizar los tipos mitocondriales, en las diferentes áreas geográficas. De esta manera, la composición genética de una población pretérita puede diferir parcial o totalmente de la población que la ocupa actualmente.

Estos estudios poblacionales se han basado principalmente en dos sistemas genéticos haploides que no presentan recombinación y que han integrado la información genealógica materna y paterna respectivamente:

- El genoma mitocondrial (mtDNA) que es heredado exclusivamente por vía materna (Cann *et al.*, 1987; Vigilant *et al.*, 1991; Torroni *et al.*, 1996; Richards *et al.*, 2000; Montiel, 2000; Fernández Domínguez, 2005; Solórzano, 2006, entre otros).
- La porción no recombinante del cromosoma Y (NRY) (Jobling *et al.*, 1995; Jobling *et al.*, 1997; Underhill *et al.*, 2000; Francalacci *et al.*, 2003; Kayser *et al.*, 2003; Álvarez, 2006; Karafet *et al.*, 2008;), que se hereda por la vía paterna.

La interacción de estos marcadores genéticos en las investigaciones de carácter genético-poblacional, han revelado ser muy eficientes a la hora de detectar la existencia de subestructuraciones en las poblaciones humanas (Santos, 2005). A partir de la caracterización de cualquiera de estos marcadores genéticos ha sido posible elaborar hipótesis sobre la evolución humana, basadas en inferencias en la historia demográfica que incluye fenómenos de "cuello de botella" (*bottleneck*), expansiones y grandes migraciones (Álvarez, 2006).

Por ejemplo, la determinación del tiempo del antecesor común más reciente (Time back of the Most Recent Common Ancestor-TMRCA) dentro del marco del modelo "Out-of-Africa", presupone un origen africano de los humanos modernos y la determinación de las afinidades entre poblaciones, para tener una idea de una posible historia evolutiva común, a diferentes niveles: regional, continental o mundial (Underhill *et al.*, 2000).

1.2.- DNA ANTIGUO Y LA PALEOGENÉTICA.

El DNA antiguo (en adelante, aDNA) es un material genético muy degradado, fragmentado y susceptible a contaminarse con DNA moderno, proveniente de restos biológicos preservados natural o artificialmente (Malgosa *et al.*, 2005; Solórzano, 2006). A pesar de su condición bioquímica, contiene información muy útil para los estudios de evolución molecular y de reconstrucción filogenética, poblacional, antropológica, arqueológica y forense (O'Rourke *et al.*, 1996);

asimismo, permite deducir datos sobre la evolución humana; todo ello, enmarca la paleogenética (Scholz *et al.*, 2000).

El análisis del aDNA permite construir hipótesis basadas no sólo en inferencias estadísticas basadas en relaciones filogenéticas y la historia evolutiva de secuencias actuales, sino que además puede permitir el análisis directo de secuencias provenientes del pasado, permitiendo estudiar la evolución molecular a través de largos períodos de tiempo (Hagelberg *et al.*, 1994a; Hagelberg *et al.*, 1994b; Dennis *et al.*, 2000; Montiel, 2001; Relethford, 2001; Cipollaro *et al.*, 2005). En el ámbito antropológico esta característica podría, por ejemplo, contribuir a la deducción de las rutas y los tiempos de la expansión humana fuera de África (Dayton, 2003).

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Saiki *et al.*, 1985; Mullis y Faloona, 1987), ha marcado un avance técnico clave para el surgimiento del aDNA como línea de investigación al lograr obtener cantidades exponenciales de copias de un determinado fragmento de DNA a partir de unas pocas copias iniciales, incorporando una enzima termoestable conocida como "Taq DNA polimerasa"

Hasta ahora, la mayoría de investigaciones con aDNA se han centrado en el estudio del mtDNA, especialmente en la denominada región control (Hagelberg *et al.*, 1994a; Lalueza *et al.*, 1997; Oota *et al.*, 1999; Montiel, 2001; Fernández Domínguez, 2005; Casa, 2005; Solórzano, 2006; Caramelli *et al.*, 2007, entre otros), no por ello se descarta la posibilidad de realizar investigaciones empleando otros marcadores genéticos como STRs nucleares y del cromosoma Y, como lo demuestran algunos estudios (p.ej. Zierdt *et al.*, 1996; Schultes *et al.*, 1999; Bramante *et al.*, 2000). Existen metodologías efectivas para el análisis de material genético proveniente de material óseo o dentario, tanto para la extracción de DNA como para la eliminación de la contaminación superficial (Hagelberg *et al.*, 1991; Höss y Pääbo, 1993; Krings *et al.*, 1997; Cipollaro *et al.*, 2005;).

1.3.- aDNA Y LOS SISTEMAS GENÉTICOS.

La historia evolutiva del hombre se puede inferir a través de diversas disciplinas como la genética molecular que, utilizando diversas técnicas de vanguardia y marcadores genéticos tanto autosómicos, del mtDNA (matrilineal), así como del NRY (patrilineal) (Underhill *et al.*, 2000; Stumpf y Goldstein, 2001), para analizar muestras pretéritas. Estas técnicas deben adaptarse a las condiciones biológicas de las muestras arqueológicas (Cipollaro *et al.*, 2005).

El estudio de estos marcadores brinda una importante información sobre la diversidad genética y ayuda a establecer las posibles diferencias a lo largo de la historia demográfica de una población (Francalacci *et al.*, 2003), resultados que dentro del campo del aDNA, dependerán siempre del estado de conservación y preservación de los tejidos así como del tiempo transcurrido y de las condiciones ambientales a las que han estado sometidos los restos antiguos a analizar.

De igual manera es necesario tener en cuenta que se trata de muestras muy susceptibles de ser contaminadas con DNA moderno (Casas, 2005). No obstante, a pesar de estas dificultades biológicas que pueden interpretarse como obstáculos, es posible recuperar y analizar pequeños fragmentos de aDNA, siendo imprescindible aplicar estrictos criterios de esterilización, estableciendo controles específicos y muy rigurosos de calidad y de autenticación de los productos obtenidos (Montiel *et al.*, 2007). Entre los sistemas genéticos más empleados en los estudios con aDNA se citan: mtDNA, Cromosoma Y y STR autosómicos.

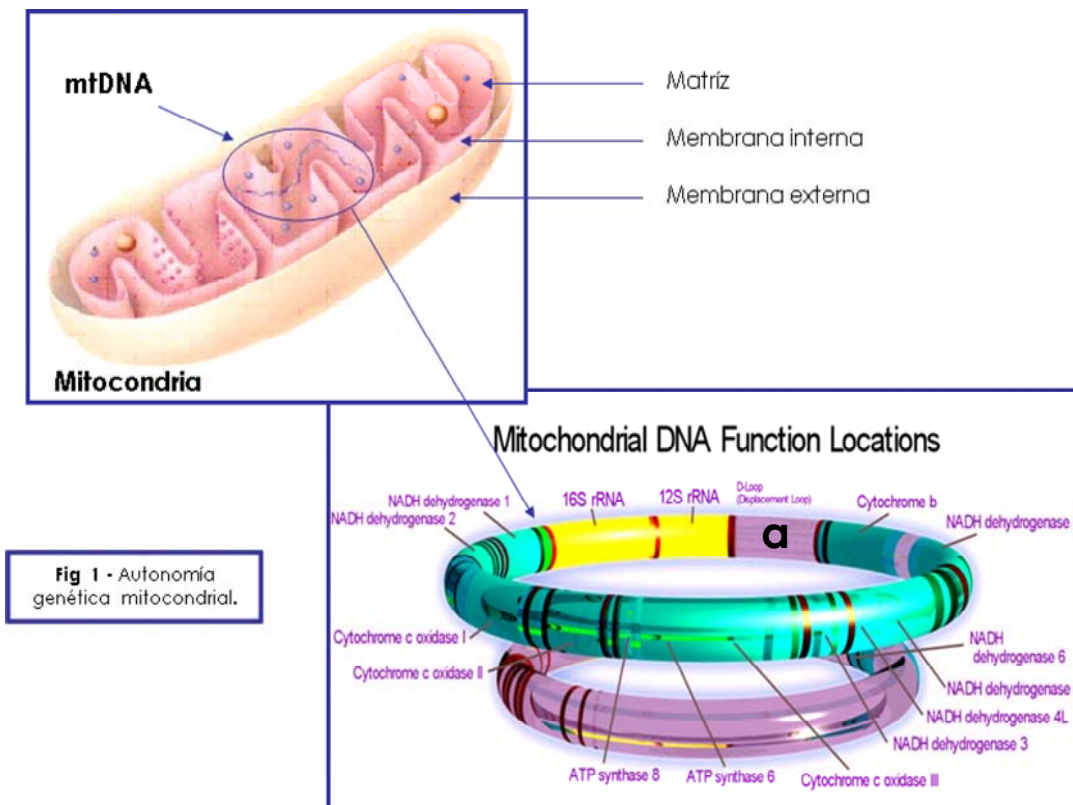
1.3.1.mtDNA :



Desde el punto de vista molecular el mtDNA se define como una pequeña molécula de estructura bicatenaria y circular compacta localizada en la matriz mitocondrial (Fig. 1), con una longitud de 5 µm y una masa molecular de 10 MDa, constituida aproximadamente por 16.569 pares de bases y que no posee intrones, de modo tal que las regiones que codifican son contiguas. En el año

1981, fue secuenciado en su totalidad por Anderson y colaboradores (1981) y revisado por Andrew y colaboradores (1999). Esta secuencia conocida como Cambridge Reference Sequence (CRS), es utilizada como referencia en los alineamientos nucleotídicos.

El genoma mitocondrial está compuesto por dos cadenas o hebras: la cadena H (pesada o Heavy) y la cadena L (ligera ó *Light*), las cuales difieren según el contenido de bases purínicas (Luque y Herréz, 2006). Está constituido por una región codificante y una región no codificante, llamada bucle D (D-Loop).



La región codificante que representa el 90% de su genoma, está conformada por 37 genes: 13 para proteínas que son componentes esenciales de los complejos enzimáticos I, III, IV y V del sistema de fosforilación oxidativa (el complejo II es codificado completamente por el ADN nuclear), 2 RNAs ribosómicos y 22 RNAs de transferencia, útiles para sintetizar proteínas intramitocondriales (Wallace, 1995; Rigoli, 2000).

La región no codificante llamada también bucle D (D-loop) o zona de desdoblamiento, señalada con la letra **a** en la figura 1, cuenta aproximadamente con 1.121 pb (Wallace, 1997) y representa alrededor de un 10% del genoma (Anderson *et al.*, 1981). Esta zona posee un alto grado de polimorfismo, conteniendo además los promotores de transcripción de ambas cadenas y el origen de replicación de la cadena pesada. En esta región se localizan dos segmentos hipervariables denominados I y II (HVS-I y HVS-II, por sus siglas en inglés), observándose un mayor grado de variabilidad en el HVS-I (Wakeley, 1993). En esta región se localizan puntos calientes (*hotspots*) con una frecuencia de mutación muy alta, condición ésta que la hace apropiada para los estudios forenses (Wakeley, 1993; Meyer *et al.*, 1999; Fernández Domínguez, 2005).

Los primeros estudios del mtDNA se basaron en análisis de RFLPs de la región codificante y fueron realizados por Wesley Brown en el año 1980 (Brown, 1980). Posteriores investigaciones se centraron en la HVS-I por ser la más variable (Vigilant *et al.*, 1990), lo que hace que sea el segmento más usado para estudiar poblaciones humanas y del que se tiene mayor información (Handt *et al.*, 1994; Ingman, 2001). Finalmente, la combinación del análisis de los sitios polimórficos estables en la región codificante (RFLPs) definidos para los distintos linajes poblacionales y posterior secuenciación de la región hipervariable I (HVS-I) o II (HVS-II), ha permitido una mayor diferenciación y caracterización de los tipos mitocondriales (Torroni *et al.*, 1996; Randon *et al.*, 1998; Macaulay *et al.*, 1999).

La mayoría de las investigaciones con aDNA se han centrado en el estudio del DNA mitocondrial (mtDNA), especialmente en la llamada región de control (Hagelberg *et al.*, 1994a; Lalueza *et al.*, 1997; Pakendorf *et al.*, 2005; Fernández Domínguez, 2005). No obstante, el análisis combinado de los sitios polimórficos de la región codificante con los observados en la región de control, permite alcanzar un mayor nivel de fiabilidad en la autenticación del aDNA mitocondrial (Montiel *et al.*, 2007).

1.3.1.1 CARACTERÍSTICAS DEL GENOMA MITOCONDRIAL (mtDNA) .

Los marcadores genéticos del mtDNA confieren gran fiabilidad a los estudios de identificación de restos arqueológicos, ya que presentan características muy adecuadas para estos estudios (Hagelberg *et al.*, 1994a; Montiel, 2001; García *et al.*, 2002; Shen *et al.*, 2004; Malgosa *et al.*, 2005; Solórzano, 2006), ofreciendo una posibilidad única de investigar sobre la historia humana pasada en un contexto de macro y microevolución, a pesar de las limitaciones técnicas y de degradación del DNA. Entre las características que lo diferencian del DNA nuclear, se pueden citar:

- **Herencia matrilineal:** Giles y colaboradores en 1980, demostraron que este genoma se hereda por vía monoparental femenina, lo que ha permitido estudiar la antigüedad de las mutaciones y analizar el flujo migratorio de grupos humanos desde tiempos muy remotos, así como realizar la reconstrucción filogenética de poblaciones humanas, ya que preserva la genealogía materna de las poblaciones (Cann *et al.*, 1987; Elson, 2001).

Esta forma de transmisión hace que la acumulación de cambios nucleotídicos que se observa entre los individuos, sea función del tiempo sin la intervención de la recombinación; así pues los únicos cambios que han ocurrido, se deben exclusivamente a mutaciones a lo largo de generaciones, preservándose la información filogenética. La falta de recombinación convierte al mtDNA en una herramienta privilegiada en estudios evolutivos y en el análisis de migraciones humanas.

Aunque la transmisión de este marcador es exclusivamente materna (Fig. 2), algunos autores (Hagelberg, 2003), defienden la teoría de que la discrepancia entre las distintas tasas de mutación calculadas a través de distintos estudios podría sostener que esta herencia también puede ser paterna. Sobre este aspecto se ha deliberado, debido a los resultados de algunos trabajos como el de Schwartz y Vissing (2002), quienes publicaron un caso de herencia mitocondrial paterna, en un individuo con una

enfermedad mitocondrial que evidenciaba la recombinación entre el mtDNA de origen materno y paterno (Schwartz y Vissing, 2002)).

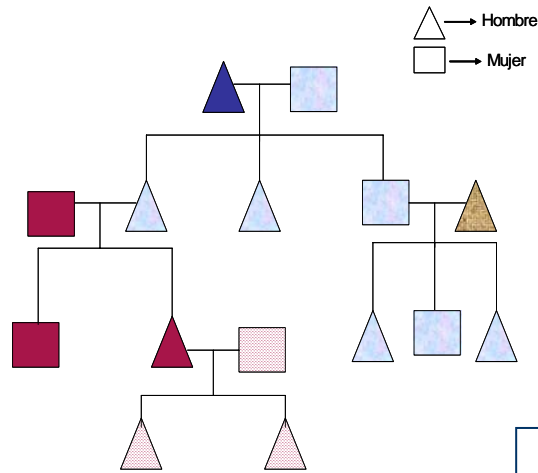


Fig. 2 - La herencia materna del mtDNA.

Más adelante, Bromhamn (2003), publica el estudio de un individuo en cuyas células musculares existían dos haplotipos mitocondriales diferentes, uno perteneciente a la madre y el otro idéntico al del padre. Estos estudios hacen presumir la posibilidad de herencia paterna del mtDNA humano, pero la ausencia de referencias similares impide confirmarlo. En tal sentido, la frecuencia de estos eventos determinaría su verdadera importancia en estudios evolutivos y de genética de poblaciones.

- **Binding proteins:** A diferencia del DNA nuclear, el mtDNA no presenta histonas, pero en su lugar se encuentran unas proteínas de unión (*binding proteins*) parecidas a las histonas (*histone like*), conformando una estructura denominada nucleoides la cual podría ayudar a preservar el DNA por más tiempo.
- **Poliplasmia:** En comparación con el DNA nuclear, el mtDNA presenta un gran número de copias en cada célula (Izagirre, 1998; Keyser-Tracqui *et al.*, 2002), incrementando su probabilidad de preservación. La presencia de múltiples copias de esta molécula en cada mitocondria, así como la probabilidad de que algunas copias sobrevivan durante períodos de

tiempo substanciales, permiten definir al mtDNA como un marcador genético confiable.

- **Alta tasa de mutación:** La tasa de mutación del mtDNA es 5 a 10 veces mayor que el DNA nuclear (Ingman, 2000; Martínez-Arias *et al.*, 2000; Pakendorf *et al.*, 2005; entre otros) lo que determina su utilidad en estudios evolutivos tanto intraespecíficos como entre especies próximas (Elson *et al.*, 2001), sirviendo además para calibrar la historia de las poblaciones humanas (Sigurdardottir *et al.*, 2000).

La tasa de mutación mitocondrial explica también la gran variabilidad de secuencias de mtDNA entre individuos que han resultado muy útiles para los estudios antropológicos, etnológicos y forenses, constituyendo la base de la hipótesis de que el hombre actual desciende de una mujer que vivió en África hace unos 100.000 - 200.000 años, la denominada "Eva mitocondrial" (Cann *et al.*, 1987). Según Neckelmann y colaboradores (1987), esta característica es probablemente una consecuencia de la falta de histonas. Aunado a esta propiedad, la falta de un sistema de reparación efectivo contribuye de igual manera a la acumulación de mutaciones.

- **Polimorfismo:** La alta tasa de mutación del mtDNA resulta en un elevado contenido de polimorfismo, lo que es esencial para estudios poblacionales. Así, los estudios de polimorfismos del mtDNA han permitido tener un mejor conocimiento de las migraciones de las poblaciones humanas (Torrioni *et al.*, 1993; Bailliet *et al.*, 1994).
- **Segregación mitótica:** Durante la división celular, las mitocondrias se distribuyen entre las nuevas células de forma aleatoria. Todo individuo presenta normalmente un único genoma mitocondrial idéntico (homoplasmia) en todas sus células, pero al ocurrir una mutación se generan dos poblaciones de mtDNA, una normal y otra mutada (heteroplásmica). La proporción de mtDNA mutado puede variar y por lo

tanto varia el fenotipo (Andreu *et al.*, 2004). Sin embargo, Battersby y colaboradores (2003) señalan que podría existir un control nuclear sobre este proceso.

1.3.1.2 LOS LINAJES MITOCONDRIALES EUROPEOS.

Los estudios de poblaciones humanas han descrito una serie de polimorfismos ancestrales asociados, cuya combinación han definido los llamados haplogrupos (Benedictus *et al.*, 1999) definidos como tipos de mtDNA usados comúnmente en la reconstrucción de los distintos linajes (Torroni *et al.*, 1998; Macaulay *et al.*, 1999, 2000; Richards *et al.*, 2000). Hoy en día, han sido identificados diversos haplogrupos oriundos de África, Europa, Asia, islas del Pacífico y América (Fig. 3) incluyendo grupos étnicos particulares. Estos haplogrupos siendo específicos de una región geográfica determinada, a veces se encuentran en otro contexto debido a movimientos migratorios. Es por ello que, dada la naturaleza genética del mtDNA, cada continente presenta haplogrupos específicos (Fig. 3), tal como lo afirman diversos estudios (Wallace y Torroni, 1992; Richards *et al.*, 1996; Salas *et al.*, 2002).

Los datos aportados en algunos estudios (Torroni *et al.*, 1998, Macaulay *et al.*, 1999; Richards *et al.*, 2000), han demostrado que los *clusters* o haplogrupos principales que engloban la variabilidad mitocondrial de Europa son H, I, J, K, M, T, U, V, W y X (Torroni *et al.*, 1996), pero dentro de estos 10 haplogrupos, 7 de ellos (H, I, J, K, T, V, W) se destacan exclusivamente en Europa desde la separación entre caucasoides ancestrales y los africanos y asiáticos. No obstante, Mishmar *et al.* (2003), señalan que la mayor parte de los haplogrupos europeos, derivan del macrohaplogrupo N proveniente del Oriente Medio.

Estos haplogrupos presentan una distribución geográfica en el continente europeo, mostrando una alta homogeneidad genética (Comas *et al.*, 1997; Simoni *et al.*, 2000; Richards *et al.*, 2002). En relación a este aspecto, autores como Richards *et al.*, 1996 e Izaguirre *et al.*, 1999, plantean que en Europa la variabilidad mitocondrial en relación a los haplogrupos, proviene de poblaciones del Paleolítico Superior con una antigüedad de 20.000-50.000 años. La mayoría

de los datos aportados por estudios realizados con los principales linajes del genoma mitocondrial, demuestran que los haplogrupos H y U son los que presentan una mayor frecuencia (Richards *et al.*, 1996; Maca-Meyer *et al.*, 2001).

En cuanto al **haplogrupo H**, se trata del clado más frecuente entre las poblaciones europeas (Santos, 2002) y típicamente caucasoide. Está definido por la posición polimórfica -7025 *Alu I*. Este haplogrupo se originó en el Próximo Oriente hace 25.000-30.000 años desde donde se expandió posteriormente hacia Europa (Richards *et al.*, 1998; Torroni *et al.*, 1998). Recientemente, han sido descritos 15 subhaplogrupos, definidos todos ellos por mutaciones en la HVS-I (Achilli *et al.*, 2004)

El **haplogrupo U**: Su sitio polimórfico es +12308 *Hinf I*, es casi específico para Europa, pero tiene una importante representación en el norte de África (Torroni *et al.*, 1996) y Asia Central, con una frecuencia estimada entre el 15 y 30% (Kivisild *et al.*, 2004; Achilli *et al.*, 2005). Está determinado por la transición 12308 A > G (Finnilä *et al.*, 2001) y lo conforman subgrupos que van desde U1 a U8, siendo U5 el subhaplogrupo más antiguo (~50.000 YBP) (Richards *et al.*, 2000) e incluyendo al subhaplogrupo K (*Hae II*), como uno de ellos (Richards *et al.*, 1998).

El **haplogrupo W** (*Hae III*) se considera uno de los menos frecuentes en Europa y de acuerdo con Richards y colaboradores (1998), es un haplogrupo relativamente antiguo (12000 a 18000 YBP). El sitio polimórfico para este haplogrupo es el -8994 *Hae III* y los cambios nucleotídicos típicos son: **16223 T→C, 16292 T→C**.

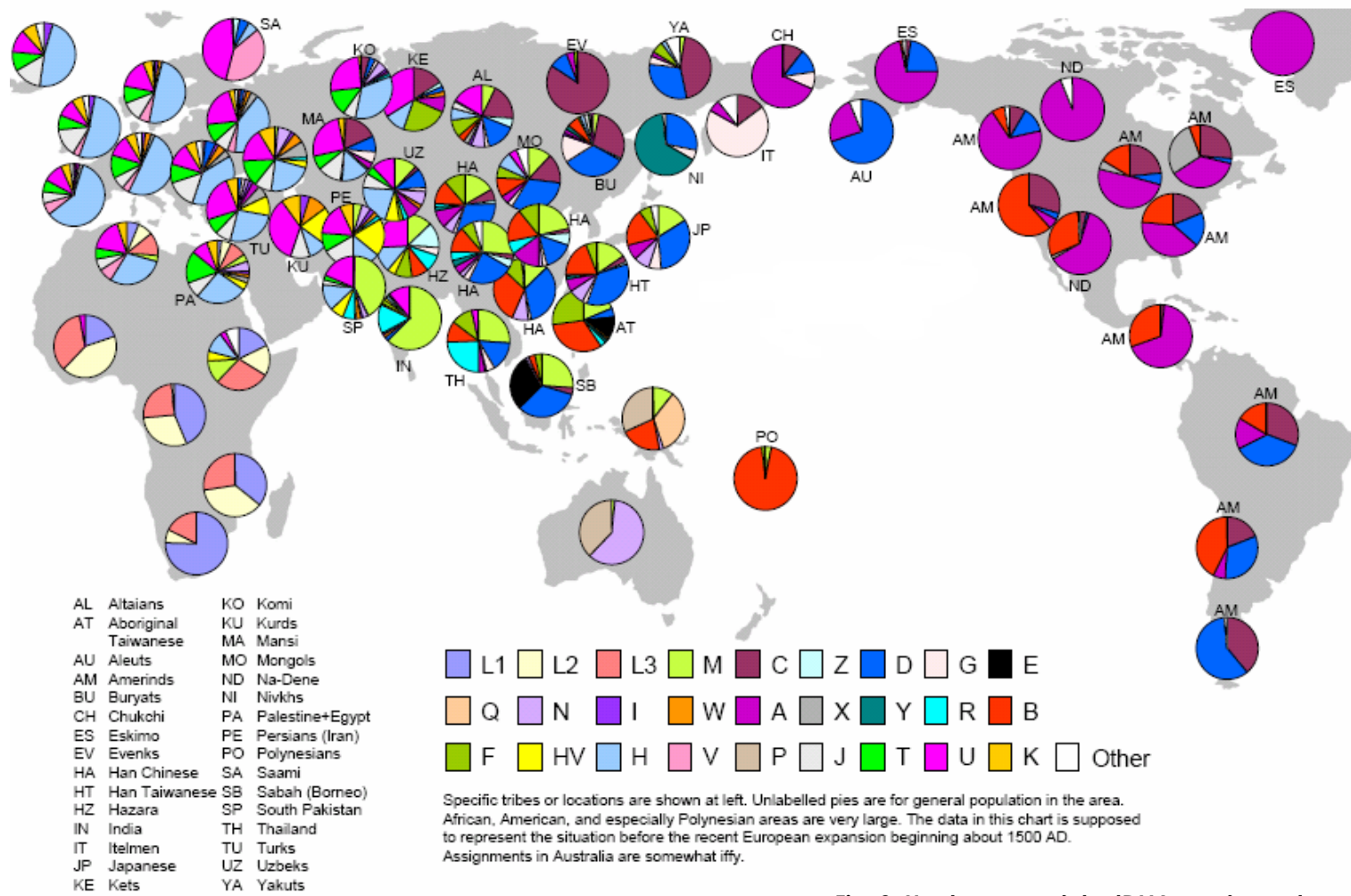
En relación a los **haplogrupos T** (-15606 *Alu I*) e **I** (+9052 *Hae II*), su antigüedad se estima en aproximadamente 35.000 años, como producto de la entrada de *Homo sapiens* en Europa, mientras que el **haplogrupo V**, caracterizado por el cambio nucleotídico T→C en la posición 16298 de la región control (Torroni *et al.*, 2001) y el sitio polimórfico -4575 *Nla III*, se estima entre 12.000 y 13.000 años de antigüedad.

El origen geográfico del **haplogrupo V** se sitúa en el norte de la Península ibérica y Sur de Francia (Izagirre, 1998; Torroni *et al.*, 1998). Sin embargo, estos autores describen que se trata de un haplogrupo que en poblaciones aisladas se encuentra en muy alta frecuencia, como por ejemplo entre los beréberes del Norte de África (20%), pero se halla virtualmente ausente en el sureste de Europa y en el Medio Oriente. Asimismo, el **haplogrupo J**, se caracteriza por los cambios nucleotídicos **16126 T→C y 16261 T→C** a nivel de la región control y por el sitio polimórfico +15665 *Alu I*. Autores como Richards y colaboradores (1998), señalan que la presencia de este haplogrupo en Europa, fue debida a un flujo migratorio desde el Medio Oriente coincidiendo con la expansión neolítica aproximadamente entre 12.500 y 6.000 años (Fernández *et al.*, 2000).

1.3.1.3 LINAJES MITOCONDRIALES EN ÁFRICA, OCEANÍA, AMÉRICA Y ASIA.

En la distribución de los haplogrupos en la población africana, existe un predominio del macrohaplogrupo L del cual se originan los principales haplogrupos L0, L1, L2, L3, L4 y L5 (Watson, 1997; Torroni *et al.*, 2001). De igual manera, una proporción importante de los haplogrupos M y N que derivan del haplogrupo L3, se encuentran presentes en este continente ocupando la región noreste de África.

Los estudios de la diversidad del mtDNA en América han revelado que todos los nativos del continente pertenecen a uno de los 4 haplogrupos de origen asiático: A, B, C o D (Torroni *et al.*, 1992) y más recientemente se ha determinado que un pequeño grupo de amerindios de Norteamérica pertenecen al haplogrupo X (Brown *et al.*, 1998; Reidla *et al.*, 2003). En Oceanía se puede observar un gran número de linajes de origen asiático, específicamente los haplogrupos B, F y E y del macrohaplogrupo N. Por otra parte, también están presentes 3 haplogrupos del superhaplogrupo M, determinados en el norte de las Islas Melanesia y que son específicos de este continente (Merriwether *et al.*, 2005). Por otra parte, en Asia, existe un predominio del haplogrupo M (Torroni *et al.*, 1994) y los que corresponden al macrohaplogrupo N, además de los haplogrupos H, I, J, T, N1, U, X y W (Yao *et al.*, 2002).



Copyright © 2005 J. D. McDonald

Fig. 3. Haplogrupos del mtDNA en el mundo

1.4.- APLICACIÓN DE LOS ESTUDIOS DE aDNA.

A partir de la década de los 80, con el reciente desarrollo de la biología molecular, se han realizado estudios muy significativos empleando diversos marcadores genéticos, que han permitido el análisis de DNA procedente de tejidos blandos momificados, dientes y huesos antiguos, tanto humanos como de animales ya extintos (Higuchi *et al.*, 1984; Horai *et al.*, 1991; Krings *et al.*, 1997; Pääbo *et al.*, 1998; Hagelberg *et al.*, 1998; Montiel, 2001; Willerslev y Cooper, 2005; Malgosa *et al.*, 2005; Solórzano, 2006).

El rango de antigüedad y las condiciones de conservación son elementos clave que hay que tener en cuenta a la hora de procesar restos antiguos; en tal sentido, Hagelberg y colaboradores (1991), apoyaron una estrecha relación entre la preservación externa y la eficacia de la amplificación de las muestras antiguas.

El aDNA como registro histórico no sólo permite el análisis bajo un prisma evolutivo, sino que contribuye también a clarificar aspectos del poblamiento de cada continente (Lalueza *et al.*, 2003) y conocer la composición genética de las poblaciones del pasado, para luego compararla con la del presente e inferir los procesos evolutivos que han tenido lugar a lo largo de la historia (Izagirre y De la Rúa, 2000), razón clara para constituir una herramienta utilizada en diversos campos científicos entre los que es posible destacar la biología evolutiva, la ecología, la antropología, la arqueología, la paleontología o la genética forense.

Los objetivos que se persiguen al analizar aDNA empleando como marcador genético el mtDNA en restos antiguos, se puede resumir en los siguientes aspectos:

- Contribuir a la reconstrucción de las poblaciones antiguas mediante su caracterización genética, ejemplo de ellos son los estudios de secuencias de DNA del hombre de Neandertal (Krings *et al.*, 2000; Ovchinnikov *et al.*, 2000; Cooper *et al.*, 2000; Goodwin *et al.*, 2000; Caramelli *et al.*, 2003; Green *et al.*, 2006; Lalueza-Fox *et al.*, 2005a, 2007; Lalueza-Fox, 2006; Green

et al., 2008; González, 2009), así como los estudios originales de Svante Pääbo (1985a, 1985b) donde lograron recuperar DNA de una momia egipcia, que se convirtió en uno de los trabajos más relevantes dentro del campo de aDNA ya que marcan el inicio de este nuevo campo de investigación.

- Caracterizar genéticamente las poblaciones antiguas (; Izagirre, 1998; Stone y Stoneking, 1998; Montiel, 2001; Maca-Meyer, 2002; Keyser-Tracqui *et al.*, 2006; Díaz *et al.*, 2004; Haak *et al.*, 2005; Fernández Domínguez, 2005; Ricaut *et al.*, 2005; Solórzano, 2006).
- Reconstruir el origen de las poblaciones humanas;
- Determinar el sexo de individuos con un diagnóstico morfológico incierto y analizar relaciones familiares de individuos eventualmente emparentados (tumbas dobles o triples).
- Aportar investigaciones en el campo de las ciencias forenses (Gill *et al.*, 1994; Jobling y Gill, 2004)
- Analizar el origen étnico y las migraciones (Torrioni *et al.*, 1996; Richards *et al.*, 2000; Ricaut *et al.*, 2004; Montiel *et al.*, 2005; Merriwether *et al.*, 2005; Solórzano, 2006).
- Aportar datos para el estudio Paleomicrobiológico, dedicado a la detección genética de organismos microbianos en restos antiguos ofreciendo una nueva aproximación al estudio de enfermedades infecciosas (Spigelmann y Lemma, 1993; Rafi *et al.*, 1994; Drancourt *et al.*, 1998; Kolman *et al.*, 1999; Montiel *et al.*, 2003; Solórzano *et al.*, 2004; Smerling, 2004; Guhl, 2005; Zink *et al.*, 2005; Malgosa *et al.*, 2005).
- Aportar información para los estudios zoológicos y la Paleontología: (Higuchi *et al.*, 1984; Cooper *et al.*, 1992; Cano *et al.*, 1993; Hagelberg *et*

al., 1994a; Austin *et al.*, 1997; Olson *et al.*, 2003; Lalueza-Fox *et al.*, 2005b, Ascunce *et al.*, 2007).

- Contribuir al estudio de la dieta alimenticia de organismos antiguos mediante el análisis de coprolitos o excrementos fosilizados (Kohn *et al.*, 1995; Poinar *et al.*, 1998, 2003).
- Identificación de flora (Golenberg *et al.*, 1990; Willerslev *et al.*, 2003).

1.5.- FUENTES PRINCIPALES PARA LA OBTENCIÓN DE aDNA.

Al trabajar con aDNA se seleccionan como fuentes principales, preferiblemente dientes y huesos (Iwamura *et al.*, 2004) ya que son las estructuras que mejor resisten los procesos tafonómicos, así como la bioerosión y la diagénesis, preservándose el material genético (Kurosaki *et al.*, 1993; Oota *et al.*, 1995; Montiel *et al.*, 2001) por el alto contenido de la hidroxiapatita, donde la molécula de DNA queda comprimida entre sus cristales (fosfato de calcio) confiriéndole estabilidad (Freifelder, 1982.). Sin embargo, la posibilidad de extraer DNA de huesos antiguos así como de los dientes, depende asimismo de factores ambientales tales como la temperatura y la humedad, a los cuales pudieron haber estado sometidos estas estructuras (Stoneking, 1997).

1.5.1 TEJIDO ÓSEO:

Compuesto por células propias del tejido y una matriz intercelular, que consta de dos fases:

- **Orgánica:** La matriz orgánica contiene colágeno tipo I en el 90% el cual se encuentra dispuesto en haces paralelos, mientras que el 10% restante está formado por mucopolisacáridos sulfatados y algunas glucoproteínas, otras proteínas y lípidos (Riancho y Gutierrez, 2003, Arnett, 2003).

- **Inorgánica:** Compuesta en el 80% por sales de calcio precipitadas, fundamentalmente bajo la forma de cristales de hidroxiapatita los cuales se hallan incrustados entre las fibras colágenas y el resto por fosfato de calcio en forma amorfa y sales de calcio (Arnett, 2003).

Los primeros datos de investigaciones basadas en el análisis de DNA proveniente de huesos antiguos, reportan la amplificación de fragmentos de un tamaño mayor a 233 pb en huesos de 6.000 años de antigüedad (Horai *et al.*, 1989) y mayor a 600 pb en huesos de 750 años (Hagelberg *et al.*, 1989).

En tal sentido, investigadores del Instituto Científico *Weizmann* encabezados por Salomón y colaboradores (2005), realizaron estudios sobre una nueva fuente de DNA antiguo preservado en huesos fósiles y trata sobre acumulaciones minerales localizadas en estas estructuras, confirmando que en los huesos, ciertas células consiguen fijar cristales de hidroxiapatita en una matriz de colágeno y parte del DNA queda enclavado en esa estructura.

1.5.2 TEJIDO DENTARIO.

Al igual que los huesos, los dientes se consideran un material útil dentro de la paleogenética, por ser las estructuras anatómicas más frecuentes y mejor conservadas del registro fósil. Representan un tejido fundamental para la extracción de DNA de restos antiguos, debido a su alto contenido de hidroxiapatita, compuesto que contribuye a la preservación del material genético, pues de acuerdo con Sambrook y colaboradores (1989), el DNA presenta una alta afinidad por este compuesto inorgánico (hidroxiapatita), lo que lo protegería de las enzimas y evitando, de esta manera, su degradación.

La corona del diente se halla recubierta por el esmalte, seguido de dentina, mientras que la raíz, lo está por el cemento (Fig. 4). El esmalte, como revestimiento histológico es considerado el tejido más duro del organismo. El 96-99% de este tejido lo conforman los cristales de hidroxiapatita cálcica carbonatada organizada en forma de prismas (Escaráte *et al.*, 2008), los cuales se encuentran ordenados y empaquetados por matriz orgánica (Durso y Abal,

2008), el cual representa entre un 4% y un 6% de su composición. En la literatura actual, los prismas están considerados como la unidad estructural básica del esmalte (Bhaskar, 1986; Guevara, 2000; Gómez de Ferraris *et al.*, 2002) y apenas entre un 4% y un 6% representa la matriz orgánica.



Fig. 4- Disposición histológica de las capas estructurales del diente, vistas a través de un preparado con técnica de desmineralización: **E:** Esmalte, **D:** dentina, **C:** cemento y **P:** Cavidad pulpar (Gonzalez, 1997).

En este tejido están presente los prismas adamantinos (Fig. 5), los cuales lo atraviesan desde la unión amelo-dentinaria hasta la superficie externa del diente (González, 1997).

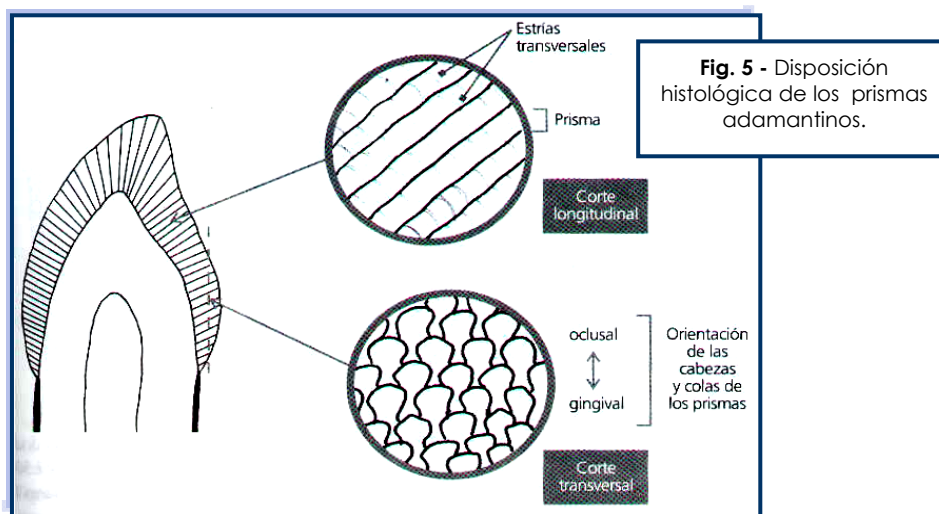


Fig. 5 - Disposición histológica de los prismas adamantinos.

La dentina, es el tejido mineralizado que ocupa el mayor volumen en la pieza dental y está formado aproximadamente por un 70% de matriz inorgánica (Boskey, 2007) y un 40% de matriz orgánica compuesta por colágeno.

Tanto el esmalte como la dentina presentan la misma base inorgánica (Gil- *et al.*, 2008) representada por los cristales de fosfato de calcio cristalino (hidroxiapatita). Estos cristales que representan el principal componente inorgánico tanto de huesos como de dientes (Ivanova *et al.*, 2001; Londoño *et al.*, 2006) varían de tamaño, así tenemos que los de la dentina suelen ser de un tamaño menor que los del esmalte y semejantes a los del tejido óseo. La durabilidad y resistencia de estos tejidos dependerá de la concentración de dichos cristales (Guevara, 2000), la cual es mayor en las piezas dentarias que en los huesos, lo que explicaría la mayor supervivencia del DNA en los dientes (DeGusta *et al.*, 1994).

Por otra parte, la absorción de DNA a nivel de los cristales de hidroxiapatita en los huesos y en los tejidos dentarios (Kemp y Smith, 2005), aunadas a las características anatomo-histológicas del diente y del hueso compacto, explicarían la razón por la cual la recuperación de DNA es mayor a partir de dientes y diáfisis de huesos largos (tejido óseo compacto) que a partir de tejido óseo esponjoso, donde la protección del DNA sería mucho menor; cabe resaltar que autores como Ubelaker (1978) enfatizan que su conservación suele ser mejor en los dientes que el tejido óseo a causa de la dureza que proporciona la dentina y el esmalte, aportando una capa protectora extraordinaria.

1.6 PROBLEMÁTICA ASOCIADA AL ANÁLISIS DE aDNA.

La problemática más frecuente que se presenta en este tipo de análisis viene dada fundamentalmente por el daño molecular, que se produce en el DNA derivado de la muerte celular, así como los fenómenos de contaminación y la inhibición. Otros factores que potencian el daño molecular en el aDNA, son los agentes oxidantes, las radiaciones, los ácidos húmicos y fúlvicos, la temperatura, la humedad, el pH (Hagelberg *et al.*, 1989) y las nucleasas, provocando determinados artefactos que pueden llevar a interpretaciones erróneas.

El daño que producen se puede resumir básicamente en dos tipos de problemas: fragmentación del DNA en segmentos muy cortos y cambios nucleotídicos en la secuencia (Hoss y Pääbo, 1993; Hofreiter *et al.*, 2000), lo que puede traer como consecuencia, una mayor dificultad en la recuperación del material e incluso en la autenticación de los resultados.

1.6.1 DEGRADACIÓN POST-MORTEM Y DAÑO MOLECULAR.

Existen dos mecanismos tras la muerte (Bär *et al.*, 1988) que afectan directamente al DNA como son la autólisis (autodigestión mediante enzimas liberadas por los lisosomas celulares, aumentando la actividad enzimática de las nucleasas) y la putrefacción (descomposición anaeróbica de proteínas). Dichos mecanismos ayudados por la humedad, conllevan la degradación del DNA. Perry y colaboradores (1988) demostraron con sus análisis que a mayor grado de humedad, existía el riesgo de una mayor degradación.

Autores como Lindahl y Nyberg (1972) y Hofreiter y colaboradores (2001), afirman que en el proceso de depurinización del DNA, tanto la humedad como la temperatura juegan un papel importante. Los procesos hidrolíticos constituyen pues uno de los mecanismos de descomposición (Rogan y Salvo, 1991), por lo que en ausencia de agua, los daños químicos del DNA se reducen (Pääbo y Wilson, 1991).

El impacto negativo de estos factores se incrementa con el tiempo y la temperatura. Una molécula de DNA hidratada se degrada en un periodo de 1.000 años a una temperatura moderada. Un descenso de 20°C ralentiza de 10 a 25 veces el periodo de degradación en las mismas condiciones (Höss *et al.*, 1996). De esta manera, la degradación química que sufre el DNA a lo largo del tiempo se fundamenta en procesos importantes tales como la hidrólisis y la oxidación, que destruyen el puente de unión de la base nitrogenada-azúcar (Bada *et al.*, 1999) que unen las diferentes desoxirribosas entre sí, provocando la fragmentación de las cadenas de DNA (Lindahl y Nyberg, 1972), y que conllevan a modificar la estructura nucleotídica (Handt *et al.*, 1994; Bouwman *et al.*, 2006).

El fenómeno conocido como *cross-linking* afecta también a la amplificación del DNA (Pääbo, 1989) y consiste en la aparición de uniones inespecíficas entre cadenas de DNA que pueden llegar a formar estructuras complejas por condensación de esas dobles cadenas.

1.6.2 PRESENCIA DE SUSTANCIAS INHIBIDORAS DE LA PCR.

Los inhibidores de la PCR son contaminantes orgánicos e inorgánicos que coprecipitan con el DNA durante la extracción y que inhiben parcial o completamente la PCR, ya que operan directamente sobre la acción de la *Taq* DNA polimerasa. Su presencia da como resultado falsos negativos (Pääbo *et al.*, 1988; Hochmeister *et al.*, 1991).

En las muestras de restos antiguos, es frecuente la presencia de estas sustancias que podrían ser subproductos de degradación orgánica (productos de la reacción *Maillard*, productos de degradación del propio DNA); ácidos húmicos y/o fúlvicos (provenientes del suelo) así como, residuos de porfirinas y taninos entre otros (Montiel *et al.*, 1997; Scholz *et al.*, 1998).

Otro factor apuntado por otros autores (Fernández Domínguez, 2005), es referente a la humedad del enterramiento, ya que favorece al proceso de degradación, acelerando los procesos hidrolíticos, aumentando de esta manera, la posibilidad de que los restos esqueléticos contengan sustancias inhibidoras de la PCR.

También la presencia de elevadas cantidades de DNA contaminante exógeno puede producir un efecto similar y afectar la eficacia de la PCR. Se trata del DNA procedente tanto del propio organismo como de microorganismos (bacterias, hongos, entre otros), que pueden causar reacciones competitivas durante la amplificación. Si el DNA exógeno contiene sitios complementarios a los cebadores de la reacción PCR, se generan productos de PCR no específicos o provocan que la reacción se inhiba totalmente dando como resultado un falso negativo.

La presencia de sustancias inhibitoras puede ser reconocida de dos maneras:

- Coloración marrón del extractos de DNA. Algunos autores (Pääbo, 1989; Habelberg *et al.*, 1991) lo relacionan con la formación de productos de la reducción de azúcares; no obstante, taninos y ácidos húmicos también proporcionan una coloración marrón (Fig 6), e inhibición de la PCR.



Fig. 6 Extracto posiblemente inhibitorio

- Por la presencia en los geles de agarosa de una fluorescencia azul emitida bajo la luz U.V. (Kolman y Turros, 2000).

Sin embargo, las sustancias inhibitoras pueden minimizarse mediante diferentes técnicas:

- Purificación del DNA.
- Incrementando la concentración de la Taq DNA polimerasa tomando en cuenta que un aumento exagerado puede conducir a errores en la amplificación (Higuchi *et al.*, 1999; Higuchi, 1992).
- Incorporación de albúmina bovina (BSA) la cual actúa sobre los inhibidores del tipo de las porfirinas (Pääbo, *et al.*, 1990) y favorece además, la actividad enzimática (Habelberg *et al.*, 1989; Hochmeister *et al.*, 1991).

- Diluciones seriadas de DNA si se tiene suficiente DNA molde ya que en caso contrario al diluir el inhibidor también se diluye el DNA, afectando en este caso la reacción de PCR por falta de molde (Francalacci, 1995).
- Almacenando los tubos a 4°C, lo que podría producir una precipitación de las sustancias inhibitorias y su unión a las paredes de polipropileno del tubo (Montiel *et al.*, 1997; Montiel, 2001).

1.6.3 CONTAMINACIÓN.

La posibilidad de contaminación de la muestra con DNA previamente extraído o amplificado o incluso del propio manipulador, hace necesario un exquisito cuidado en la manipulación de los especímenes, constituyendo el principal problema de la experimentación con aDNA humano (Handt *et al.*, 1994, 1996; Richards *et al.*, 1995; Stoneking, 1995, Montiel, 2001; Sampietro *et al.*, 2006). Esta contaminación, puede producirse fuera o dentro del laboratorio y provenir de distintas fuentes:

a. Antes de la deposición, si se han llevado a cabo ritos funerarios que incluyen el uso de sangre o heces y durante el proceso diagenético, en el caso de enterramientos múltiples (Brown *et al.*, 1992).

b.- Manejo inadecuado por parte de quien manipula los restos humanos en el momento de ser extraídos de los yacimientos o durante su estudio. Por ello es imprescindible el uso de guantes y mascarillas y evitar el contacto con el agua, ya que no sólo puede aumentar el riesgo de contaminación previa a su tratamiento molecular, sino que el riesgo de degradación es mayor (Izagirre *et al.*, 2005).

c.- Amplicones procedentes de reacciones de PCR anteriores, ya que de una sola reacción se originan infinidades de partículas en forma de aerosoles que pueden quedar dentro del ambiente de trabajo, produciéndose lo que se conoce como contaminación cruzada o *carry over*.

d.- Uso de reactivos y suministros de laboratorio contaminados durante su manipulación, envasado y distribución (Kemp *et al.*, 2005).

Existen métodos empleado por investigadores en el campo del aDNA, con los cuales se trata de eliminar cualquier contaminación. Entre ellos podemos citar:

- Lavado de la superficie externa de los huesos o dientes, con hipoclorito de sodio (Na₂Cl) en concentraciones apropiadas (Kemp *et al.*, 2005).
- Abrasión de la superficie externa de los huesos a fin eliminar posibles trazas de DNA exógeno proveniente de manipulaciones previas.
- Extracción de la muestra del interior del hueso (hueso compacto) o del diente (tejido dentinario que rodea el canal radicular).
- Irradiación con luz UV.

1.7 AUTENTICACIÓN DEL aDNA.

Trabajar con aDNA, requiere de la aplicación de una serie de directrices básicas que se engloban bajo el título "Criterios de Autenticidad", a fin de demostrar la autenticidad de los resultados. En el presente estudio se han seguido la mayoría de los procedimientos básicos, según la revisión de Pääbo y colaboradores (2004) y Montiel y col. (2007):

➤ **LABORATORIO, EQUIPAMIENTO E INSTRUMENTAL EXCLUSIVO PARA ADNA Y SEPARACIÓN DE LAS ÁREAS DE TRABAJO PRE-PCR Y POST-PCR.**

Para manipular DNA proveniente de restos antiguos es imprescindible un laboratorio adecuado para la extracción y preparación de reacciones de PCR, separado físicamente de los procesos Post-PCR, con el propósito de minimizar la posible contaminación con DNA exógeno. Por otra parte, este espacio debe contar con una unidad de presión de aire positiva y cabinas de flujo laminar sometidas de forma habitual a radiación con UV para su descontaminación. Asimismo, la limpieza con soluciones desinfectantes

como la lejía (hipoclorito de sodio), la utilización de material estéril y el uso de reactivos alicuotados, son precauciones rutinarias a seguir.

➤ **USO DE INDUMENTARIA ADECUADA.**

De forma rutinaria debe utilizarse una indumentaria apropiada como doble guante, bata, cofias, gorros, mascarillas faciales de un solo uso y lentes protectores.

➤ **CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DEL INVESTIGADOR.**

Al trabajar con aDNA se hace indispensable la identificación y secuenciación el DNA de los investigadores, ya que constituye la principal fuente de contaminación natural en el laboratorio.

➤ **ELIMINACIÓN DE LA CAPA SUPERFICIAL DE LA MUESTRA.**

Criterio que debe aplicarse con el fin de eliminar los restos de tierra y el DNA superficial.

➤ **PROCESAMIENTO DE BLANCOS EXTRACCIÓN Y DE AMPLIFICACIÓN.**

Todos los procedimientos deben ir acompañados de controles que contienen sólo los reactivos y ayudan a detectar una posible contaminación. La presencia de una banda de amplificación en los mismos indica la presencia de DNA contaminante durante el proceso experimental.

➤ **SENTIDO FILOGENÉTICO.**

Las secuencias obtenidas deben concordar con las descritas para el área geográfica a la cual corresponden las muestras, y a la misma especie.

➤ **REALIZACIÓN DE VARIAS EXTRACCIONES DE UN MISMO ESPECIMEN**

Esto se aplica para demostrar la reproducibilidad del espécimen.

➤ **REPLICACIÓN DE TODO EL PROCESO EXPERIMENTAL EN UN LABORATORIO INDEPENDIENTE.**

Con ello se pretende eliminar la posibilidad de contaminación procedente del propio laboratorio no detectada en los blancos. .

➤ **CLONACIÓN BACTERIANA DE LOS PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE MÚLTIPLES CLONES.**

Esta técnica permite valorar la homogeneidad o heterogeneidad de las secuencias de cada producto de PCR y evaluar la presencia de contaminaciones, modificaciones moleculares o errores de la polimerasa, que pueden pasar inadvertidas, sobre todo cuando la reacción de PCR se realiza a partir de muy pocas moléculas de DNA originales. Estos errores tendrán una especial significación cuando el DNA molde se encuentre dañado molecularmente (Hofreiter *et al.* 2001a, 2001b)

➤ **DETERMINACIÓN DE VARIABILIDAD MITOCONDRIAL ENTRE LAS MUESTRAS DE UN MISMO GRUPO O SET DE EXTRACCIÓN.**

La existencia de más de un tipo mitocondrial disipa la posibilidad de contaminación, contribuyendo con la autenticidad de los resultados.

➤ **CORRESPONDENCIA ENTRE DISTINTOS MARCADORES.**

La relación natural entre los polimorfismos de la región de control y la región codificante del mtDNA pueden constituir un criterio de autenticación.

1.8 CARACTERIZACIÓN ARQUEOLÓGICA DE LAS NECRÓPOLIS ESTUDIADAS.

En la presente investigación, han sido analizados los restos humanos de tres Necrópolis situadas en la Bahía de Alcúdia al noreste de la Isla de Mallorca en el archipiélago Balear (Fig. 7), donde se encuentran importantes yacimientos prehistóricos de diferentes estadios culturales: **Son Real** (Font, 1974) y **S'Illot des**

Porros (Malgosa, 1992) ambas series circunscritas en el contexto Talayótico, y la Necrópolis Tardorromana-Alto medieval de **Can Reiners** (Ortega, 2005).

El estudio de los restos humanos de estas tres necrópolis, ha permitido conocer de manera cronológica, la evolución de la población antigua que ocupaba esta región de la Isla a lo largo de 1000 años, desde época talayótica (siglo VI a.C) (Fig. 7) hasta la Edad Media y con ello, reconstruir la base genética de sus antepasados.

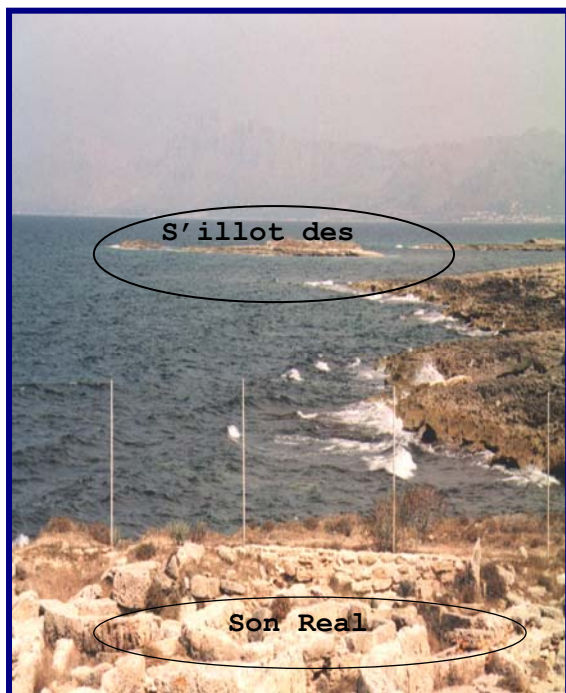


Fig. 7 - Poblaciones antiguas estudiadas en la presente Tesis.

1.8.1 ÉPOCA TALAYÓTICA.

En el periodo cronológico que nos ocupa, se desarrolló una importante cultura dentro del contexto de la prehistoria Balear, concretamente en las islas de Mallorca y Menorca, denominadas por los griegos Islas Gimnasia, las cuales fueron influenciadas por las civilizaciones mediterráneas orientales, dando origen a uno de los períodos más importantes de su historia, la cultura Talayótica.

Esta cultura correspondiente aproximadamente a la edad de Hierro (finales del segundo milenio a.C hasta prácticamente la ocupación romana), debe su nombre a los *Talayots*, unas construcciones emblemáticas y abundantes de la prehistoria balear.



Las Necrópolis de S'illot des Porros y Son Real (Fig. 8) consideradas únicas en el contexto pre- y protohistórico balear, se encuentran muy próximas una de la otra. Están situadas en la Bahía de Alcúdia en el término Municipal de Santa Margarida en la parte septentrional de la Bahía de Alcudia, en el noreste de la Isla de Mallorca la más grande de las Islas que conforman el archipiélago Balear en el Este del Mar Mediterráneo.

Fig. 8 - Necrópolis Talayóticas.

Los estudios arqueológicos indican que la cultura Talayótica basó su economía en los cultivos de cereales, la recolección de recursos marinos, la ganadería, y la agricultura (Malgosa, 1992; Alesán *et al.*, 1999); esto último demostrado por los restos de hoces de sílex hallados en los yacimientos más antiguos.

Dentro de este contexto, la similitud y la cercanía de ambas necrópolis nos lleva a preguntarnos si todo el conjunto representa un complejo funerario, ó si una de ellas, pudo haber servido para los enterramientos de individuos pertenecientes a la alta jerarquía dentro del mundo talayótico mallorquín. Por su valor arqueológico se describan brevemente:

1.8.1.1 NECRÓPOLIS DE SON REAL (SR) .

Necrópolis conocida como “el cementerio de los fenicios” (Font, 1974) o también como “Punta de los Fenicios” (Hernández *et al.*, 1998). Se trata de una necrópolis perteneciente al periodo talayótico avanzado, que cronológicamente corresponde a los siglos VI a II a.C. Se caracteriza por presentar diferentes estructuras arquitectónicas funerarias (Guerrero *et al.*, 2006).

La excavación se inició en el año 1957, bajo la dirección de Miguel Tarradell y Daniel Woods, encontrándose los restos de 165 individuos en posición encogida. Reviste gran interés sus construcciones funerarias (Font, 1974): en este yacimiento se han encontrado distintos tipos de sepulturas (Tarradell y Woods, 1959), clasificadas según la construcción y el uso funerario en 6 tipos, siendo la más frecuente por su carácter familiar o individual, la sepultura tipo 1 de planta rectangular con cabecera redondeada (Fig. 9), llamada también micronaveta (Pericot *et al.*, 1975).



Fig. 9 - Necrópolis de Son Real: Tumba en forma de micronaveta.

Lo mismo sucede con otras sepulturas circulares y rectangulares, excepto la del tipo 6, tumba de forma rectangular y de menor calidad, construida sobre arena donde el ritual funerario, la incineración, era practicado hacia el último período de utilización de la necrópolis. La mayor parte de las construcciones corresponden a enterramientos múltiples (Font, 1974).

Debido a los cambios de rituales de enterramiento, se cree que en un principio era un cementerio exclusivo para clases dominantes por los tipos de monumentos encontrados, pero que evolucionó poco a poco hacia una cierta masificación (Font, 1974). Los estudios morfológicos realizados por Font en 1974, refieren una tipología mediterránea, aunque también indican una posible relación de Mallorca con poblaciones del Mediterráneo Oriental.

1.8.1.2 NECRÓPOLIS DE S'ILLOT DES PORROS (IP).

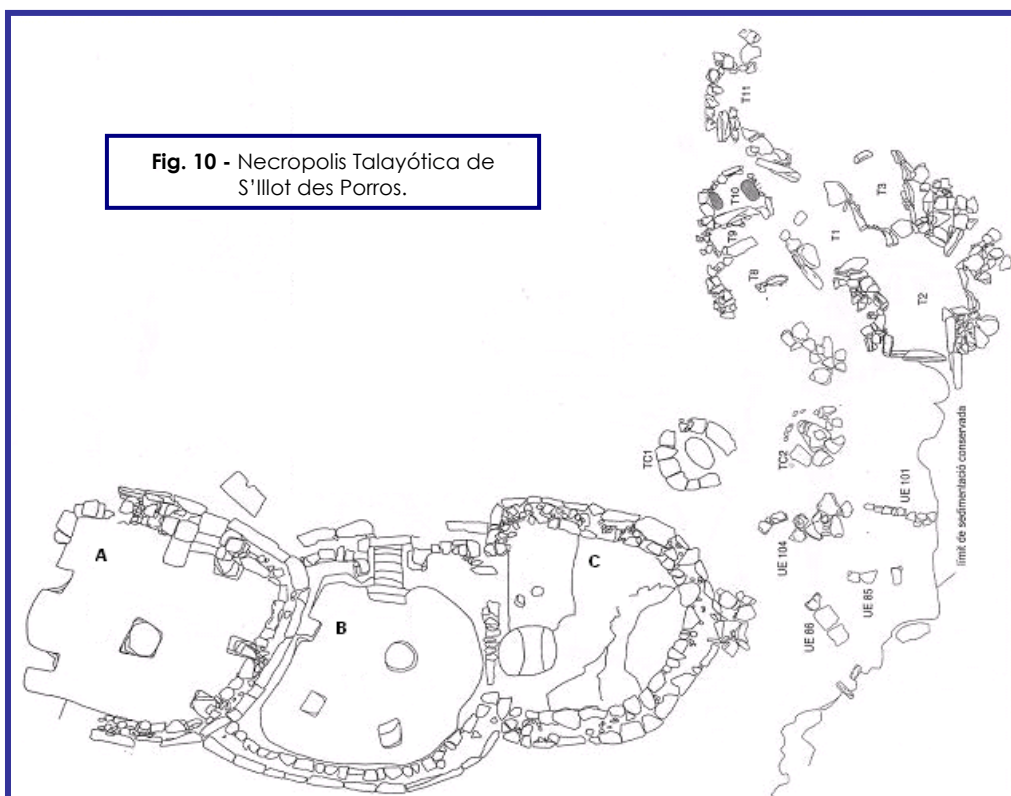
Este cementerio prehistórico, perteneciente a la cultura Talayótica avanzada y que data entre los s. VI-II a.C., de la Edad de Hierro (Malgosa, 1985; 1992), se encuentra ubicado en un pequeño islote plano de forma elipsoidal, situado a unos 70 m aproximadamente de la línea de la costa guardando una estrecha relación con la gran necrópolis de Son Real (Tarradell, 1964).

Los trabajos de excavación de esta necrópolis se iniciaron bajo la dirección del Dr. Miquel Tarradell desde el año 1959, hasta 1969, volviéndose a excavar entre los años 1996-1998. Este yacimiento consta de aproximadamente 285 individuos (Malgosa, 1985, 1992; Alesán, 1990).

Se trata de tres grandes sepulcros colectivos (Tarradell, 1964; Hernández *et al.*, 1998), descritos por Tarradell como círculos A, B y C (Fig. 10), siendo este último círculo el lugar donde fueron inhumados la mayoría de los individuos. La zona oeste del islote estaba ocupada por enterramientos individuales realizados directamente en el suelo o con pequeñas construcciones. Esta zona de enterramientos exteriores, pero cercanos a los tres círculos, sugiere que fue usada por un grupo social de estatus inferior, teniendo en cuenta la escasa riqueza de los materiales encontrados (Hernández *et al.*, 1998).

Se puede diferenciar dos periodos en esta necrópolis, caracterizados por tener distintos ritos funerarios (Tarradell, 1964):

- La Inhumación, en la que los cuerpos eran depositados sobre la tierra.
- La Incineración, practicada en dos grandes cámaras excavadas directamente sobre la roca.



Los restos recuperados en esta necrópolis han sido estudiados morfológica y químicamente y han sido sometidos a distintos estudios a nivel descriptivo (Castellana *et al.*, 1988, 1992), comparativo (Carrasco y Malgosa, 1990a; Malgosa, 1988, 1992), de crecimiento (Alesán y Malgosa, 1996), paleodietético (Castellana *et al.*, 1989; Subirá *et al.*, 1989; Subirá y Malgosa, 1990; 1991; 1992a; 1992b), demográfico (Alesán *et al.*, 1999), patológico (Malgosa y Campillo 1991; Subirá *et al.*, 1992) e incluso molecular, aunque de forma preliminar (Montiel y Malgosa, 2003).

Los datos comparativos indican una elevada relación con las poblaciones del norte de África y de las poblaciones del norte peninsular, aunque destaca la posibilidad de la relación con otros pueblos del este mediterráneo. Recientes análisis craneométricos y de morfología dental muestran una estrecha relación de las dos Necrópolis de Son Real y S'Illot des Porros con las poblaciones del litoral peninsular catalán (Jordana, 2007).

Los restos humanos hallados en este islote estuvieron por más de 2000 años bajo condiciones negativas para su conservación, como por ejemplo, una extrema humedad, contribuyendo al deterioro de la estructura biológica y aumentando la velocidad de degradación del DNA.

A pesar de esto, se ha logrado recuperar material genético que ha permitido caracterizar algunos individuos, hecho que se refleja en los estudios moleculares preliminares realizados por Montiel y colaboradores (2001); Díaz y colaboradores (2002) y Montiel y Malgosa (2003).

1.8.2 ÉPOCA TARDORROMANA ALTO-MEDIEVAL.

Período histórico que sigue a la caída del Imperio Romano en Occidente, con fuertes contrastes sociales, políticos y culturales. Entre los hechos que destacan durante este período, está el surgimiento de tres grandes imperios: El Imperio Bizantino, el Islámico y el Carolingio. Con este último imperio, floreció el Sacro Imperio Romano Germánico, como dominio religioso en un estado independiente en el centro de Italia (Ruiz de la Peña, 1984).

Entre los siglos I y III de nuestra era, surge la crisis del Bajo Imperio, que trajo como consecuencia el declive de numerosos pueblos de la franja litoral mediterránea. Con esto, las crecientes luchas sociales y la crisis económica a partir del siglo III, promueven positivamente la invasión bárbara en el siglo V (Orfila, 2000).

Cuando los pueblos germanos comenzaron a avanzar hacia el interior de Europa al comienzo de la Era Cristiana, se inicia un proceso de ruralización y desurbanización, como consecuencia directa de la crisis en la antigüedad tardía entre los siglos VI y VII D. C, caracterizada por la expansión de áreas de cultivos que reemplazaban las urbes en transición hacia el modelo socio-económico alto-medieval (Ortega, 2005).

1.8.2.1 NECRÓPOLIS DE CAN REINERS (CR) .

Uno de los ejemplos del declive de Roma en la Isla de Mallorca lo representa la ciudad de Pollentia que se fundó en el 123 a.C., después de la conquista romana de la isla por parte del cónsul, *Quintus Caecilius Metellus*, jefe de la expedición romana que dominó la isla. Los hallazgos arqueológicos han permitido aclarar la polémica sobre su localización y han permitido identificarla con la actual Alcudia (Orfila *et al.*, 1999).

La Necrópolis Tardorromana-Alto medieval de Can Reiners (Fig.11), excavada en el término municipal de Alcudia, en Mallorca, constituye uno de los yacimientos arqueológicos y uno de los fenómenos urbanos más importantes de la isla de Mallorca (Cau M. y Chávez ME, 2003). Esta necrópolis fue descubierta en el primer nivel identificado en las excavaciones del Foro de la Ciudad Romana de Pollentia (Ortega, 2005),



Fig. 11- Necrópolis Alto-medieval de Can Reiners.

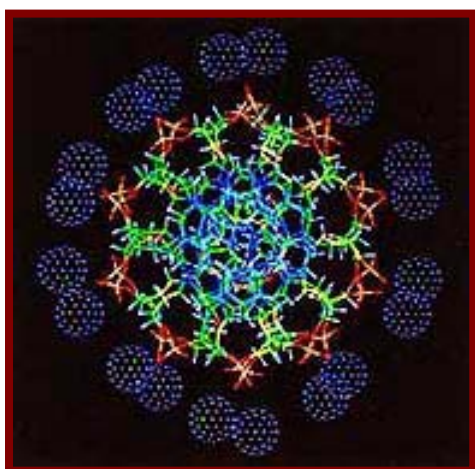
Se trata de una pequeña elevación de 14 metros sobre el nivel del mar, en el istmo que separa las Bahías de Alcúdia y Pollença, ubicada estratégicamente con fines de vigilancia marítima. Su construcción data del siglo I d.C. El Foro fue destruido y abandonado durante el III siglo d.C., (Fig.12). Años después, aproximadamente cerca del 600 d.C., su superficie fue reutilizada como necrópolis (Orfila *et al.*, 1999; Orfila, 2000).

A pesar de ser una serie poblacional sometida a condiciones duras de vida propias de los cambios acontecidos durante la antigüedad tardía, se trataba de una población sana (García y Súbira, 2001).



Fig. 12 Teatro de Pollentia

Los trabajos de excavación de más de 200 tumbas comenzaron en el año 1980. Un total de 138 inhumaciones se encuentran en el laboratorio de Antropología de la Universidad Autónoma de Barcelona, constituyendo uno de los mayores conjuntos antropológicos encontrados en la isla de Mallorca junto a las necrópolis de Son Real y S'illot des Porros.



2. OBJETIVOS.

2.- OBJETIVOS.

2.1 OBJETIVO GENERAL.

En la presente tesis se pretende analizar la evolución genética de la población antigua de Mallorca a lo largo de 1000 años, desde el período Talayótico avanzado hasta la época Tardoromana-Altomedieval con el fin de conocer el origen de la población de Mallorca, aportar luz sobre el origen de la cultura talayótica, e interpretar los procesos evolutivos que afectaron el poblamiento de la isla de Mallorca en la antigüedad.

Este objetivo general se divide en objetivos específicos de tipo metodológico y filogenético.

2.1.1 OBJETIVOS METODOLÓGICOS.

A fin de mejorar la eficacia y eficiencia de los procedimientos de laboratorio, se han propuesto tres objetivos metodológicos principales tratando de recuperar información del mayor número de muestras posibles de estas poblaciones y así alcanzar una mayor representatividad:

- Dado que la etapa crítica en el análisis de aDNA es la obtención del DNA, el **primer objetivo** metodológico consiste en optimizar el diseño experimental para la de extracción de DNA a partir de restos antiguos procedentes de individuos de las series antiguas mallorquinas, teniendo en cuenta las características específicas de conservación.
- Las series analizadas permanecieron durante siglos enterradas en la misma línea de costa y fueron excavadas hace más de 30 años. Siendo que las condiciones de conservación no fueron las óptimas para la conservación del DNA, el **segundo objetivo** metodológico se dirige a adecuar un protocolo de purificación para muestras que presentan un alto grado de inhibición, con el fin de recuperar la mayor cantidad de información del DNA original.

- El problema fundamental de los extractos de aDNA es el de su autenticidad, por lo que el **tercer objetivo** metodológico se dirige a demostrar la autenticidad de los resultados aplicando todos los criterios establecidos posibles sobre los distintos conjuntos muestrales.

2.1.1 OBJETIVOS FILOGENÉTICOS Y POBLACIONALES .

- La prehistoria y la historia antigua de Mallorca se conocen básicamente a partir de pequeños yacimientos arqueológicos con un reducido número de enterramientos y únicamente se conocen tres grandes conjuntos funerarios. El **primer objetivo** filogenético pretende analizar y caracterizar genéticamente las tres series más numerosas y por tanto representativas de la antigüedad de Mallorca - Son Real, S'Illot des Porros y Can Reiners - y con ello conocer la estructura genética de cada grupo.
- Las poblaciones del Norte de la isla de Mallorca durante la época talayótica están representadas por las series de Son Real y S'Illot des Porros. Ambas necrópolis son contemporáneas (VI-II a.C.) y se encuentran situadas una frente a otra, separadas por unas pocas decenas de metros de mar. Los estudios arqueológicos indican una continuidad entre ellas, mientras que los estudios antropológicos hipotetizan una diferenciación poblacional representada por la inhumación de una población de élite en S'Illot des Porros. Por lo tanto, **el segundo objetivo** poblacional planteado, se refiere a conocer si ambas series proceden de una única población y pueden responder o no a una estratificación social.
- Entre las dos series talayóticas y la población altomedieval de Can Reiners hay más de 600 años, período durante el cual la isla de Mallorca sufre grandes transformaciones marcadas principalmente por la conquista romana. Por ello, el **tercer objetivo** poblacional se dirige a establecer la eventual continuidad genética entre la población prehistórica de Mallorca, creadores de la cultura autóctona talayótica, y la población tardorromana, con sus múltiples influencias culturales y poblacionales, y

por tanto contribuir al esclarecimiento de la dinámica de la población mallorquina.

- Los estudios sobre la cultura talayótica indican una afinidad arquitectónica, cultural y antropológica con otras culturas del este mediterráneo y del norte de África. También hay que tener en cuenta que se pueden establecer fuertes paralelismos entre la cultura talayótica con otras del arco e islas del mediterráneo. Así pues, el **cuarto objetivo** se dirige a analizar la relación entre la población talayótica de Mallorca con las poblaciones mediterráneas situando filogenéticamente las series antiguas estudiadas dentro del contexto del arco mediterráneo y de una forma especial analizar la importancia de la contribución genética vs. la expansión cultural.



3. MUESTRAS Y METODOLOGÍA.

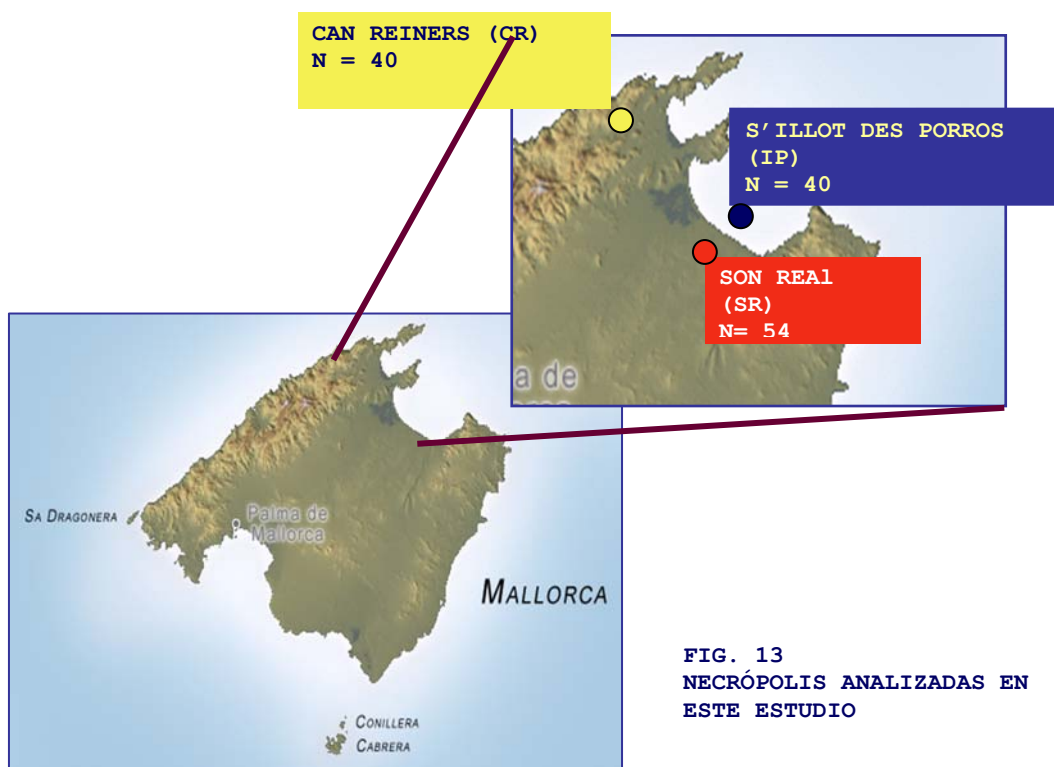
3. MUESTRAS Y METODOLOGÍA.

3. 1 MUESTRAS ANALIZADAS.

En la presente investigación, han sido analizados los restos humanos de tres Necrópolis (Fig. 13):

- 54 individuos de Son Real
 - 40 de S'Illot des Porros
- } CONTEXTO TALAYÓTICO
- 40 de la Necrópolis de Can Reiners
- } CONTEXTO TARDORROMANO-ALTO MEDIEVAL

Estos especímenes fueron seleccionados, siguiendo criterios estrictos para evitar cualquier problema de contaminación dado que el objetivo era analizar DNA antiguo.



En este estudio, la muestra estuvo conformada por dientes y huesos y fueron seleccionados de acuerdo a los siguientes criterios:

3.1.1 MUESTRA DENTARIA

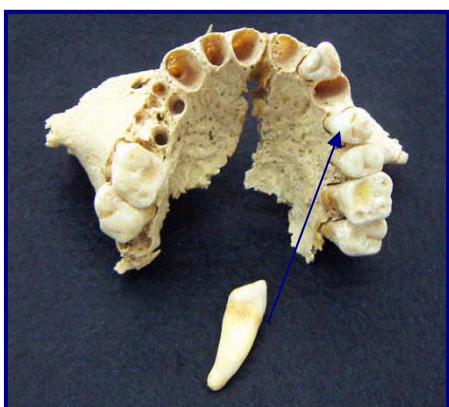
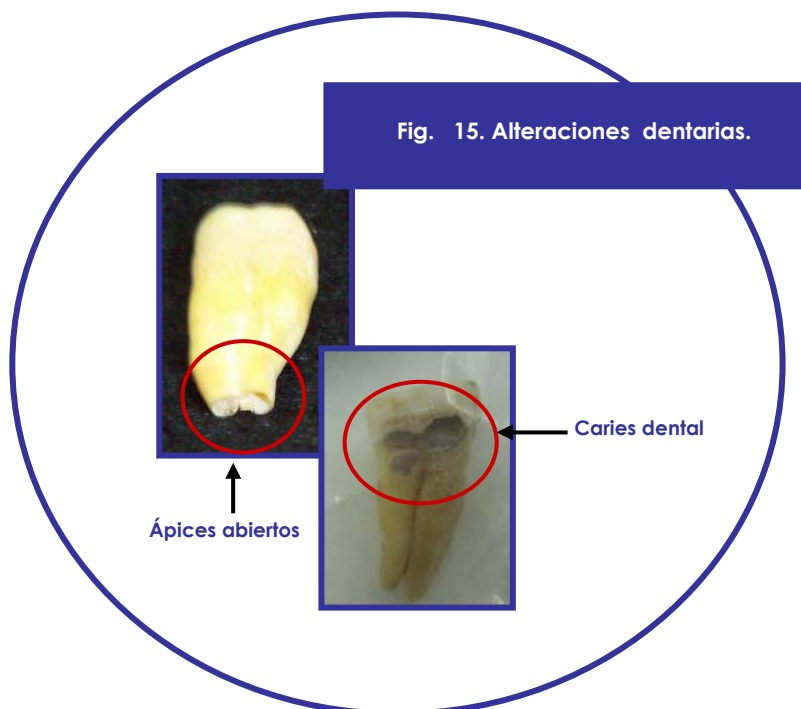


Fig. 14 - Canino extraído de un maxilar superior.

Para la extracción del DNA, fueron seleccionados especímenes que presentaban condiciones morfológicas óptimas (Fig. 14) y en los que no estuviese comprometida la integridad de la cámara pulpar (fracturas, ápices abiertos, presencia de alguna patología infecciosa, como por ejemplo una caries) (Fig. 15).

Este aspecto es de suma importancia, ya que cualquier alteración constituye un factor de riesgo de contaminación y/o de aumento en el deterioro del DNA (Grimoud *et al.*, 2004), pudiendo representar la puerta de entrada a una infección en restos esqueléticos, produciéndose una mayor degradación del material genético.



Por otra parte el DNA de los microorganismos, puede actuar como inhibidor de las reacciones de amplificación de las muestras en estudio (Izagirre, 1998). Además, si los restos fueron lavados previamente, pudo haber sido introducida contaminación con DNA moderno.

3.1.2 MUESTRA ÓSEA.

Para la extracción de DNA a partir de muestras óseas no patológicas, cualquier hueso puede ser utilizado, pero en nuestro caso, fueron seleccionados huesos largos (Fig. 16), por las siguientes razones:

1. Su anatomía permite una manipulación más aséptica.
2. Por su fácil abordaje al canal medular para extraer la muestra del tejido más interno..

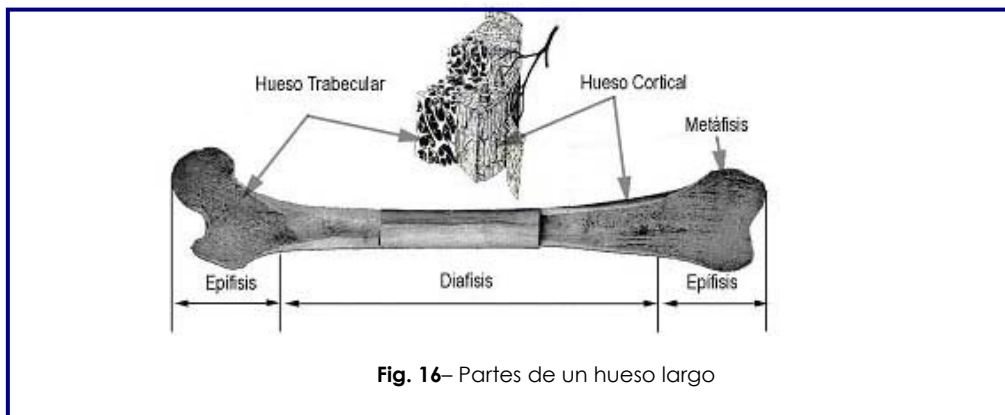


Fig. 16- Partes de un hueso largo

3.2 METODOLOGÍA:

3.2.1 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.

Los procesos de obtención y análisis de DNA se realizaron bajo el PROTOCOLO del laboratorio de aDNA de la UAB (Malgosa, 2005), el cual ha sido modificado de manera progresiva con el fin de minimizar aún más los riesgos de contaminación (principal problema al realizar análisis paleogenéticos) e incrementar la calidad del material genético recuperado.

Las extracciones se realizaron en grupos de 4 ó 5 muestras óseas o dentarias o ambas si fuese el caso, añadiendo en cada proceso, un control negativo o

blanco de extracción (KE), que contiene sólo los reactivos para el control de la contaminación.

En lo que respecta a la extracción de DNA y preparación de reacciones de amplificación (ambos considerados procesos pre-PCR), se llevaron a cabo en un laboratorio exclusivo para DNA antiguo, acondicionado con el equipo necesario para realizar tales procedimientos: Una unidad de presión positiva, cabina de flujo laminar con filtro HEPA, centrifuga refrigerada, mini centrífuga, *vórtex*, estufa, micromotor de baja velocidad con pieza de mano recta, agitador magnético y un frigorífico/congelador. Esto permitió la separación física completa de los procesos pre-PCR y post-PCR, este último destinado a la tipificación de las muestras amplificadas.

La parte experimental de este estudio fue realizada en distintos laboratorios de la Unidad de Antropología de la Universidad Autónoma de Barcelona. Los primeros análisis se realizaron en el laboratorio 1 (pre y postPCR); posteriormente el trabajo se continuó en otros espacios destinados para tal fin, denominado de aquí en adelante, laboratorio 2 (pre y post-PCR), comportando una renovación completa de infraestructura y reactivos, permitiendo realizar algunas replicas como parte de los criterios de autenticidad aplicados.

Por otra parte, para cada proceso se contó con puntas estériles con filtros que evitan la fuga de aerosoles, micro pipetas de distintas graduaciones que después de cada procedimiento se esterilizaban de manera rutinaria con etanol al 70% y exposición a radiación ultravioleta (UV-254 nm). Así mismo, dentro de la cabina de flujo laminar fueron preparadas las pipetas *Pasteur* de cristal, a las cuales se les colocó algodón previamente esterilizado en su extremo superior, para luego ser introducidas en un frasco estéril para ser autoclavadas.

En el presente estudio, se empleó un instrumental odontológico especializado, (Fig. 17), conformado por:

- Fórceps recto N° 150 ó 151 (Aesculap®),
- Pinza algodонера (Aesculap®).

- Fresas tallo largo para pieza de mano con recubrimiento de diamante grano fino, de forma troncocónica (PM720F(KG Sorensen®), cilíndricas (PM720F KG Sorensen®) o redonda nº (está última empleada para la extracción de muestra ósea).
- Disco con borde diamantado doble cara de 7/8'' diámetro montado en mandril N° KG-7020 (KG Sorensen®).

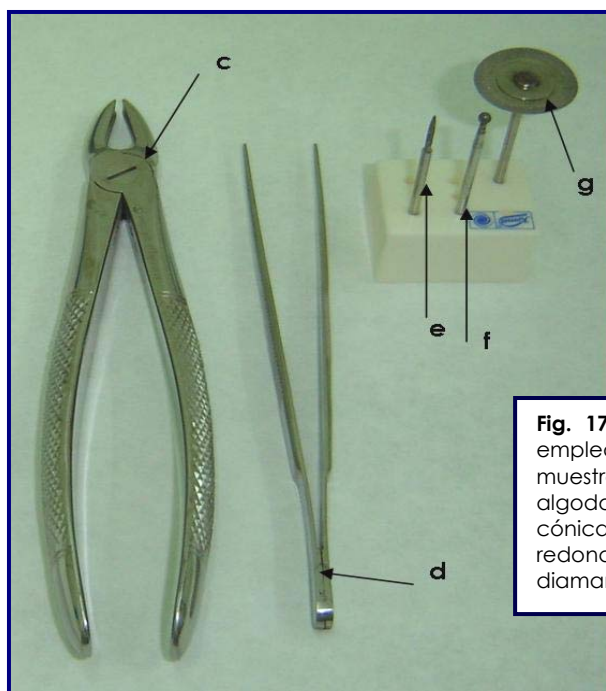


Fig. 17 - Instrumental odontológico empleado para la obtención de la muestra: c) Fórceps, d) pinza algodонера, e) fresa de diamante cónica, f) fresa de diamante redonda y g) disco de borde diamantado.

La incorporación de dicho instrumental ha contribuido a mejorar la técnica a la hora de obtener la muestra dentaria ya que facilitan la manipulación de los dientes con el menor contacto por parte del operador. Por otra parte, las fresas de diamante en cualquiera de sus formas (redonda, cilíndrica, cónica o troncocónica, entre otras) proporcionan un mejor corte del tejido dentario sin provocar el calentamiento del mismo (Sharon *et al.*, 1998) ya que si esto llegase a suceder, se puede producir una degradación mayor del DNA.

El instrumental odontológico junto a las gradillas metálicas, las cucharillas que se utilizan para pesar los reactivos y los recipientes de vidrio para cada reactivo,

fueron sometidos continuamente a un proceso de esterilización de la siguiente manera:

- Lavado con agua y detergente libre de iones, seguido de hipoclorito de sodio al 25%, aclarado con agua des-ionizada, para introducirlos posteriormente a la cabina de flujo laminar para su secado e irradiación con luz ultravioleta durante 30 minutos.
- Pasado este tiempo, el instrumental odontológico (fig. 17), se distribuía en equipos de extracción para cada diente tratado, era colocado en bolsas de esterilización (Medicon®) especiales para autoclave. El resto del instrumental, se envolvía con papel de aluminio previamente esterilizado.

En cuanto a los reactivos, fueron preparados dentro de la cabina de flujo laminar, empleando para ello un agitador electromagnético, pipetas y puntas de 5ml y de 10 µl, recipientes de vidrio previamente esterilizados y agua des-ionizada (Milli-Q) y auto-clavada. Una vez preparados los reactivos, aquellos que lo permitían, como el Tris/HCL y el EDTA, fueron sometidos a los procesos de esterilización por autoclavado. Los reactivos fueron alicuotados y almacenados siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Durante todo el proceso, se utilizaron guantes, bata y mascarilla.

Después de cada proceso, la cabina de flujo laminar se sometió a una estricta limpieza y esterilización con agua jabonosa (agua desionizada y detergente libre de iones), hipoclorito de sodio, aclarado con agua des-ionizada y etanol al 70%. Posteriormente, se introducía en la cabina, el material requerido para el siguiente proceso y se irradiaba con luz ultravioleta.

Con el fin de eliminar trazas de DNA y RNA del instrumental así como de las superficies de trabajo, cada cierto tiempo, se aplicaba un lavado con Termi-DNA-Tor (Biotools®). Este procedimiento no se realizaba de forma rutinaria, debido a que se corría el riesgo de modificar el DNA de las muestras.

3.2.2 OBTENCIÓN DE LA MUESTRA.

3.2.2.1 LAVADO Y ESTERILIZACIÓN DE LA SUPERFICIE EXTERNA DE DIENTES Y HUESOS.

Antes de obtener la muestra, tanto los dientes como los huesos se sometieron a un estricto proceso de lavado y esterilización de la superficie externa con el fin de eliminar los restos de tierra y el DNA superficial. Este proceso se realizaba el mismo día de la obtención de la muestra.

Las muestras dentarias se sumergieron en un tubo de polipropileno estéril de 50 ml y se les añadía solución de hipoclorito de sodio, dejándolo actuar entre 5 y 10 minutos, agitando varias veces. Luego, se decantó la solución y se irradiaron con luz ultravioleta durante 10 minutos, por cada una de las caras del diente, empleando la misma tapa del tubo como soporte (Fig. 18).

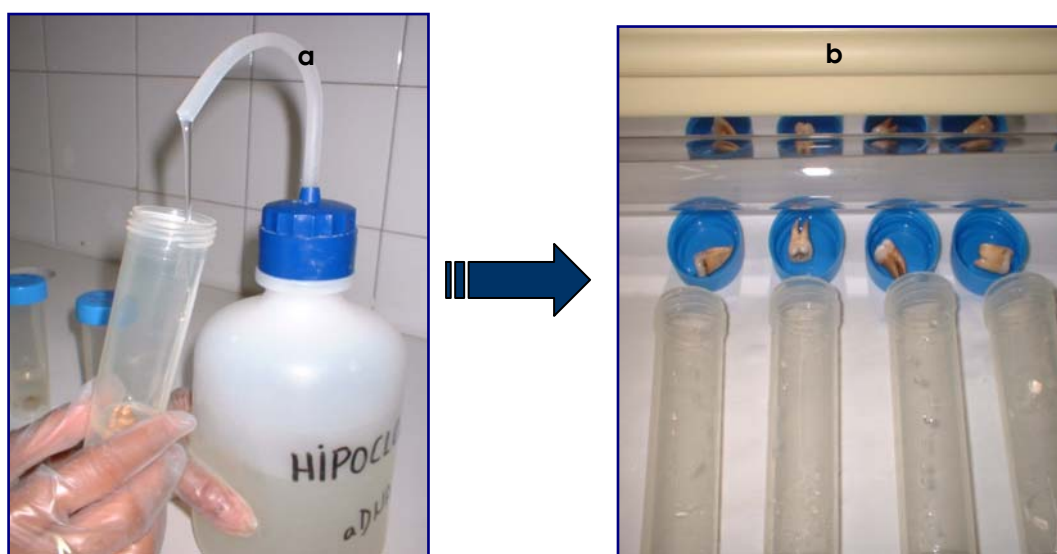


Fig. 18- Esterilización de la superficie externa de los dientes: a) lavado con hipoclorito de sodio, b) exposición al UV.

Cada diente esterilizado era trasladado a la cabina de flujo laminar empleando el mismo tubo como medio de transporte, evitando de esta manera, el menor contacto con el ambiente del laboratorio (fig. 19). Se utilizaron tubos con faldón en la base, como se muestra en la figura 19.

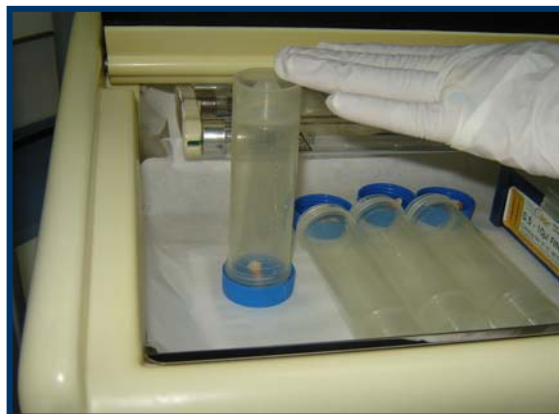


Fig 19. Traslado del diente esterilizado a la cabina de flujo laminar.

En el caso de muestras óseas, se procedió a limpiar la superficie externa de la zona del hueso seleccionada para la toma de la muestra con ayuda de un cepillo de cerdas de grosor mediano y con hipoclorito de sodio a fin de eliminar los restos de tierra y el DNA superficial. A continuación se llevó a la cabina de flujo laminar, para irradiarlo con UV por espacio de 5 minutos y secarlo durante 30 minutos para finalmente ser envuelto en papel de aluminio. Una vez realizado el lavado, y si no se extraía la muestra inmediatamente, se guardaba a -20°C o se dejaba secar a temperatura ambiente para evitar la proliferación de microorganismos.

Previo a la obtención de la muestra de polvo dentario u óseo, se preparaba dentro de la campana de flujo laminar, el tampón de extracción de la siguiente manera: En un tubo con faldón de 50 ml, se mezclaba:

REACTIVOS	50 ml	Para una muestra 5 ml
Tris HCl 1M, pH 8'0-8'5 (estabilizador de pH)	2.5 ml	0.25 ml
SDS al 10 % (detergente aniónico que disuelve los compuestos lipídicos orgánicos).	2.5 ml	0.25 ml
H₂O (MillQ Autoclavada)	2.5 ml	0.25 ml
EDTA 0.5 M, pH 8 con NaOH concentrado -agregado por decantación-(Reactivo quelante iónico que descalcifica el tejido)	42.5ml	4.25 ml
Volumen total del tampón de extracción	50.0 ml	5 ml

Una vez preparado el **tampón de extracción**, se colocaba dentro de la caja de UV para su esterilización.

3.2.2.2 OBTENCIÓN DEL POLVO DENTARIO Y ÓSEO:

3.2.2.2.1 POLVO DENTARIO.

Colocando los bocados del fórceps sobre la región cervical del diente, se procedió a cortarlo con un disco de borde diamantado a nivel de la línea amelocementaria, tratando de separar la corona de la raíz. Visualizando la entrada al conducto radicular y a la cámara pulpar, se procedió a limpiar las paredes del mismo con una fresa tronco cónica de diamante PM720F KG Sorensen®] (fig. 20). Se recolectaron alrededor de 0.05 g del polvo dentario que se iba desprendiendo directamente en un tubo de polipropileno de 15ml.

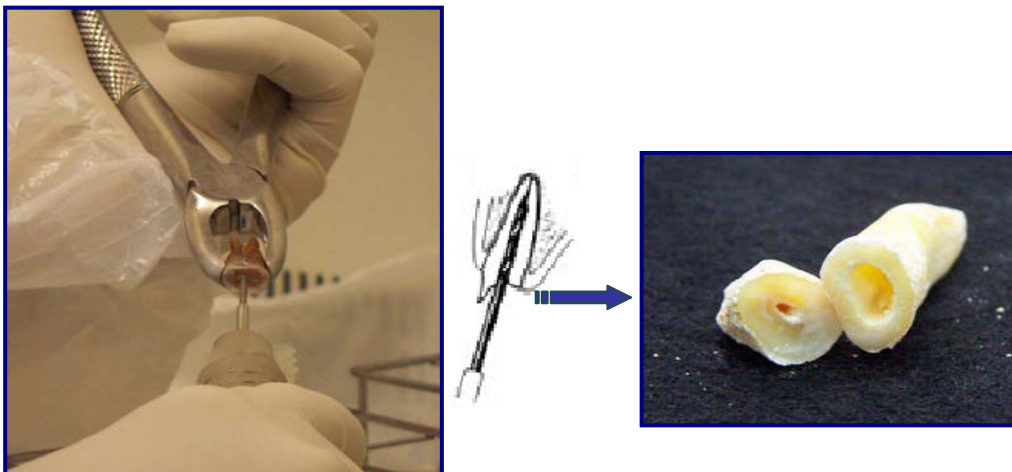


Fig. 20 - Abordaje a los conductos radiculares con fresas cónicas de diamante.

En los casos en los que las piezas dentarias presentaban un alto grado de calcificación, o si se observaba que las raíces estaban propensas a fracturarse, se realizó una apicectomía, una técnica de abordaje dentario que consiste en seccionar la porción apical del conducto radicular de una pieza dentaria.

En dientes aislados, se procedió de la siguiente manera: el diente se sostenía por la corona con el fórceps, llevando los bocados del mismo hasta la línea amelocementaria. Se realizó un corte perpendicular a una altura aproximada de

3 mm del ápice radicular, eliminando de esta manera los conductos laterales y las ramificaciones que pudieran encontrarse al final de la raíz (Fig. 21).

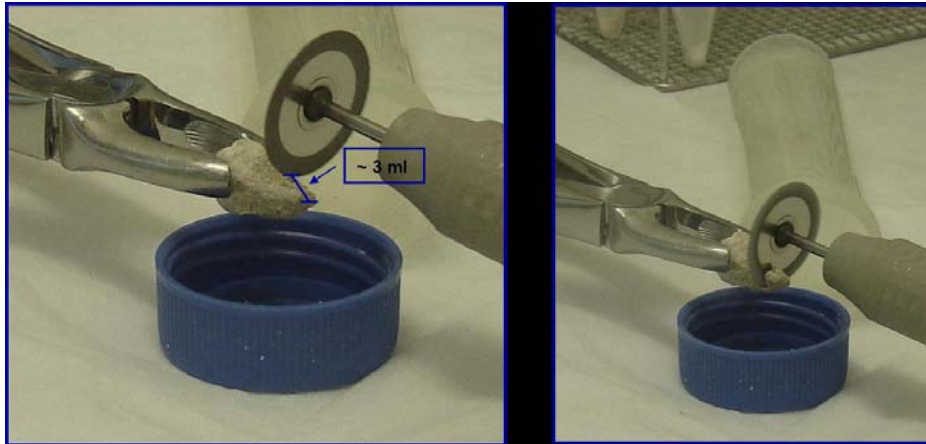


Fig. 21. Técnica de Apicectomía

Una vez realizado el corte y visualizada la entrada al conducto radicular, se introdujo la fresa cilíndrica y se limpiaron las paredes, lográndose obtener el polvo dentario (fig. 22).



Fig.22. Abordaje al conducto radicular con la técnica de apicectomía.

La determinación de la cantidad de raíz que debe ser eliminada depende de la incidencia de los conductos laterales apicales. Estudios realizados sobre la anatomía radicular apical han concluido que la apicectomía a 1mm del ápice reduce en un 40% los conductos laterales; a 2 mm reduce estas estructuras en un 86% y a 3 mm del ápice radicular suelen reducirse en un 98%, demostrando que

la apicectomía a esta distancia del ápice (3 mm), elimina la mayoría de estas entidades anatómicas (Kim, 2001).

Desde el punto de vista paleogenético, estos datos revisten importancia dado que a través de los conductos laterales puede incrementarse la posibilidad de contaminación, por lo que la aplicación de los principios clínicos tiene un mismo significado, en relación a la eliminación de los conductos apicales laterales. Además, esta técnica favorece la preservación casi intacta del diente; no obstante, muchas veces debido a la calcificación, la fragilidad puede ser mayor y por consecuencia, puede producirse la pérdida total de la pieza dentaria y por ende, de su valor antropológico.

3.2.2.2.2 POLVO ÓSEO

La extracción del DNA en muestras óseas, requiere de igual manera de condiciones extremas de esterilidad de todo el instrumental y de la muestra que se va a procesar. Para la obtención de la muestra, se procedía de la siguiente manera:

- Se eliminó la capa más superficial de la cortical externa de la zona donde se extraería la muestra, con el fin de descartar DNA exógeno, como producto de manipulaciones previas. A continuación, se procedió a la obtención del polvo óseo:
- Con ayuda de un disco con borde diamantado doble cara de 7/8" diámetro montado en mandril N° KG-7020 (KG Sorensen®), se seccionó el hueso a nivel de la diáfisis (Fig. 23), visualizándose el canal medular. Paso seguido, se introdujo una fresa redonda de diamante N° PM7 (KG Sorensen®), en el interior del conducto a fin de eliminar la superficie interna que lo reviste, y se descartaba el tejido que se desprendía. Finalmente se recolectaba aproximadamente 1gr de polvo del tejido óseo compacto el cual era depositado directamente en tubos de polipropileno de 15ml.

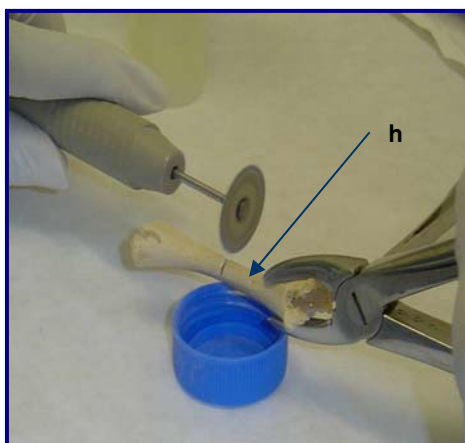


Fig. 23 - Obtención de polvo óseo: h) Sección del hueso a nivel de la diáfisis

- En caso de procesarse polvo óseo, antes de colocar el tampón de lisis, se realizaron dos lavados con 5 ml de EDTA 0.5 M (pH 8), con el fin de descalcificar el hueso y lograr que las células óseas se rehicieran accesibles al tampón de extracción (Hummel y Herrmann, 1994), y disminuir la concentración de sustancias inhibitorias (Laluezza, 1995). Después de añadir el EDTA, los tubos se taparon y se sellaron con parafilm, se agitaron suavemente y se llevaron a la centrífuga 5 minutos a 4.100 rpm. Pasado este tiempo, se decantó el sobrenadante y se le agregó nuevamente la misma cantidad de reactivo y se centrifugó bajo las mismas condiciones. Si la muestra presentaba una coloración muy marrón, se le realizaba un tercer lavado.

Una vez obtenido el polvo de dentina u óseo, se sometió a una digestión enzimática con 50µl de Proteinasa K a una concentración de 10mg/ml y 5 ml de tampón de extracción. Los tubos con la solución de lisis y el polvo dentario u óseo, se agitaron y se incubaron en una estufa a 37° durante toda la noche.

Después de cada proceso realizado en la cabina de flujo laminar, se limpiaba y se esterilizaba la cabina con agua jabonosa usando un detergente libre de iones, hipoclorito de sodio y etanol al 70 %, dejando dentro de ella todo el material necesario para el protocolo de extracción orgánica y se dejó irradiando con UV. Entre la obtención de la muestra y la extracción del DNA, no se realizaba ningún procedimiento dentro del laboratorio de DNA antiguo.

3.3 EXTRACCIÓN ORGÁNICA: PURIFICACIÓN Y CONCENTRACIÓN DEL DNA.

3.3.1. FASE DE PURIFICACIÓN.

Después de la incubación *overnight*, se realizó la fase de extracción del DNA, basándonos en un procedimiento con tres fases a base de fenol, fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y cloroformo (Fig. 24), empleándose una centrifuga refrigerada. En el caso de muestras óseas, antes de comenzar esta fase, se centrifugan las muestras 10 minutos a 4.100 rpm y se decantó el sobrenadante en un tubo nuevo estéril de 15 ml y se continuó el proceso con el siguiente protocolo:



Fig. 24 - Reactivos utilizados para la extracción orgánica del DNA.

Dentro de una cabina de flujo laminar y usando la indumentaria de trabajo (bata, mascarilla para sustancias tóxicas, lentes protectores y guantes desechables), se agregaron 5ml de fenol, se taparon los tubos, y se sellaron con parafilm, agitándose vigorosamente. Se centrifugó durante un ciclo de 7' a 2.000 rpm a 8° C. Al final de este ciclo y con ayuda de pipetas *Pasteur* de vidrio esterilizado, se eliminó la fase fenólica situada en la parte superior, quedando en el tubo, la fase acuosa (Fig. 25).

El hecho de que la fase fenólica sea la fase superior, se debe a la elevada concentración de EDTA que contiene el tampón de extracción, ya que incrementa considerablemente la densidad de la fase acuosa.



Fig. 25 - Extracción orgánica: j) fase fenólica, k) interfase y l) fase acuosa.

A la fase acuosa, se le añadieron 5ml de Fenol-Cloroformo/alcohol isoamílico (25:24: 1) centrifugándose en las mismas condiciones que en la etapa anterior. Posteriormente, se recuperó el sobrenadante y se transfirió a nuevos tubos, los cuales contenían 5 ml de Cloroformo y se repitió el ciclo de centrifugado.

Al término de este ciclo, se observó que no hubiese restos de cloroformo ya que estos reactivos pueden afectar la membrana filtrante del dispositivo de ultra filtración, empleado en la fase siguiente.

3.3.2 FASE DE CONCENTRACIÓN.

Para llevar a cabo la fase de concentración, se utilizaron dispositivos de ultra filtración I (*Centricon with Ultracel YM-30, membrane Millipore®*) (Fig. 26), los cuales constan de un depósito de muestra fabricado con estireno acrilonitrilo, un vial de retención, un tapón y un vial de filtrado, elaborados a base de polipropileno.

La membrana filtrante de celulosa regenerada *Ultracel YM-30*, con una junta de goma de silicona, retiene moléculas con un peso molecular límite (NMWL) de 30.000 Daltons y un volumen máximo inicial de muestra de 2ml, aplicándole una fuerza máxima de centrifugado de 5000 x g en un máximo de 5 ciclos de centrifugado, ya que una fuerza centrífuga mayor o un nº mayor de ciclos puede afectar la membrana filtrante, favoreciendo la abertura de sus poros y eventualmente su ruptura.

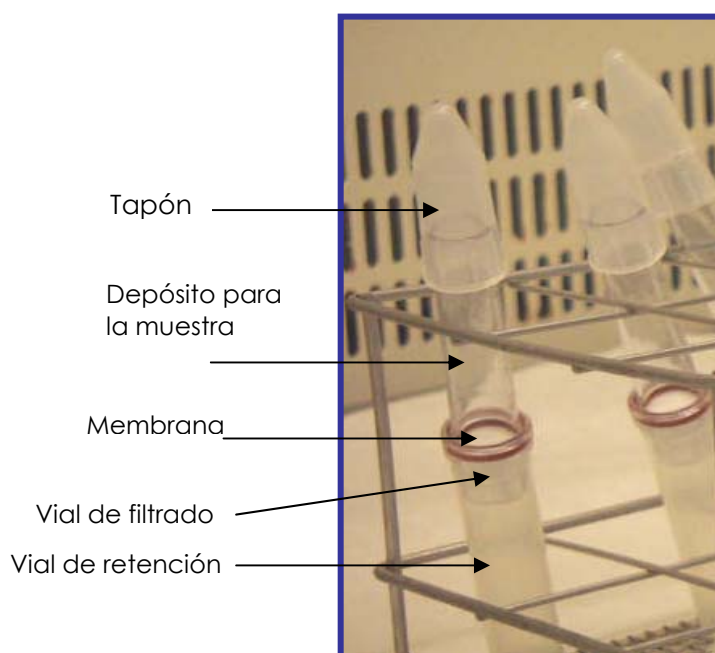
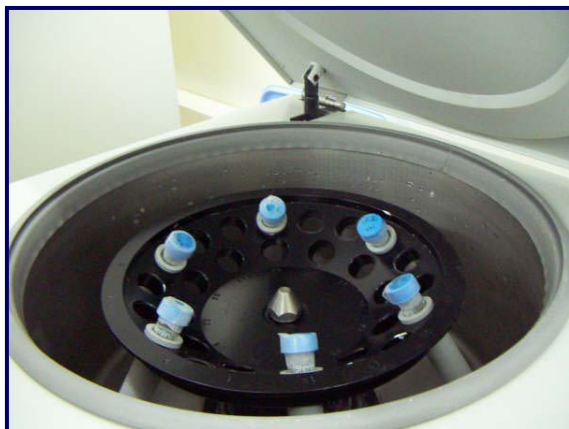


Fig. 26 Centricron /Millipore®

Tanto las bases como los tapones de estos dispositivos fueron esterilizados previamente en el autoclave. Dentro de la cabina de flujo laminar, se rotularon los centricones.

El protocolo a seguir durante esta fase fue el siguiente: se incorporó a la unidad filtrante 2ml del extracto con ayuda de pipetas *Pasteur* de vidrio, y se procedió a los centrifugados. Después de cada centrifugación se añadió más extracto hasta agotarlo. Si para el último centrifugado no se conseguía llenar el centricon con extracto, se añadía agua des-ionizada estéril. El procedimiento se describe con más detalle a continuación.

En la fase de concentración (Fig. 27), se aplicaron 5 ciclos de centrifugado reduciendo el tiempo, pero manteniendo la temperatura y las revoluciones por minutos, como se observa en la tabla I. Para recuperar el producto concentrado, se invirtió el dispositivo y se centrifugó durante 10 minutos, señalado en el cuadro inferior como 1*.



Temperatura y rpm	Ciclo	Tiempo (min)
23 °C - 4.100 rpm	1	60'
	2	55'
	3	55'
	4	50'
	5	45'
	1*	10'

Fig. 27 - Fase de concentración:

Al finalizar cada ciclo de centrifugado, se descartó de una sola intención el líquido depositado en la base (resto del filtrado), se colocó nuevamente parafilm a fin de sellar la unión filtro-base, continuando con el siguiente ciclo. En el último ciclo, una vez descartado el líquido (resto del filtrado), se invirtió el centricon a fin de que el producto acumulado en la membrana pudiera recolectarse en la tapa en un nuevo centrifugado. Finalizado este último ciclo, se trasladaron los centricones a la cabina de flujo laminar para poder estimar la cantidad de muestra obtenida. Después, la muestra de DNA en suspensión (Fig. 28), se almacenó a 4° C durante al menos 3 días, y así disminuir la acción de posibles inhibidores de PCR (Montiel et al., 1997; Montiel, 2001).

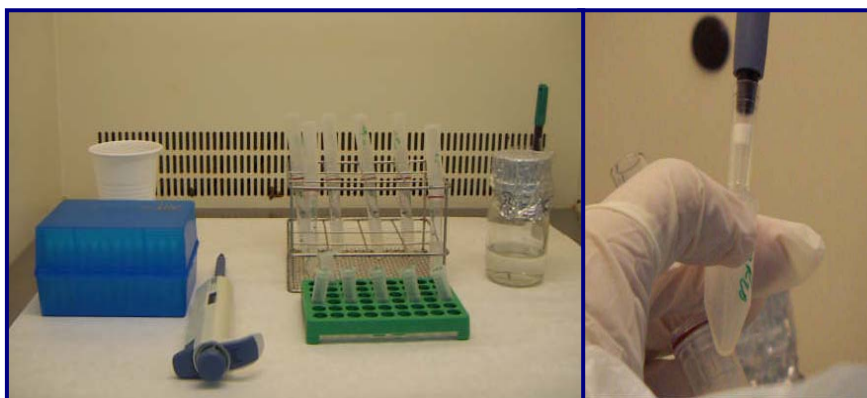


Fig. 28 - Estimación del volumen de muestra

3.4 CARACTERIZACIÓN GENÉTICA.

Para la caracterización genética se empleó el método de la reacción en cadena de la polimerasa o PCR, método descrito en el año 1983 por Kary Mullis, con el cual se logró la amplificación exponencial de fragmentos específicos del mtDNA, tanto de la región codificante, para el análisis de sitios de restricción polimórficos (RFLP's) descritos para las poblaciones europeas por Torroni y col. (1996); como de la región hipervariable I de la región D-Loop, para el análisis de los polimorfismos en la secuencia mediante secuenciación automática.

Al trabajar con DNA antiguo, se hace imprescindible establecer criterios que contribuyan a autentificar y sustentar los resultados que se obtienen (Montiel *et al.*, 2007). En este sentido, la comparación de los dos análisis, RFLPs de la región codificante y secuenciación de la región HVI, para verificar la correspondencia de los datos, ayuda en la autentificación de los resultados y permite también una mejor diferenciación de los tipos mitocondriales.

3.4.1 ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS DE RESTRICCIÓN (RFLPS) .

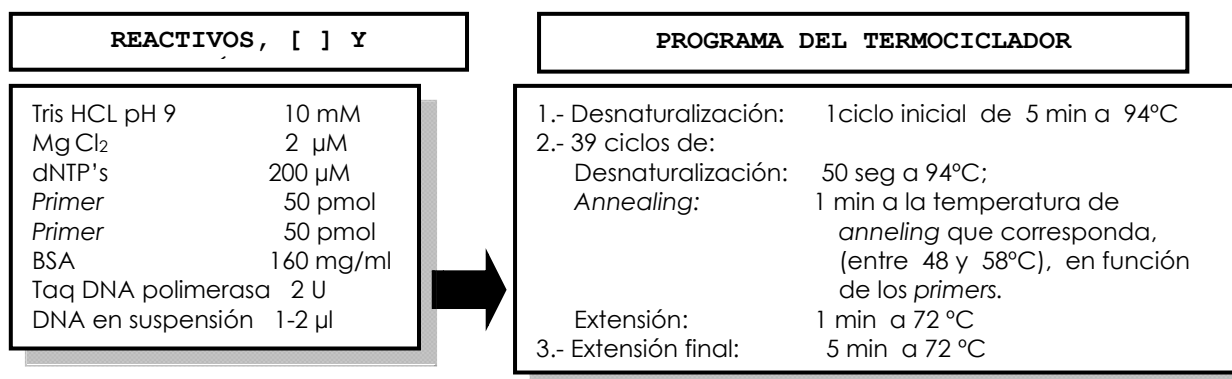
Para analizar la filogenia europea, se consideraron los 10 haplogrupos mitocondriales específicos de esta región geográfica descritos por Torroni y col. (1996). Para ello, se amplificaron mediante PCR fragmentos de la región codificante, en los que están presentes los sitios de restricción polimórfica para los haplogrupos H, I, J, K, U, V, W, X, PHV y T.

Debido a que las muestras antiguas por lo general presentan un material genético altamente degradado con tamaños medios no superiores a los 150 ó 200 pb (Pääbo *et al.*, 1988; Pääbo, 1989), se emplearon *primers* para fragmentos comprendidos entre 87 pb y 190 pb. Los *primers* utilizados para los haplogrupos PHV y X, fueron diseñados en nuestro laboratorio, para este estudio (Tabla 1).

Posición polimórfica	Primers y referencias		Coordenadas	T (C°)	Secuencia de los primers
Haplogrupo X +14465 <i>AccI</i>	L14399 H14513	Presente estudio	14379-14399 14553-14513	52°	5'-ACACTCACCAAGACCTCAAC-3' 5'-GGGAGGTATATGGGTTAA-3'
Haplogrupo PreHV +11719 <i>SmaI</i>	L11650 H11771	Presente estudio	11630-11650 11791-11771	52°	5'-AGTAACAGCCATTCTCATCC-3' 5'-GAGTGCCTTCGTAGTTTGAG-3'
Haplogrupo I -1715 <i>DdeI</i>	L1698 H1776	Montiel, 2001	1679-1698 1797-1776	53°	5'-TAGCCCCAAACCCACTCCAC-3' 5'-CITTCCTTGCCTGACTATATC-3'
Haplogrupo V -4577 <i>NlaIII</i>	L4538 H4621	Izagirre, 1998	4517-4538 4638-4621	51°	5'-CACTCATCACACAGCGCTAAGC-3' 5'-TGGCAGCTTCTGTGGAAC-3'
Haplogrupo H -7025 <i>AluI</i>	L6968 H7052	Françalacci (Comunicación personal)	6948-6968 7071-7052	58°	5'-CCGTAGGTGGCCTGACTGGC-3' 5'-TGATGGCAAATACAGTCTCT-3'
Haplogrupo W -8994 <i>HaeIII</i>	L8927 H9014	Izagirre, 1998	8907-8927 8995-9014	51°	5'-TTCTTACCACAAGGCACACC-3' 5'-AGGTGGCCTGCAGTAATGT-3'
Haplogrupo K -9052 <i>HaeII</i>	L9020 H9082	Montiel, 2001	9000-9020 9103-9082	51°	5'-ACGCCTAACCGCTAACATTAC-3' 5'-AGATGATAAGTGTAGAGGGAAG-3'
Haplogrupo U +12308 <i>HinfI</i>	L12237 H12309	Izagirre, 1998	12215-12237 12279-12309	53°	5'-CACAAGAAGTCTAACTCATGC-3' 5'-ATTACTTTTATTGGAGTGCACCAAGATT-3'
Haplogrupo J -13704 <i>BstOI</i>	L13640 H13720	Montiel, 2001	13622-13640 13739-13720	48°	5'-TCACCCTAACAGGTCAACC-3' 5'-ATGAGAAATCTGCGAATAG-3'
Haplogrupo T +15606 <i>AluI</i>	L15561 H15625	Montiel, 2001	15543-15561 15646-15625	51°	5'-CCCACATCAAGCCCCGAATG-3' 5'-GATGAGGATGGATAGTAATAGG-3'
Haplogrupo M +10871 <i>MnlI</i>	L10849 H10912	Montiel (Comunicación personal)	10828-10849 10932-10912	56°	5'-TGAATCAACACAACCACCCAC-3' 5'-AGGAAAAGTTGGGGAACAG-3'

Tabla I- Primers específicos utilizados para el análisis de la región codificante del mtDNA.

La reacción de amplificación, se realizó en un volumen final de 50 μ l, añadiendo 1 μ l de la muestra de DNA y 49 μ l de solución maestra (master mix). Los reactivos y sus volúmenes, así como el programa del termociclador usado para la amplificación de los fragmentos se muestran a continuación:



3.4.2 DETECCIÓN DE PRODUCTOS AMPLIFICADOS.

3.4.2.1 ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA.

El producto obtenido de PCR se analizó por medio de electroforesis en gel de agarosa estándar al 3%, preparado con tampón TBE 1X (Tris-borato-EDTA) y bromuro de etidio a una concentración de 0.5 µg/ml (agente catiónico aromático plano que se intercala en el ADN duplex y que al ser expuesto a la UV, emite fluorescencia). A un total de 8.5 µl de producto amplificado, se le añadió 3 µl de tampón de carga (azul de bromofenol) que evita que las muestras al ser colocadas en los pocillos del gel de agarosa, se esparzan.

Se incluye además, un marcador de peso molecular de 123 bp DNA LADDER de Sigma (Fig. 29). Una vez terminada la migración del producto amplificado, se visualizó bajo luz ultravioleta.

Haplogrupo	SITIOS POLIMÓRFICOS									
	1715 <i>DdeI</i>	4577 <i>Nla III</i>	7025 <i>Alu I</i>	8994 <i>Hae III</i>	9052 <i>Hae II</i>	117 <i>Sma I</i>	12308 <i>Hinf I</i>	13704 <i>BstOI</i>	14465 <i>Acc I</i>	15606 <i>Alu I</i>
X	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-
I	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-
V	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-
H	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-
W	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-
K	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
U	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
J	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
T	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
PHV	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

Tabla II - Definición de los haplogrupos sobre la base de la presencia (+) o ausencia (-) de los sitios de restricción analizados (Torroni *et al.*, 1996).

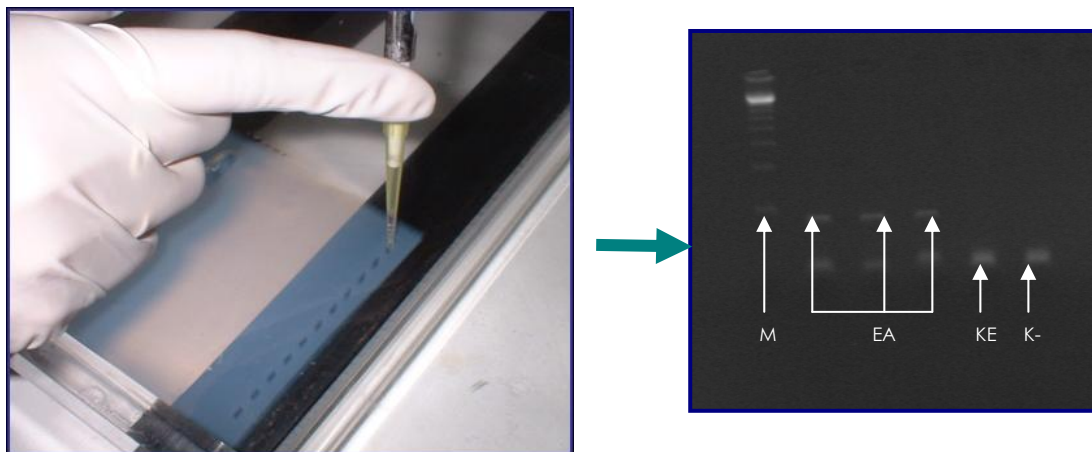


Fig. 29 - Carga de las muestras en gel de agarosa. Visualización de una PCR de un fragmento de 123 pb: M: marcador de peso molecular; EA: extractos amplificados; KE: blanco de extracción y K- blanco de amplificación.

Los fragmentos obtenidos mediante PCR, fueron digeridos con una enzima de restricción diferente según la posición polimórfica del haplogrupo a analizar. Para ello se procedió a tomar 10 µl de producto amplificado y se incubaron con 5 unidades de la enzima de restricción específica, en un baño termostático graduando la temperatura dependiendo de los requerimientos de la enzima, durante toda la noche. Al día siguiente, el producto se analizó por electroforesis en gel de agarosa NuSieve GTG® al 3%. Algunos ejemplos de patrones de presencia- ausencia de dianas de restricción se presentan en la figura 30.

Las enzimas de restricción son capaces de cortar la doble cadena del DNA en posiciones donde se sitúan sus secuencias de reconocimiento (o secuencia diana). Estas secuencias dianas o sitios de restricción pueden haberse creado o destruido por mutaciones ocurridas en los linajes del DNA mitocondrial a lo largo de su historia evolutiva. De esta forma, los patrones de presencia-ausencia de corte permiten la clasificación de las distintas muestras analizadas en haplogrupos específicos (Tabla II).

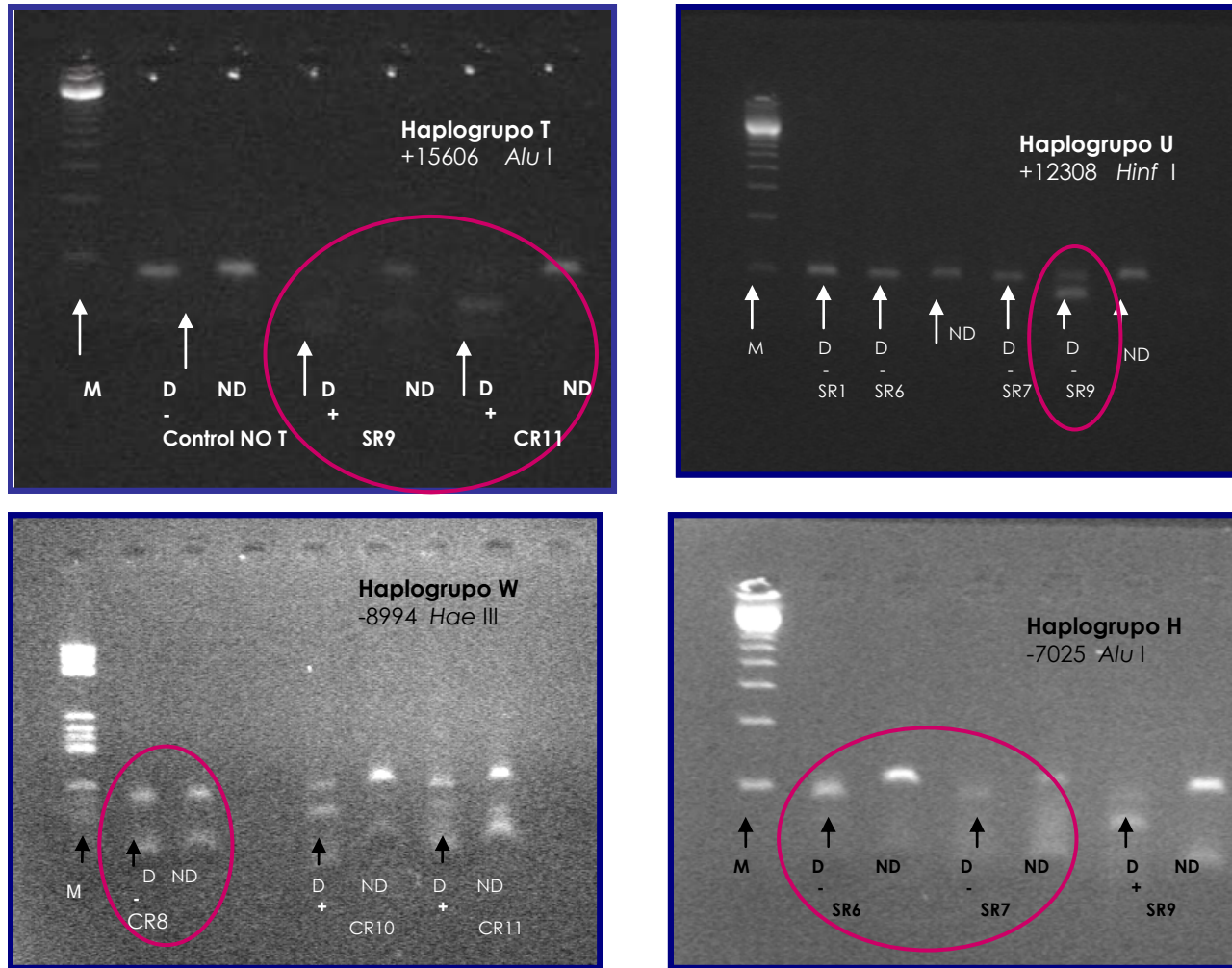


Fig.30. Ejemplos de patrones de presencia- ausencia de dianas de restricción. En los círculos rojos se muestran los resultados esperados de acuerdo al patrón de presencia (+) y ausencia (-) de los sitios de restricción.

3.4.3 ANÁLISIS DE LA REGIÓN HIPERVARIABLE I DEL mtDNA (HVS-I) .

Los haplotipos definidos por medio de la secuenciación de la región de control del mtDNA, representan un elemento clave para los estudios filogenéticos (Vigilant *et al.*, 1991) y para la caracterización de DNA antiguo (Stone y Stoneking, 1998; Montiel, 2001; García, 2002). No obstante, para clasificar un DNA mitocondrial con mayor fiabilidad y de forma detallada dentro de un haplogrupo o subhaplogrupo determinado, debe existir una correlación entre las sustituciones de la secuencia de la región de control y las sustituciones en la región codificante detectadas mediante el análisis de restricción.

Por lo tanto, esta correlación, utilizada por investigadores en individuos de distintas latitudes (Chen *et al.*, 1995; Graven *et al.*, 1995; Torroni *et al.*, 1996; Kivisild *et al.*, 1999; Montiel, 2001; Santos, 2005; Solórzano, 2006; Fu *et al.*, 2006), puede ser empleada para autenticar el DNA mitocondrial antiguo (Montiel *et al.*, 2001). El segundo proceso para la caracterización de los individuos en estudio consistió en la amplificación, purificación y lectura de la secuencia nucleotídica de fragmentos de 230 pb o de algunos fragmentos solapantes de la región hipervariable I (HVS-I) con un tamaño aproximado entre 100 y 130 pb. Las coordenadas de los segmentos amplificados, la secuencia de los *primers* utilizados y las condiciones de amplificación están expuestas en la tabla III.

La amplificación de la región hipervariable I, se realizó de igual manera por medio de la PCR y bajo las mismas condiciones explicadas en el apartado 3.4 con la diferencia que al volumen final de la mezcla de reacción (48 µl) se le añadieron 2 µl de DNA. De igual manera, el producto obtenido de PCR se analizó por medio de electroforesis en gel de agarosa (3%), siguiendo la misma metodología citada en el apartado 3.2.4.

Cuando la intensidad de la banda del producto amplificado era muy tenue, se reamplificó el producto de PCR, incluyendo en el proceso un blanco de reamplificación (PK). Por tratarse de un procedimiento intermedio entre los procesos de Pre-PCR y Post_PCR, este proceso se realizó bajo condiciones

especiales, como preparar la solución de reacción de amplificación en el laboratorio de Pre-PCR siguiendo el protocolo habitual y trasladar los tubos a otra cabina en otro laboratorio, con el fin de añadir los 2 µl del producto a reamplificar, usando pipetas y puntas con filtros exclusivas para este proceso.

Analysis position	Primers y Referencias	Coordenadas	T (c°)	Secuencias de Primer
Segmento D-Loop 2-4 231 pb	L16209 H16401	Montiel, 2001 Vigilant, 1991	16190-16209 16420-16401	60° 5'-CCCCATGCTTTACAAGCAAGT -3' 5'-TGATTTCACGGAGGATGGTG -3'
Segmento C 125 pb	L16209 H16339	Montiel, 2001 Solorzano & Diaz	16190-16209 16339-16320	51° 5'-CCCCATGCTTTACAAGCAAGT -3' 5'-GTGCTATGTACGGTAAATGG-3'
Segmento D 125 pb	L16313 H16401	Montiel, 2001 Vigilant, 1991	16292-16313 16420-16401	51° 5'-CACCCCTAACAGTACATAGTAC-3' 5'-TGATTTCACGGAGGATGGTG -3'

Tabla III - Primers específicos utilizados en este estudio para analizar la región hipervariable I.

3.4.3.1 PURIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE SECUENCIACIÓN.

Con el fin de eliminar los residuos de los reactivos de la reacción de PCR y obtener un producto de mayor pureza, el producto amplificado o reamplificado se purificó para ser secuenciado, empleándose dos procesos:

- Purificación con geles de agarosa
- Purificación con un Kit de limpieza de productos de PCR (Genycell®)

3.4.3.1.1 PURIFICACIÓN CON GELES DE AGAROSA.

Se siguió la metodología descrita por Montiel (2001), con modificaciones de temperatura y tiempo que contribuyeron a obtener un producto purificado de mejor calidad.

Se preparó un gel de agarosa NuSieve GTG® al 3% y los pocillos se cargaron con 42 µl de producto de PCR y 12 µl de tampón de carga, dejando migrar el producto, reduciendo el voltaje y aumentando el tiempo de la electroforesis a fin de conseguir una mejor separación de la banda de posibles elementos no específicos.

Visualizado el gel, se cortaron las bandas empleando una hoja de bisturí para cada una de las muestras (Fig. 31k), en un tiempo menor a 12 segundos, evitando una degradación mayor del DNA y se introdujeron en microtubos de 0,5 ml preparados con lana de vidrio lavada (Panreac®) y desfondados (Fig. 31L) e introducidos en un tubo de 1.5 ml. Los tubos se centrifugaron a 13.000 rpm durante 10 minutos. Pasado este ciclo, se cambió la orientación de los tubos, rotándolos en su eje vertical, para obtener un mejor filtrado.

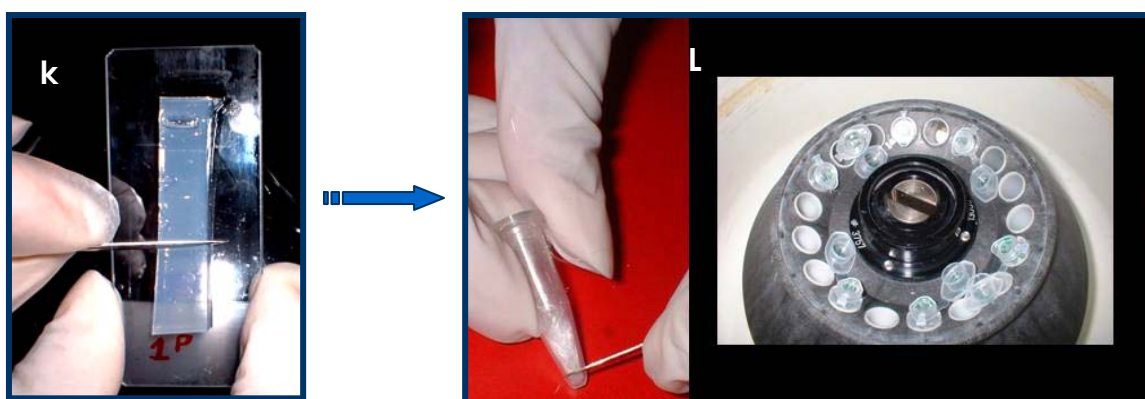


Fig. 31- Corte de las bandas en gel de NuSieve® al 3%,

La muestra tratada con fenol y cloroformo a volúmenes iguales, se centrifugó y el sobrenadante se trasladó a un dispositivo de ultrafiltración (*Microcon with Ultracel YM-30, membrane Millipore®*), similar al centricon, pero adaptado para microcentrífuga (Fig. 26), enrasándose a 500 μ l con agua desionizada y esterilizada. Después de dos ciclos de centrifugación, se invirtió la unidad filtrante, centrifugándose nuevamente durante 2 minutos a 12.000 rpm, recuperando el contenido en el vial de retención del microcon (Fig. 32).



3.4.3.1.2 PURIFICACIÓN EMPLEANDO UN KIT COMERCIAL.

El principio de esta técnica se basa en que el DNA sólo se adsorberá en la membrana de sílice bajo unas condiciones salinas que promuevan la afinidad del DNA. La membrana, una vez hidratada en presencia de una concentración elevada de sal caotrópica, pierde sus grupos OH de forma que el DNA (de carga negativa) puede unirse a su superficie mediante fuerzas débiles tipo Van Der Waals. Al disminuir la concentración de sales durante el lavado, los puentes H se vuelven a formar haciendo que el sílice vuelva a su estado inicial, de manera que el DNA ya no tiene fuerza electrostática para adsorberse y se eluye.

Se aplicó el protocolo del *Kit* de purificación de productos de PCR JETQUICK (Genycell®) (Fig. 33). Este Kit contiene dos soluciones Buffer H1 (Clorhidrato de Guanidina e isopropanol) y H2 (Etanol, NaCl, EDTA y Tris/HCl). Este último compuesto, se reconstituyó con etanol al 100%, antes de ser usado. Una vez purificado el producto, se visualizó en un gel de agarosa al 3%.

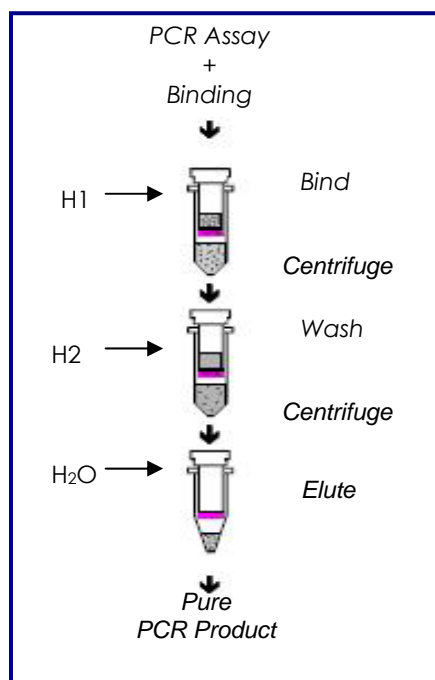


Fig. 33- Purificación de productos de PCR con JetQuick (Genycell®)

3.4.3.2 SECUENCIACIÓN DE PRODUCTOS AMPLIFICADOS.

Las reacciones de secuenciación se realizaron en la Unidad de Antropología Biológica de la UAB, por medio de PCR de extensión por separado para ambas cadenas, con una mix preparada con 2.5 µl de agua des-ionizada y estéril, 1.5 µl de *Big Dye® Terminator v3.1*, ABI PRISM®, 1.0 µl de Buffer de secuenciación, 1.0 µl de cada primer (5 pmol), los mismos que fueron empleados para la reacción de amplificación, y 4 µl de DNA purificado, para finalmente obtener un volumen final de 10 µl.

Finalmente, el programa del termociclador PRIMUS 25, empleado para este procedimiento, consistió de un ciclo inicial de 1 minuto a 96°C, a continuación 25 ciclos de 10 segundos a 96°C, 5 segundos a 50°C y 4 minutos de extensión a 60°C; finalmente, un ciclo de extensión final de 5 minutos a 72°C. Al término de este último paso, la temperatura del bloque desciende a 4°C.

3.4.3.2.1 ELIMINACIÓN DE LOS TERMINADORES DE LA REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN.

La Purificación de los productos de extensión mediante la precipitación del DNA Etanol-EDTA tiene como finalidad eliminar los terminadores de la reacción de secuenciación no incorporados al producto de extensión. Este procedimiento se realizó bajo el siguiente protocolo:

- Se transfirió el volumen total 10 µl del producto de extensión a tubos de 1.5 µl, añadiéndole 5 µl de EDTA (125 mM) y 60 µl de etanol al 100% (temperatura ambiente).
- Se mezcló bien con ayuda del vortex y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos para posteriormente, centrifugar 20 minutos a 13.000 r.p.m a una temperatura de 4°C.
- Se retiró el sobrenadante, empleando pipetas con puntas estériles y se procedió al secado de cada microtubo, eliminando los restos de reactivos que pudieron haber quedado con ayuda de aire frío por 30 minutos.
- Luego, se le agregó 60 µl de etanol al 70% y se centrifugó 20 minutos a 13.000 r.p.m a una temperatura de 4°C, retirando el sobrenadante,

continuando con el secado de los microtubos de igual manera que el paso anterior y luego, se incubaron a 37 °C durante 5 minutos.

El producto obtenido fue secuenciado en el Servicio de secuenciación de la UAB, utilizando un secuenciador automático de capilares ABI 3100 de la casa *Applied Biosystems*. El programa *Chromas* se empleó para la visualización de las secuencias, las cuales fueron alineadas con la secuencia de referencia de Cambridge (Anderson *et al.*, 1981) usando el programa *BioEdit* v 5.0.9.1 (Hall, 1999).

3.5 MUESTRAS INHIBIDAS.

Aquellos extractos, que una vez realizada la primera amplificación, mostraron signos de inhibición, fueron purificados con el mismo Kit comercial de la casa Genycell®, utilizado para las muestras que fueron secuenciadas, siguiendo el mismo protocolo (ver apartado 3.6.3.1.2).

Por tratarse de purificación de extractos de DNA y no de material amplificado, las condiciones de trabajo son diferentes. En primer lugar éste proceso se realizó en el laboratorio de Pre-PCR y dentro de la cabina de flujo laminar, siguiendo estrictas medidas de esterilización, minimizando los riesgos de contaminación y empleando material específico para este proceso.

Cada muestra fue procesada de forma separada a fin de evitar la contaminación cruzada. Al final de cada purificación la cabina se sometió al proceso de rutina de limpieza y esterilización, irradiándola con UV por espacio de 30 minutos. Al cabo de este tiempo, se continuaba con la siguiente muestra. Esto se realizó con el fin de evitar las contaminaciones cruzadas. El DNA purificado se almacenó a -4°C. Para la limpieza y esterilización de la cabina, se aplicó el procedimiento de rutina.

3. 6 CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DEL INVESTIGADOR.

Es importante identificar y secuenciar el DNA de la autora del trabajo ya que representa la principal fuente de contaminación natural en el laboratorio (Hummel y Herrmann, 1994; Keyser-Tracqui *et al.*, 2002). A partir de una muestra de sangre se amplificó un segmento de 404 pb de la región HVSI desde la posición 16024, utilizando los *primers* L-15997 (5' CAC CAT TAG CAC CCA AAG CT 3') y H-16401 (5' TGA TTT CAC GGA GGA TGG TG 3') y las condiciones de amplificación descritas por Pereira y colaboradores (2000).

3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

3.7.1 REGIÓN CODIFICANTE.

En este apartado, se describirán los diferentes métodos estadísticos utilizados a partir de los datos genéticos del mtDNA para establecer las relaciones filogenéticas entre las series analizadas en este estudio y las poblaciones empleadas para el análisis comparativo (Tabla IV y Fig. 34).

La comparación entre las frecuencias de haplogrupos de las poblaciones relacionadas se ha llevado a cabo mediante el programa ARLEQUÍN 2000 (Schneider *et al.*, 2000) utilizando el test exacto de diferenciación poblacional (Raymond & Rousset, 1995).

A partir de las frecuencias relativas encontradas en las poblaciones relacionadas, se realizó el análisis de componentes principales, utilizando el programa estadístico SPSS (*The Apache Software Foundation*, 2000). De igual manera, con este mismo programa pero empleando la matriz de distancias genéticas de Reynolds (Reynolds *et al.*, 1983), obtenida a través del programa ARLEQUÍN 2.000 (Schneider *et al.*, 2000), se realizaron los gráficos para el análisis del escalamiento multidimensional empleando el programa estadístico SPSS v.14.

Para la construcción del árbol sin raíz que se realizó con las poblaciones antiguas, se empleó el método de Neighbour-Joining (Saitou y Nei, 1987), incluido en el programa estadístico Phylip 3.57c (Felsenstein, 1995), utilizando la matriz de

distancias genéticas de Reynolds (Reynolds *et al.*, 1983) y la representación gráfica del árbol, se realizó con el programa TREEVIEW (Page, 1996).

3.7.2 REGIÓN DE CONTROL DEL MTDNA (HVS-I) .

Para el análisis de la región control o HVS-I del mtDNA, se tomó en cuenta un fragmento base comprendido entre las posiciones 16209-16365, conformado por 156 pb que de acuerdo con Montiel (2001), contiene suficiente información para realizar análisis filogenéticos en poblaciones europeas.

De una de las series analizadas, específicamente, S'Illot des Porros, se lograron recuperar secuencias que incluyeron un menor nº de pares de base y constituidas la mayoría de ellas por dos fragmentos: un primer fragmento de 82 pb comprendido entre las posiciones 16209-16291 y otro de 87 pb entre las posiciones 16313-16401. Ciertamente, entre estos dos fragmentos queda un *gap* o un espacio con datos faltantes, ya que inicialmente no se contaba con *primers* que amplificarían esta región situada entre las posiciones 16291-16304.

Por otra parte, no todos los extremos de las secuencias reconstruidas coincidían con la posición 16209 ni con la 16401, debido tal vez al daño molecular que presentaban las muestras, razón que condujo a seleccionar un fragmento que agrupara el mayor número de secuencias, delimitando estos fragmentos de secuencias entre las posición 16243 y 16365, obteniéndose así, secuencias de 126 pb. Las zonas faltantes fueron cubiertas por símbolos de "*missing data*", herramienta estadística que se emplea para mantener el alineamiento respecto a las secuencias de las otras poblaciones y poder conducir los análisis.

Para la comparación poblacional y la reconstrucción filogenética, se han utilizado las secuencias de las series en estudio, poblaciones antiguas de la Península Ibérica y poblaciones contemporáneas de Europa, África y del Cercano Oriente, referidas en la literatura y expresadas en la tabla IV y en la figura 34.

El programa Arlequín 2000 (Schneider *et al.*, 2000) se ha utilizado para el cálculo del nº de sitios polimórficos, la diversidad nucleotídica y la diferencia por parejas.

El índice de diversidad genética interpoblacional \hat{H} (Nei, 1978) se calculó a través del programa DNAsp (Rozas y Rozas, 1995).

A partir de la matriz de distancias genéticas obtenida a través del programa ARLEQUÍN 2.000 (Schneider *et al.*, 2000), basada en la transformación de Reynolds del estadístico F_{st} (Reynolds *et al.*, 1983), calculados por pareja de poblaciones a partir de las secuencias de fragmentos de 126 pb y de 156 pb de la región HVS-I del mtDNA para las tres series analizadas y las poblaciones de comparación, se realizaron los gráficos para el análisis del escalamiento multidimensional.

RECONSTRUCCIÓN FILOGENÉTICA.

Las redes filogenéticas (networks) entre haplotipos se realizaron con el algoritmo *Median Joining Network* (Bandelt *et al.*, 1995) del programa NETWORK v 4.2.1. Cabe señalar que para la construcción de estas redes se emplearon dos tipos de base de datos:

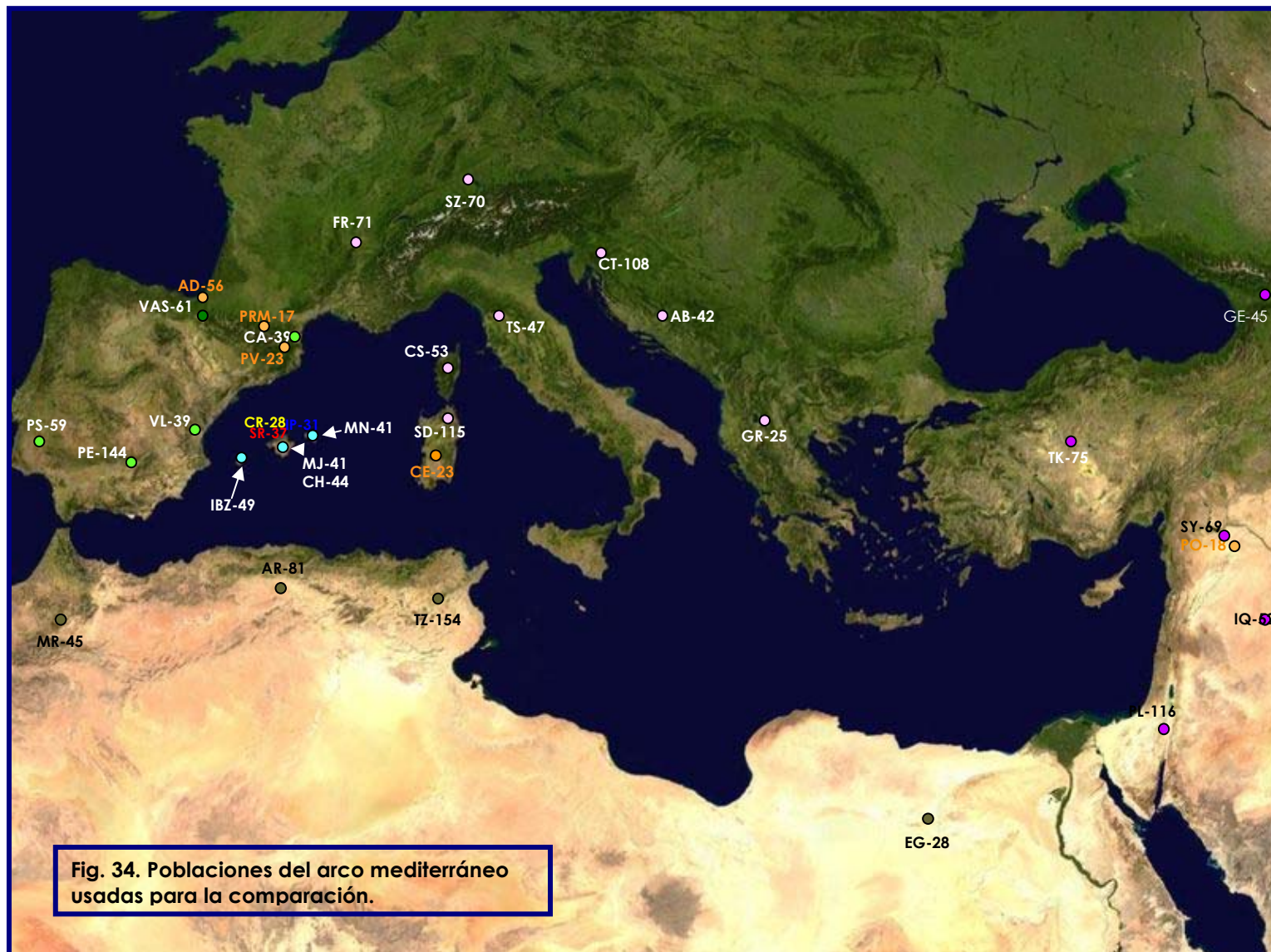
- **Binary Data**, para poder comparar los datos de **IP** con el resto de poblaciones, acoplado todas las secuencias con inclusión de los *missing data* al fragmento de 126 pb.
- **DNA nucleotide Data**, para comparar las poblaciones antiguas de **SR** y **CR** con el resto de poblaciones del arco mediterráneo, utilizando secuencias de mayor tamaño (156 pb).

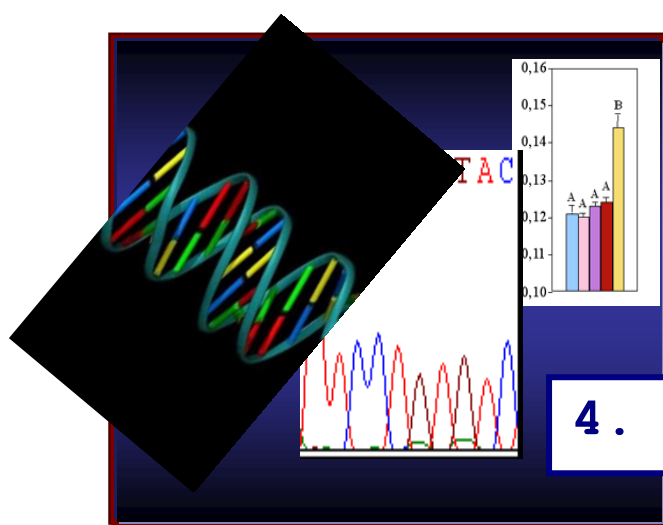
A fin de obtener una mejor imagen, se agruparon los haplogrupos relacionados filogenéticamente, de la siguiente forma:

- U5-U5a1a-K
- PHV- HV-PV- V
- I-W-X
- J-T

Poblaciones	Código	n	data	Referencia
Son Real	(SR)	37	Antigua (1)	Presente estudio
S'illot des Porros	(IP)	31	Antigua (1)	Presente estudio
Can Reiners	(CR)	28	Antigua (1)	Presente estudio
Plaça Vella	(PV)	23	Antigua (1)	Montiel, 2001
Ibérico Pre Romano	(PRM)	17	Antigua (1)	Samprieto <i>et al.</i> , 2005
Próximo Oriente Antiguo	(PO)	18	Antigua (1)	Fernández Domínguez, 2005
Aldaieta	(AD)	56	Antigua (1)	Alzualde <i>et al.</i> , 2006
Cerdeña antigua	(CE)	23	Antigua (1)	Caramelli <i>et al.</i> , 2007
Cataluña	(CA)	39	Actual (2)	Montiel, 2001
País Vasco	(VAS)	61	Actual (2)	Corte-Real <i>et al.</i> , 1996
Pedroche	(PE)	144	Actual (2)	Fernández Rosas 2005
Valencia	(VL)	39	Actual (2)	Picomell <i>et al.</i> , 2005
Sur de Portugal**	(PS)	59	Actual (2)	Pereira <i>et al.</i> , 2000
Mallorca	(MJ)	41	Actual (2)	Picomell <i>et al.</i> , 2005
Chuetas	(CH)	44	Actual (2)	Picomell <i>et al.</i> , 2005
Menorca	(MN)	41	Actual (2)	Picomell <i>et al.</i> , 2005
Ibiza	(IBZ)	49	Actual (2)	Picomell <i>et al.</i> , 2005
Marruecos	(MR)	45	Actual (2)	Brakez <i>et al.</i> , 2001
Argelia	(AR)	81	Actual (2)	Corte-Real <i>et al.</i> , 1996
Túnez	(TZ)	154	Actual (2)	Fadhlaoui <i>et al.</i> , 2004 Stevanovitch <i>et al.</i> , 2003
Egipto	(EG)	28	Actual (2)	
Cerdeña actual	(SD)	115	Actual (2)	Richards <i>et al.</i> , 2000
Toscana	(TS)	47	Actual (2)	Torrioni <i>et al.</i> , 1996
Córcega*	(CS)	53	Actual (2)	Morelli <i>et al.</i> , 2000
Francia	(FR)	71	Actual (2)	Richards <i>et al.</i> , 2000
Suiza	(SZ)	70	Actual (2)	Pult <i>et al.</i> , 1994
Croacia*	(CT)	108	Actual (2)	Tolk <i>et al.</i> , 2001
Albania	(AB)	42	Actual (2)	Bosch <i>et al.</i> , 2006
Grecia	(GR)	25	Actual (2)	Bosch <i>et al.</i> , 2006
Turquía	(TK)	75	Actual (2)	Mergen <i>et al.</i> , 2004
Siria	(Sy)	69	Actual (2)	Richards <i>et al.</i> , 2000
Israel	(pl)	116	Actual (2)	Richards <i>et al.</i> , 2000 Di Rienzo y Wilson, 1991
Irak	(IQ)	52	Actual (2)	Al-Zahery <i>et al.</i> , 2003
Georgia**	(GE)	45	Actual (2)	Comas <i>et al.</i> , 2000

Tabla IV . Poblaciones empleadas para la comparación poblacional y reconstrucción filogenética.
(*)Poblaciones empleadas sólo para el análisis de RFLPs; (**) poblaciones empleada sólo para el análisis de HVS-I.





4 . RESULTADOS .

4. RESULTADOS.

4.1 METODOLOGÍA Y CRITERIOS DE AUTENTICIDAD.

La parte experimental de este estudio, se realizó en un laboratorio exclusivo dotado con los equipos adecuados para trabajar con aDNA, que incluye una cabina de flujo laminar, centrífuga refrigerada, estufa y caja esterilizadora. Todos estos equipos se sometieron de manera habitual a la limpieza con soluciones desinfectantes y radiación ultravioleta para su descontaminación. Asimismo, se contó con una unidad de presión positiva que cubría el área física del laboratorio. Los procedimientos de pre-PCR y post-PCR, se realizaron en áreas separadas.

A fin de evitar y minimizar el riesgo de contaminación con DNA exógeno, se siguieron de forma rutinaria estrictas medidas de esterilización (limpieza con soluciones desinfectantes, utilización de material estéril y uso de reactivos en alícuotas). Estas medidas están descritas detalladamente en el capítulo de Muestras y Metodología y fueron aplicadas tanto a las áreas de trabajo como al instrumental. Estas medidas también incluyen el uso de una indumentaria apropiada (Fig. 35).



Fig. 35 Material estéril e indumentaria empleada.

En el presente trabajo y bajo las condiciones antes expuestas, han sido analizadas 134 muestras pertenecientes a 40 individuos de S'Illot des Porros (**IP**), 54 de Son Real (**SR**) y 40 de la Necrópolis Alto-Medieval de Can Reiners (**CR**), realizándose un total de 28 extracciones distribuidas de la siguiente manera: 8 de S'Illot des Porros, 12 de Son Real y 8 de Can Reiners.

Cada extracción se realizó para un grupo o set de 4 a 6 dientes, con la excepción de una extracción de la serie de Can Reiners, donde se combinaron muestras dentarias y óseas. En cada proceso fue incluido un blanco de extracción como control de contaminación, por lo que el promedio de la razón muestras/blancos fue de 5 a 1.

A nivel metodológico también es interesante resaltar la incorporación de un proceso de purificación del extracto con un *Kit* de purificación de productos de PCR, marca Genycell Biotech ® (protocolo descrito en la sesión 3.4.4.2 de Muestras y Metodología), con el cual se logró la eliminación de sustancias inhibitoras de la PCR. No todas las muestras fueron sometidas a este proceso, ya que este paso se realizó después de efectuada la primera amplificación del extracto, que permitió valorar la presencia o no de sustancias inhibitoras de la *Taq* DNA polimerasa.

En este sentido, los extractos de los individuos SR/1-67-A(2) y CR/93.1 presentaron signos claros de inhibición al ser observada la ausencia de bandas así como de dímeros de *primers* en el gel de agarosa (Fig. 36), hecho que podría indicar la inhibición de la polimerasa. Por este motivo, estos extractos fueron purificados con el *kit* referido anteriormente, lo que resultó en la obtención de bandas de amplificación de excelente calidad y específicas del fragmento buscado, alcanzándose así la caracterización de estos individuos con resultados concluyentes.

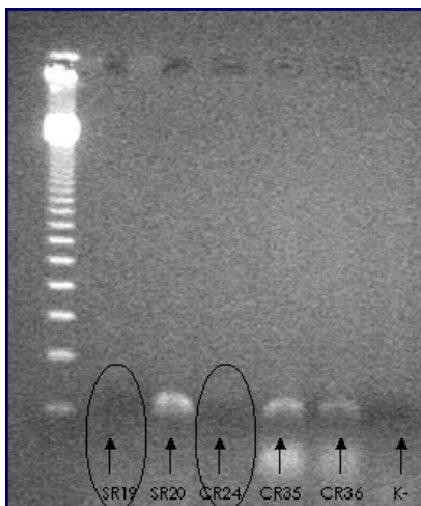


Fig. 36- PCR de un fragmento de 123 pb. En el gel se muestra la inhibición de dos extractos (SR19 y CR24), indicada por la ausencia de dímeros de primers

Con respecto a la purificación del producto amplificado para la secuenciación, ésta se realizó mediante dos procesos, descritos en la sección 3.4.4 de Muestras y Metodología. Todas las muestras pertenecientes a **IP** y la mayor parte de **SR**, fueron purificadas siguiendo la metodología descrita por Montiel (2001), basado en la recuperación de DNA a partir de geles de agarosa, mientras que las muestras de **CR** fueron purificadas en su totalidad con el *Kit* comercial de la casa Genycell Biotech®.

Al comparar los resultados con ambos protocolos, se pudo observar un nivel adecuado de pureza, no obstante, con el uso del kit comercial, hubo un ahorro sustancial de tiempo y trabajo, con una menor exposición de la muestra a elementos contaminantes externos. La caracterización genética de los individuos en estudio se logró siguiendo la metodología descrita por Montiel (2001), basada en la combinación del análisis de sitios de restricción polimórficos (RFLP's) y la secuenciación de fragmentos de la región HVS-I.

4.1.1 PROCESAMIENTO DE BLANCOS DE EXTRACCIÓN Y DE AMPLIFICACIÓN.

La reacción de PCR se realizó para cada grupo de muestras procedentes de la misma extracción y su correspondiente blanco o control de extracción. De las 28 extracciones realizadas, sólo una resultó contaminada (extracción nº 4 de la serie

de S'Illot des Porros: IP B-22, IP C 1964-42', IP C-18, IP 98-1 y IP C-49), cuyo blanco de extracción (KE) resultó positivo y que al ser secuenciado, coincidió con la secuencia del investigador, razón por la cual fue descartado todo el grupo de muestras en cuestión. No obstante, muestras de estos individuos, fueron nuevamente procesados para obtener su caracterización.

Por otra parte, en algunos procesos de PCR, el K- (control de amplificación) resultó contaminado, razón por la cual se descartaron tanto los productos de PCR, como las alícuotas de los reactivos utilizados. Este control fue secuenciado y el resultado indicó que la secuencia obtenida del control se correspondían con una de las muestras del grupo amplificado, razón que llevó a repetir el proceso de amplificación y secuenciación, resultando en esta nueva ocasión, un control sin bandas en el gel de agarosa. Esto hace suponer que se trató de una contaminación causada por el fenómeno de *carryover*, que consiste en la amplificación de moléculas de DNA que provienen de otras muestras o de amplificaciones anteriores y en este caso podría deberse al acarreo de DNA de la muestra al blanco.

En los casos en que se requirió realizar reamplificaciones, se incorporaron los controles tanto de extracción (KE), de amplificación (K-) y un control de reamplificación, resultando en todos los casos negativos.

4.1.2 REPLICACIÓN DE MUESTRAS EN EL LABORATORIO.

De manera aleatoria se seleccionaron dos individuos (SR/43.1 y SR/Sep74) en los cuales se duplicó todo el proceso: se realizaron extracciones independientes y las respectivas amplificaciones, verificando a través de los análisis tanto de la región codificante, como de la región control, que el resultado era concordante, lo que contribuye a reforzar la autenticidad de los resultados (Montiel *et al.*, 2007).

4.1.3 REPLICACIÓN DE MUESTRAS EN UN LABORATORIO INDEPENDIENTE.

Las muestras pertenecientes a los individuos SR43.1 y SRSep74, fueron procesadas en dos laboratorios (laboratorio 1 y laboratorio 2) distintos de l'Unitat d'Antropologia de la UAB, comprobándose que los resultados de los análisis de RFLP y de la HVS1 eran concordantes.

4.1.4 VALORACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS.

Los resultados del análisis de las tres series se muestran en las tablas VI, VII y VIII. El porcentaje de eficiencia de amplificación al trabajar con aDNA por lo general es bajo, razón que puede ser atribuida a las condiciones de preservación de los restos antiguos (Hagelberg, 1994; Tuross, 1994). En el presente trabajo no todas las muestras presentaron la misma eficiencia a la hora de amplificar, por lo que se obtuvieron distintos porcentajes de efectividad por población analizada. De un total de 134 muestras, 96 resultaron efectivas: 37 (68,51%) de **SR**; 31 (77,50 %) de **IP** y 28 (70%) de **CR**, que al promediarlos se da un valor de 71,64%; valor que puede considerarse satisfactorio considerando la antigüedad de las muestras cuyo rango se sitúa entre los siglos VI-II a.C., de la Edad de Hierro hasta el siglo VII d.C. (Gráfico 1).

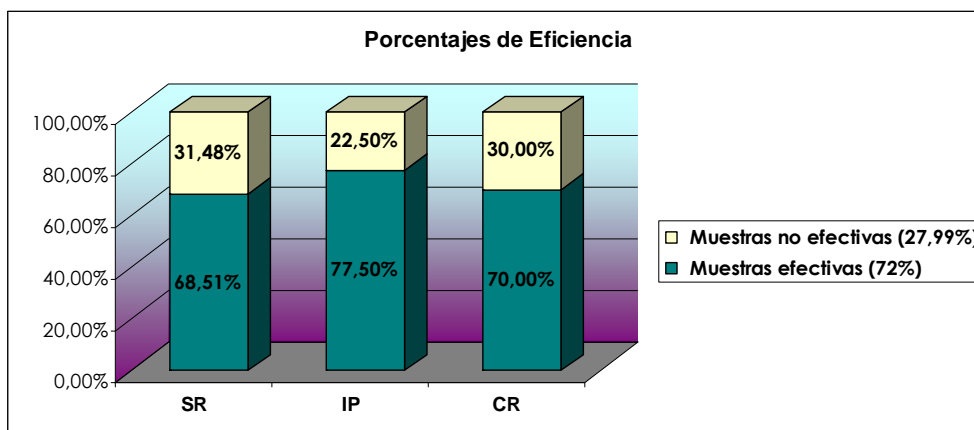


Gráfico 1. Eficiencia de resultados

Las muestras consideradas **no efectivas** (gráfico 1), fueron aquellas en las cuales se obtuvo la amplificación para menos de 3 haplogrupos y la PCR para la región

de control resultó negativa. La falta de efectividad de los extractos pudo estar relacionada con el daño molecular que presentaba el DNA en estos individuos, producto de la mala preservación y conservación en que se encontraban las muestras.

El valor medio obtenido de la sumatoria de los porcentajes de muestras no efectivas de cada una de las series analizadas (Son Real 31, 48%; S'Illot des Porros 22, 50%; y Can Reiners fue de 30%. Cabe destacar que el individuo SR/50.30 a pesar de haber producido más de tres amplificaciones y un fragmento de secuencia CRS de 87 pb, no pudo ser caracterizado ya que el análisis de restricción enzimática no arrojó resultados concluyentes, razón por la cual se consideró como muestra no efectiva.

4.1.5 DETERMINACIÓN DE VARIABILIDAD MITOCONDRIAL ENTRE LAS MUESTRAS DE UN MISMO GRUPO O SET DE EXTRACCIÓN.

Los resultados de los análisis moleculares de las tres series antiguas objeto de este estudio (tablas VI, VII y VIII) muestran variabilidad mitocondrial en la mayoría de los grupos de extracción. En algunos grupos de extracción tales como las extracciones Nº 12 de Son Real, Nº 2 de S'Illot des Porros y Nº 6 de Can Reiners, la variabilidad mitocondrial se pudo observar a pesar de que los individuos fueron caracterizados dentro de un mismo haplogrupo, ya que la secuencia de la región HVS-I para cada individuo, mostró diferencias entre ellos.

Nº	INDIVIDUO	REGIÓN CODIFICANTE										REGIÓN DE CONTROL		
		H	I	J	K	T	U	V	W	PHV	X	RFLP	SECUENCIA	HVR1
		-7025 Alu I	-1715 Ddel	-13704 Bst0I	-9052 Hae II	+15606 Alu I	+12308 Hinf I	-4577 Nla III	-8994 Hae III	+11719 Sma I	+14465 Acc I			
01	SR 4-67(2)	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	X	223T, 278T	X
	SR Sep 75													
	SR 3-67-A	+	+	-	NA	-	-	+	+	-	-	J	CRS	J
	SR 47-15													
	KE													
02	SR 1-67-A(1)	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	H	221T	H
	SR 54.2	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	H	CRS	H
	SR 47.3	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	T	292T,294T,344T	T
	SR 54.1.	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	U	270T,290T,292T,294T	U5
	SR 1-67-A(5)	+	+	+	+	-	-	NA	+	+	-	PHV	CRS	PHV
	SR 47.1													
03	SR 50.1													
	SR 50.70													
	SR 43.1 (R50)	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	J	CRS	J
	SR 72.2	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	J		
	KE													
04	SR 75.2	+	+	+	+	-	+	NA	+	-	NA	U		
	SR 1-67-A(2)	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	J	278T	J
	SR 75.1	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	K,U	224T, 311C	K
	SR 43.5	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	J	242T	J
	KE													
	SR 1.3	+	+	+	+	NA	+	+	+	-	NA	U		

Tabla VI- Serie de Son Real: Resultados de los análisis de la Región codificante y HVS-I. Las filas marcadas en **ROSA** señalan las muestras no efectivas, las filas **AZULES** identifican los controles de extracción o KE, las celdas señaladas en **VERDE** muestran los individuos analizados sólo con RFPLs Y en **OCRE** las muestras duplicadas en dos laboratorio distintos de la UAB

Nº	INDIVIDUO	REGIÓN CODIFICANTE										REGIÓN DE CONTROL		
		H	I	J	K	T	U	V	W	PHV	X	RFLP	SECUENCIA	HVR1
		-7025	-1715	-13704	-9052	+15606	+12308	-4577	-8994	+11719	+14465			
	Alu I	Ddel	Bst0I	Hae II	Alu I	Hinf I	Nla III	Hae III	Sma I	Acc I				
05	SR 22.D	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	H	291T, 293G	H
	SR 43	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	X		
	SR 53.4	+	+	+	-	NA	+	+	+	-	-	K,U	224C,311C	K
	SR 4412	KE												
06	SR 2	KE												
	SR 5029	KE												
	SR 5030	KE												
	SR 3	KE												
	SR 36.1	KE												
	SR 1-67 A	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	H		
	SR46.1	KE												
	SR6.12 (4407)	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	J		
SR 49.1	+	+	+	+	NA	+	+	+	-	-	U	CRS	U	
08	SR 48.1	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	X		
	SR 29.05	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	K	311C, 327T	K
	SR 20.1	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	J		
	SR 22.7	KE												
	SR 13	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	U	270T	U5
	KE	KE												

Tabla VI - Serie de Son Real: Resultados de los análisis de la Región codificante y HVR1. Las filas marcadas en ROSA, señalan las muestras no efectivas, las filas AZULES identifican los controles de extracción o KE y las celdas señaladas en VERDE muestran los individuos analizados sólo con RFPLs.

Nº	INDIVIDUO	REGIÓN CODIFICANTE										REGIÓN DE CONTROL		
		H	I	J	K	T	U	V	W	PHV	X	RFLP	SECUENCIA	HVR1
		-7025	-1715	-13704	-9052	+15606	+12308	-4577	-8994	11719	14465			
		Alu I	Ddel	BstOI	Hae II	Alu I	Hinf I	Nla III	Hae III	Sma I	Acc I			
	SR34	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	U		
	SR 4402	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	U		
	SR 29.6	+	+	+	+	NA	+	+	+	-	-	U	355T	U
	KE													
	SR 43.1	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	J	CRS	J
	SR 65.8													
	SR 5303	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	H		
	KE													
10	SR 13.1													
	SR 1-67-A	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	J	CRS	J
	SR 5039													
	SR 70.1	+	+	+	+	NA	+	+	+	-	-	U	270T	U5
	SR 71.1	-	+	NA	+	-	-	+	+	-	-	H	CRS	H
	KE													
11	SR 0001	-	NA	+	+	-	-	+	+	-	-	H	CRS	H
	SR 2-67(4)													
	SR 2.3	-	NA	+	NA	-	-	+	+	-	-	H	278T	H
	SR 56.1	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	H		
	KE													
12	SR Sep 74	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	U	270T	U5
	SR Sep 74	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	U	270T	U5
	SR Sep 68	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	W	223T,292T	W
	SR Sep72	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	W	223T,292T	W

Tabla VI - Serie de Son Real: Resultados de los análisis de la Región codificante y HVR1. Las filas marcadas en ROSA, señalan las muestras no efectivas, las filas AZULES identifican los controles de extracción o KE, las celdas señaladas en VERDE, muestran los individuos analizados sólo con RFLPs y en OCRE las muestras en dos laboratorios distintos de la UAB

Nº	INDIVIDUO	REGIÓN CODIFICANTE								REGIÓN DE CONTROL		
		H	I-X	J	K	U	V	W	T	RFLP	SECUENCIA	HVR1
		-7025	-1715	-13704	-9052	+12308	-4577	-8994	+15606			
	Alu I	Ddel	Bsf0I	Hae II	Hinf I	Nla III	Hae III	Alu I				
01	IP A 1961											
	IP M-15	+	+	+	+	+	+	+	-	U	270T, 378T	U5
	IP C- N14	-	+	+	+	-	+	+	-	H	223T,262T,293G	H
	IP B-5*	+	+	+	NA	+	+	+	-	U	270T, 304C	U5
	IP B-1 1961											
	IP BC-49											
	KE											
02	IP C-24B											
	IP B 1961-1*	+	NA	+	+	+	NA	NA	-	U	270T	U5
	IP B-2	+	+	+	+	+	NA	+	-	U	257, 270T	U5
	IP C-56'	+	+	+	+	+	NA	+	-	U	261,270T	U5
	IP C-31											
	IP N-7											
	KE											
	IP BC-16*	+	NA	+	NA	+	NA	+	-	U	325C	U
	IP B-7	+	+	+	+	+	+	INH	-	U	CRS	U
	IP C-20	+	+	+	+	+	NA	NA	-	U	325C, 355C,356T	U
	IP C-50	NA	+	+	NA	-	+	-	-	W		
	IP SW 97-9	+	+	+	NA	+	+	NA	-	U,W	CRS	U
	KE											
	IP B-22	EXTRACCIÓN CONTAMINADA										
	IP C 1964-42'											
	IP C-18											
	IP 98-1											
IP C-49												
	KE											

Tabla VII - Serie de S'Illot des Porros: Resultados de los análisis de la Región codificante y HVR1. Las filas marcadas en **ROSA**, señalan las muestras no efectivas, las filas **AZULES** identifican los controles de extracción o KE y las celdas señaladas en **VERDE**, muestran los individuos analizados sólo con RFPLs.

Nº	INDIVIDUO	REGIÓN CODIFICANTE								REGIÓN DE CONTROL		
		H	I-X	J	K	U	V	W	T	RFLP	SECUENCIA	HVR1
		-7025	-1715	-13704	-9052	+12308	-4577	-8994	+15606			
		Alu I	Ddel	Bsf0I	Hae II	Hinf I	Nla III	Hae III	Alu I			
05	IP N-13											
	IP 4											
	IP B-33 1962	-	+	+	+	+	+	-		H		
	IP B-21	-	+	+	NA	+	+	-		H		
	KE											
06	IP B-33	-	+	+	+	-	+	+	-	H		
	IP B-36	-	+	+	+	-	+	+	-	H		
	IPB-1	-	+	+	INH	-	+	+	INH	H		
	IP C 1964-42'	+	+	+	+	+	+	NA	-	U	270T	U5
	IPB -23	+	+	+	+	-	-	+	-	V	223T	V
	IP C-18	-	+	+	+	NA	+	+	-	H	CRS	H
	IP 98-1	+	+	+	+	+	NA	NA	-	U	CRS	H
	IP C-49	-	NA	NA	+	-	+	+	-	H	250A, 256T	H
KE												
07	IP B-3	INH	+	NA	+	+	+	+	-	U	CRS	U
	IP SW 97-3	-	+	NA	+	-	NA	INH	-	H	378T	H
	IP N15	-	+	+	NA	-	+	+	-	H	CRS	H
	KE											
08	IP N 5b	+	+	+	NA	+	+	+	-	U	CRS	U
	IP B-22											
	KE											

Tabla VII-Serie de S'Illot des Porros: Resultados de los análisis de la Región codificante y HVR1. Las filas marcadas en ROSA, señalan las muestras no efectivas, las filas AZULES identifican los controles de extracción o KE y las celdas señaladas en VERDE muestran los individuos analizados sólo con RFPLs.

Nº	INDIVIDUO	REGIÓN CODIFICANTE								REGIÓN DE CONTROL		
		H	I-X	J	K	U	V	W	T	RFLP	SECUENCIA	HVS-I
		-7025	-1715	-13704	-9052	+12308	-4577	-8994	+15606			
	<i>Alu I</i>	<i>DdeI</i>	<i>Bst0I</i>	<i>Hae II</i>	<i>Hinf I</i>	<i>Nla III</i>	<i>Hae III</i>	<i>Alu I</i>				
	IP B-11	+	+	+	+	-	-	+	-	V		
	IP B-24	-	NA	+	+	-	+	+	-	H		
	IP B-25	-	+	+	+	-	+	+	-	H		
	IP B-31	-	+	+	+	-	+	+	-	H		
	IP C-1AA	NA	-	+	+	-	+	+	-	X		
	IP H 5a	-	+	+	+	-	+	+	-	H		

Tabla VII- Serie de S'Illot des Porros: Resultados de los análisis de la Región codificante y HVR1. Las filas marcadas en ROSA, señalan las muestras no efectivas, las filas AZULES identifican los controles de extracción o KE y las celdas señaladas en VERDE, muestran los individuos analizados sólo con RFPLs.

Nº	INDIVIDUO	REGIÓN CODIFICANTE										REGIÓN DE CONTROL		
		H	I	J	K	T	U	V	W	PHV	X	RFPL	SECUENCIA	HVR1
		- 7025	-1715	-13704	-9052	+15606	+12308	-4577	-8994	+11719	+14465			
Alu I	Ddel	BstOI	Hae II	Alu I	Hinf I	Nla III	Hae III	Sma I	Acc I					
01	CR32.1	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	H	274A	H
	CR 49.1													
	CR 33.1													
	CR 23.2	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	U		
	CR 43.3													
	KE													
02	CR 70.1	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	L1,L2,L3,M	223T	L3
	CR 23.1	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	W	223T, 292T	W
	CR 43.1	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	U	278T	U
	39-1(29)	+	NA	-	NA	-	-	-	+	-	-	J		
	CR 39-1(50)	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	T		
	KE													
03	CR 17.1	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	U	CRS	U
	CR 24.2													
	CR 46.1													
	KE													
04	CR 126.1													
	CR 131.1	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	U	256T, 270T	U5a1a
	CR 147	-	+	NA	+	-	-	+	+	-	NA	H	CRS*	H
	CR 17.2	-	+	+	+	-	INH	+	+	-	-	H	290	H
	KE													
	CR 10.1	+	+	+	+	-	+	+	+	-	NA	U		
	CR 15.2	-	+	+	NA	-	-	+	+	-	-	H		
	CR 93.1	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	H	CRS	H

Tabla VIII - Serie de Can Reiners : Resultados de los análisis de la Región codificante y HVR1. Las filas marcadas en **ROSA**, señalan las muestras no efectivas, las filas **AZULES** identifican los controles de extracción o KE y las celdas señaladas en **VERDE**, muestran los individuos analizados sólo con RFPLs.

Nº	INDIVIDUO	REGIÓN CODIFICANTE											REGIÓN DE CONTROL	
		H	I	J	K	T	U	V	W	PHV	X	RFPL	Secuencia	HVRI
		-7025	-1715	-13704	-9052	+15606	+12308	-4577	-8994	+11719	+14465			
Alu I	Ddel	Bst0I	Hae II	Alu I	Hinf I	Nla III	Hae III	Sma I	Acc I					
05	CR 93.2													
	CR 149/30													
	KE													
06	CR E-89	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	H	266T, 294T, 311C	H
	CR 16.1	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	H		
	CR 41*	-	+	+	NA	-	-	+	NA	-	NA	H	CRS	H
	CR 32.1	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	H	291T	H
	CR 30.1													
	CR 31.1	-	NA	+	+	-	-	+	NA	-	-	H	CRS	H
	KE													
07	CR 47.57	+	+	+	+	-	+	+	-	-	U	260T, 278T	U	
	CR 67.1	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	I	223T	I
	CR 83.1	NA	+	+	+	-	-	-	NA	-	-	V	261T, 298C	V
	CR 107.1	+	+	+	+	-	+	+	-	-	U	CRS	U	
	CR 123													
08	KE													
	CR Zanja III T1/ esq 3													
	CR 77.1*	-	+	NA	+	NA	-	+	+	-	-	H	CRS*	H
	CR G-9 T 155 In 1*	-	+	NA	+	-	-	+	+	-	-	H	CRS	H
	CR 163.1	+	+	+	NA	NA	-	+	-	-	-	W		
	CR 164.1	NA	+	+	+	NA	+	+	-	-	U	CRS	U	
	CR 169.1	+	+	+	-	-	+	+	+	NA	-	K,U	224T, 311C	K
CR93.2														
KE														

Tabla VIII-Serie de Can Reiners: Resultados de los análisis de la Región codificante y HVRI. Las filas marcadas en ROSA, señalan las muestras no efectivas, las filas AZULES identifican los controles de extracción o KE y las celdas señaladas en VERDE muestran los individuos analizados sólo con RFLPs..

4.2 ANÁLISIS INTRAPOBLACIONAL.

4.2.1 REGIÓN CODIFICANTE DEL mtDNA.

Como se ha señalado anteriormente, de un total de 134 muestras analizadas, 96 rindieron fragmentos amplificados, demostrando con esto que todas las muestras que resultaron efectivas pudieron ser caracterizadas por medio de RFLPs, coincidiendo con el valor obtenido en el gráfico 1. Dentro de este porcentaje el 91,6% segregaron para los haplogrupos europeos y un 8,4% que incluyó linajes asiáticos, específicamente del Cercano Oriente representados básicamente por el haplogrupo W (6,8%) y africanos, a través del haplogrupo L3 (2,2%).

La Tabla IX recopila la distribución de frecuencias absolutas y relativas de los haplogrupos mitocondriales a partir del análisis de RFPL's. De los 96 individuos que rindieron amplificación (**SR** n=37; **IP** n= 31; y **CR** n=28), se observó que los haplogrupos H (-7025 *Alu I*) y U (+12308 *Hinf I*) registraron las frecuencias más altas en las tres poblaciones en estudio (Gráfico 2). Cabe aclarar que tres de los individuos de S'Illot des Porros (IP B-5, IP Circ B 1961-1 e IP BC 16), señalados con un asterisco (*) en la tabla VII, fueron caracterizados como U, sin la exclusión explícita de otros haplogrupos, debido a la escasa eficiencia en la amplificación. La serie antigua de Son Real presenta una frecuencia relativamente baja de H si la comparamos con los valores de las otras dos series mallorquinas analizadas en esta Tesis.

En relación a la frecuencia del resto de haplogrupos, los valores porcentuales varían en las tres poblaciones, observándose que el haplogrupo J (-15609 *Bst* 01) presenta la mayor frecuencia en la población de **SR**, mientras que en **IP** no se observó representación de este cluster.

En referencia al haplogrupo W (+8994 *HaeIII*), es importante destacar que este linaje es característico de las poblaciones del Próximo Oriente. En las tres poblaciones analizadas, la representación de este cluster es baja, no obstante, su presencia podría indicar cierto flujo génico desde el Próximo Oriente. Con respecto al haplogrupo V (-4577 *Nla III*), sólo pudieron ser caracterizados dos

individuos de S'Illot des Porros y 1 individuo de Can Reiners, mientras que en Son Real, no se encontró representación para este cluster.

	SR		IP		CR	
	n=37		n=31		n=28	
	Abs	%	Abs	%	Abs	%
H	9	0,243	14	0,452	12	0,429
U	10	0,270	13	0,420	8	0,286
V	0	0,000	2	0,065	1	0,036
W	2	0,054	1	0,032	2	0,071
X	3	0,081	1	0,032	0	0,000
J	8	0,216	0	0,000	1	0,036
K	3	0,081	0	0,000	1	0,036
T	1	0,027	0	0,000	1	0,036
PHV	1	0,027	0	0,000	0	0,000
I	0	0,000	0	0,000	1	0,036
L1,L2,L3,M	0	0,000	0	0,000	1	0,036

Tabla IX - Distribución de frecuencias absolutas y relativas de los haplogrupos mitocondriales de las poblaciones analizadas en este estudio.

Los haplogrupos T, I, PHV y L3, presentan el más bajo porcentaje, observándose que sólo un individuo de Son Real (0,027%) pertenece al haplogrupo PHV, mientras que en la población de Can Reiners se encuentran, aunque en baja frecuencia, el haplogrupo I (0,035%) y el conformado por L1,L2,L3,M (este último caso se detalla más adelante), situación similar con respecto al haplogrupo T, donde se observa sólo 1 individuo de Son Real y 1 de Can Reiners.

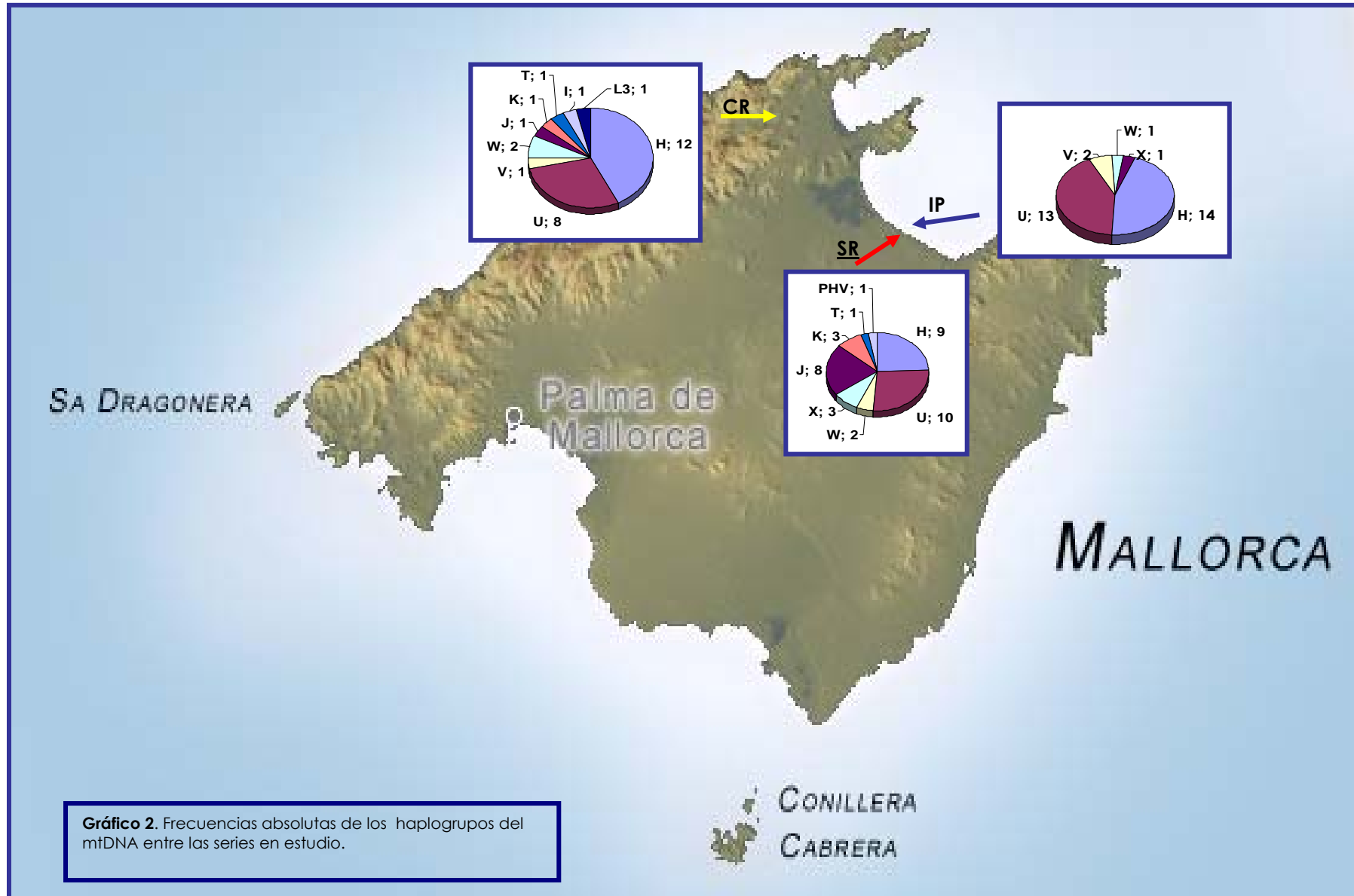


Gráfico 2. Frecuencias absolutas de los haplogrupos del mtDNA entre las series en estudio.

4.2.2 REGIÓN CONTROL Ó HVS-I DEL mtDNA.

De un total de 96 muestras efectivas, se logró obtener 66 secuencias distribuidas por población de la siguiente manera:

Población	Nº de secuencias
Son Real	25
S'Illot des Porros	20
Can Reiners	21

Las 66 secuencias obtenidas, se distribuyen de la siguiente manera de acuerdo al tamaño del fragmento (fig. 37)

- 40 Secuencias de 190 pb, de las cuales 16 fueron construidas a partir de dos fragmentos solapantes, de 111 pb y 87 pb.
- 8 Secuencias de 126 pb
- 18 secuencias de distintas longitudes (3 secuencias de 111pb, 6 secuencias de 87pb y 9 secuencias de menos de 87 pb)

En los datos de secuenciación de la mayoría de fragmentos pequeños, no se observaron diferencias con respecto a la secuencia de Referencia de Cambridge (CRS) (Anderson *et al.*, 1981), lo que no permitió realizar la inferencia del haplogrupo. Sin embargo, 5 de las 18 secuencias de distintas longitudes, presentaron al menos una mutación diagnóstica correspondiente al haplogrupo para el cual segregó el individuo.

Estos individuos fueron:

- SR/29.6: mostró la mutación 16355T habiendo segregado para el haplogrupo U
- IP/IP B1961-1: presentó la mutación 16270T segregando para el haplogrupo U5.
- IP B-23: presentó la mutación 16223T, segregando para el haplogrupo V
- IP C-49: presentó dos cambios nucleotídicos: 16250A y 16256T, resultando H por RFLP.

- CR/43.1: segregó para el haplogrupo U y su secuencia mostró la mutación 16278T.

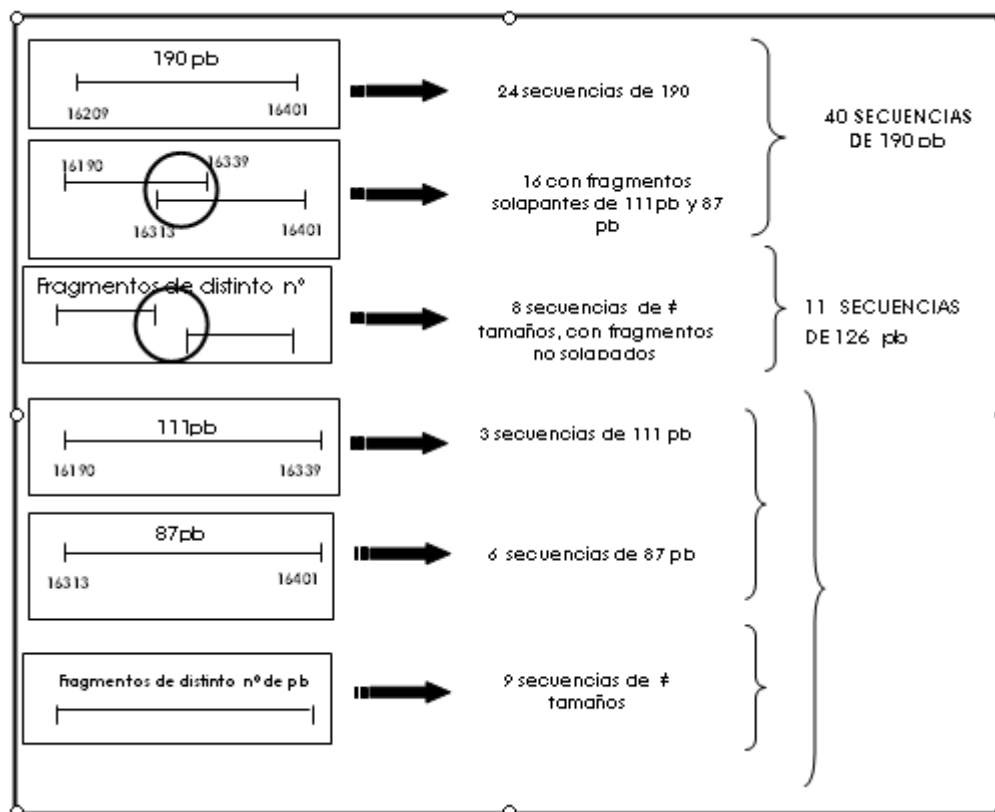


Fig. 37- Tamaño de los fragmentos de secuencia de HVS-I mtDNA, obtenidas en el presente estudio

De las 66 secuencias obtenidas, 48 (37 con el fragmento de 156 pb y 11 con el fragmento de 126 pb), fueron utilizadas para el análisis de comparación. En relación a la distribución de las secuencias entre los individuos de cada una de las tres series, tenemos lo siguiente:

Población de Son Real (22 secuencias):

- ⇒ 6 individuos mostraron la secuencia de referencia (CRS).
- ⇒ 3 individuos comparten la mutación 16270T.
- ⇒ 2 individuos comparten la mutación 16278T
- ⇒ 2 individuos presentaron las mutaciones 16224T y 16311C
- ⇒ 2 individuos presentan en su secuencia las mutaciones 16223T-16292T.

⇒ **7 individuos no comparten haplotipos.**

Total de haplotipos: 12 (5 compartidos y 7 únicos).

S'Illot des Porros (11 secuencias):

⇒ 2 individuos comparten el motivo CRS.

⇒ **9 individuos no comparten haplotipos.**

Total de haplotipos: 10 (1 compartido y 9 únicos).

Can Reiners (15 secuencias):

⇒ 4 individuos que presentaron la secuencia de referencia (CRS).

⇒ 2 presentan en su secuencia el motivo 16223T.

⇒ **9 individuos no comparten haplotipos.**

Total de haplotipos: 11 (2 compartidos y 9 únicos).

En las 48 secuencias obtenidas entre las tres poblaciones analizadas, se han encontrado 29 haplotipos y sólo 4 están compartidos entre ellas, como se muestra en la tabla X:

Motivo	Poblaciones		
	Son Real	S'Illot des Porros	Can Reiners
	Nº/S=22	Nº/S=11	Nº/S=15
CRS	6 ind	2 ind	4 ind
16270T	3 ind	1 ind	-
16224C-16311C	2 ind	-	1 ind
16223T-16292T	2 ind	-	1 ind

Tabla X: Haplotipos compartidos entre las tres series antiguas analizadas.

En las tablas XI, XII y XIII, se presentan las secuencias de las tres poblaciones analizadas tomando como base la secuencia de referencia (CRS) de Anderson y colaboradores (1981).

4.2.3 ANÁLISIS DE CORRESPONDENCIA RFLPs / HVS-I.

La relación entre los polimorfismos de la región control y la región codificante del mtDNA es útil para una mejor caracterización genética de los individuos de una población, y también para el proceso de autenticación del aDNA. En todos los casos analizados la relación entre ambos análisis resultó clara, no habiéndose encontrado ninguna discrepancia entre ellos.

Como casos especiales cabe destacar la muestra CR/70.1, que no segregó para ninguno de los haplogrupos europeos, fue sometida al análisis de restricción para la posición polimórfica 10871 *Mnl* I, que permite discriminar entre haplogrupos europeos y los no-europeos L1, L2, L3 ó M, si el patrón de corte es positivo o negativo, respectivamente. La restricción enzimática para esta posición (10871 *Mnl* I) mostró un patrón de corte negativo, hecho que hace presumir que el individuo tiene un posible linaje africano (L1, L2, L3 ó M), dado el contexto geográfico e histórico que se analiza.

Por otra parte, la secuencia HVS1 de este individuo mostró la mutación 16223T, que es una posición polimórfica compartida por varios haplogrupos (posible hotspot), entre ellos L, N, M, I ó W. Randon y colaboradores (1998) y Richards y col. (2000), clasificaron secuencias con las mutaciones 16223T y 1618A-16223T, respectivamente, como L3, por lo que es posible que este individuo pertenezca a este linaje. Sin embargo, en el fragmento analizado no fue posible observar la posición 16180, por lo que sería necesario aumentar el tamaño del fragmento para obtener un resultado concluyente para este individuo.

Otro caso a destacar es el de la muestra perteneciente al individuo SR/75.1, que presentó los polimorfismos *Hae* II -9052 y *Hinf* I +12308, correspondientes a los haplogrupos K y U, respectivamente. En tanto que la secuencia HVS1 mostró la mutación 16224C, típica del subhaplogrupo K. Por este motivo, este individuo fue caracterizado como K. La tabla XIV, muestra los resultados del análisis de correspondencia entre los HVS-I y RFLP's, de las tres poblaciones antiguas analizadas en este estudio.

Individuo	RFLPs	Motivo	Correspondencia RFLPs/HVS-I
SR54.2	H	CRS	H
SR0001	H	CRS	H
SR1-67-A(1)	H	16221T	H
SR22.D	H	16291T, 16293G	H
SR2.3	H	16278T	H
SR1-67-A(5)	PHV	CRS	PHV
SR3-67-A	J	CRS	J
SR43.1 (R15)	J	CRS	J
SR1-67-A	J	CRS	J
SR1-67-A(2)	J	16278T	J
SR43.5	J	16242T	J
SR75.1	U/K	16224C, 16311C	K
SR53.4	K	16224C, 16311C	K
SR29.05	K	16311C, 16327T	K
SR47.3	T	16292T, 16294T, 16344T	T
SR54.1.	U	16270T, 16290T, 16292T, 16294T	U5
SR13	U	16270T	U5
SR70.1	U	16270T	U5
SRSep-74	U	16270T	U5
SRsep-72	W	16223T, 16292T	W
SRsep-68	W	16223T, 16292T	W
SR4-67(2)	X	16223T, 16278T	X
<hr/>			
IPB-33 1962	H	CRS	H
IP SW-97-3	H	16378T	H
IP CN-14	H	16223T, 16262T, 16293G	H
IP B-7	U	CRS	U
IP BC-16	U	16325C	U
IP C-20	U	16325C, 16355T, 16356C	U
IP B-2	U	16257Y(A6T); 16270T	U5
IP B-5	U	16270T, 16304C	U5
IP C 1964-42'	U	16270T	U5
IP C-56'	U	16261C, 16270T	U5
IP M-15	U	16270T, 16378T	U5
<hr/>			
CR93.1	H	CRS	H
CR31.1	H	CRS	H
CR32.1	H	16274T	H
CR17.2	H	16290T	H
CRE-89	H	16266T, 16294T, 16311C	H
CR32	H	16291T	H
CR67.1	I	16223T	I
CR169.1	K	16224C 16311C	K
CR70.1	L	16223T	L3
CR17.1	U	CRS	U
CR107.1	U	CRS	U
CR47.57	U	16260T, 16278T	U
CR131.1	U	16256, 16270T	U5a1a
CR83.1	V	16261T 16298T	V
CR23.1	W	16223C, 16292T	W

Tabla XIV. . Análisis de correspondencia entre los HVS-I y RFLP's.

4.3 CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DEL INVESTIGADOR.

La autora de esta tesis, presenta cambios nucleotídicos en las posiciones 16223T, 16325C y 16362C de su secuencia que caracterizan al haplogrupo americano D. Este haplogrupo no presenta afinidad alguna con ninguno de los haplogrupos obtenidos por RFLP en este estudio.

4.4 ANÁLISIS INTERPOBLACIONAL.

Con el propósito de conocer las afinidades genéticas entre las poblaciones objeto de este estudio y también con las poblaciones del entorno mediterráneo, se realizó un estudio interpoblacional mediante el análisis de la región codificante así como la región de control del mtDNA. Las poblaciones antiguas y contemporáneas utilizadas se encuentran detalladas en la tabla V y en la fig. 28 del apartado 3.7 de Muestra y Metodología.

4.4.1 REGIÓN CODIFICANTE DEL mtDNA.

4.4.1.1 FRECUENCIAS DE HAPLOGRUPOS EN POBLACIONES ANTIGUAS.

En la Península Ibérica han sido muy pocas las poblaciones antiguas analizadas desde el punto de vista paleogenético, por lo que no ha sido posible disponer de una amplia representación geográfica y temporal de las poblaciones incluidas en los análisis comparativos de este estudio que se muestran en la tabla V, fig. 28.

Cinco poblaciones de relevancia histórica fueron excluidas del estudio estadístico, debido a que en los trabajos originales los haplogrupos se presentaban agrupados, lo cual dificultaba la comparación directa con las demás muestras. Tal es el caso de la serie de Mas d'en Boixos (García *et al.*, 2005) perteneciente al período del Bronce Catalán, la cual presenta dentro de un sólo conjunto, los haplogrupos IJK, y la de las series Neolíticas del País Vasco tales de Longar, Pico Ramos y San Juan de Ante Portan Latinam (Izagirre 1998), en los que se agrupan los haplogrupos T y X. De aplicarse estas agrupaciones entre las poblaciones estudiadas y las empleadas para la comparación, se perdería información relevante.

El rango del Índice de Diversidad genética de las series antiguas usadas en este trabajo (tabla XV), oscila entre 0.8824 de la serie antigua del Próximo Oriente y 0.1700 de la serie de Cerdeña antigua. Se observa además, la proximidad entre las poblaciones de **SR** y Próximo Oriente Antiguo, mientras que **CR** se encuentra flanqueada por las series poblacionales del país Vasco. De las tres poblaciones en estudio, **IP** es la que muestra una menor diversidad de haplogrupos, cercana a la serie del Pre Románico ibérico. El valor que presenta la serie Neolítica de Mas d'en Boixos (0.3846), puede deberse a situaciones particulares, como endogamia o bajo tamaño muestral (García, 2002), ya que 10 de las 13 muestra, pertenecen a un enterramiento colectivo de la Edad del Bronce.

Poblaciones	n	
Próximo Oriente antiguo	18	0.8824 +/- 0.0469
Son Real	37	0.8574 +/- 0.0282
Plaça Vella	23	0.8340 +/- 0.0517
Picos Ramos	24	0.7935 +/- 0.0494
Can Reiners	28	0.7672 +/- 0.0653
San Juan de Ante Portan Latinam	61	0.7557 +/- 0.0276
Longar	25	0.7267 +/- 0.0558
S'Illot des Porros	31	0.7247 +/- 0.0565
Pre Románico Ibérico	17	0.7206 +/- 0.1113
Aldaieta	56	0.6091 +/- 0.0692
Mas d'en Boixos	13	0.3846 +/- 0.1321
Cerdeña antigua	23	0.1700 +/- 0.1025

Tabla XV. Resultados del Índice de Diversidad genética, de las series antiguas usadas en este trabajo.

4.4.1.2 FRECUENCIAS DE HAPLOGRUPOS EN POBLACIONES ANTIGUAS Y CONTEMPORÁNEAS.

La distribución de frecuencias de haplogrupos de las poblaciones analizadas en la presente tesis y las observadas en diversas poblaciones de Europa, África y Asia (Cercano Oriente) tanto antiguas como actuales, empleadas para la comparación, se expresa en la tabla XVI.

En todas las series antiguas y poblaciones contemporáneas analizadas, se halla representado el **Haplogrupo H**. Los valores alcanzados en las poblaciones de este estudio (**SR**=0.243, **IP**=0.452 y **CR**=0.429), se ubican por debajo de la frecuencia presentada por las poblaciones antiguas y contemporáneas de la Península Ibérica, y en particular la de Cerdeña Antigua (0.913), seguida de las del País Vasco (AD=0.607 y VAS=0.672), Pre-Románica Ibérica (0.529) y Valencia (0.513). No obstante, las series de **IP** y **CR** alcanzaron una frecuencia aproximada a la que se obtuvo en las Islas de Cerdeña (0.4780) y Córcega (0.4530).

Se destaca así mismo, que la menor frecuencia de este haplogrupo, se observó entre las serie antigua del Próximo Oriente (0.167) y en la población contemporánea de Egipto (0.107). En la figura 38 se muestra la distribución de frecuencia del haplogrupo H entre poblaciones de la Península Ibérica, Baleares y algunos países del Norte de África y Europa, donde se observa la baja frecuencia de este haplogrupo en el litoral mediterráneo incluidas las series antiguas analizadas en este estudio, con la única excepción de las poblaciones antigua y actual de la isla de Cerdeña.

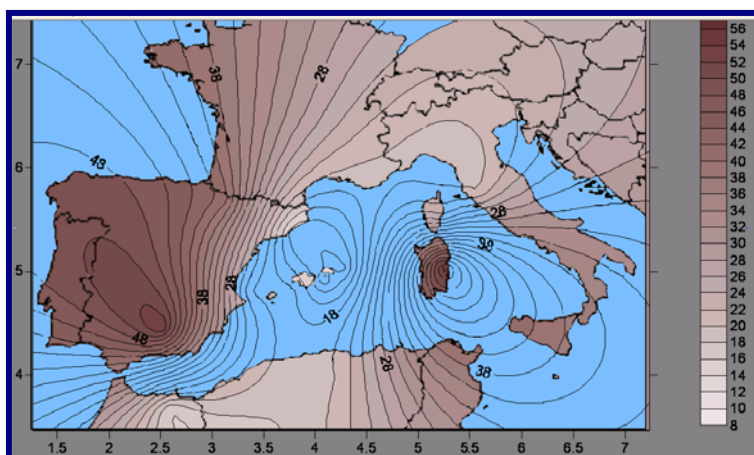


Fig. 38 Distribución de la frecuencia del haplogrupo H entre poblaciones de la Península Ibérica, Baleares y algunos países del Norte de África y Europa.

En lo que respecta al **haplogrupo PHV**, cabe señalar que la representación fue muy baja en la mayoría de las poblaciones empleadas para la comparación, destacando su ausencia en los países aquí representados, tanto de la Península Balcánica como del Norte de África. Las mayores frecuencias para el haplogrupo PHV, las presentan la serie de Chuetas (0.250) y la serie antigua del Pre-Románico Ibérico (0.059). Las poblaciones de Siria e Irak, presentaron una frecuencia similar (0.058). Entre las poblaciones analizadas en este estudio, sólo la serie talayótica de **SR** presentó este haplogrupo, aunque en baja frecuencia (0.027).

El **haplogrupo U**, es casi específico para Europa, poblaciones Beréberes del Norte de África, Etiopía y Senegal (Ozawa, 1995; Passarino *et al.*, 1998 y Macaulay *et al.*, 1999). Entre las poblaciones analizadas en este estudio, **CR** presenta la más alta frecuencia (0.250) seguida de **IP** (0.226). Sin embargo, la mayor frecuencia la registran las poblaciones de Argelia (0.420) y de Turquía (0.373). Por el contrario, la población contemporánea del País Vasco, presenta la menor frecuencia (0.016). Cabe destacar que en las poblaciones actuales de las Islas de Mallorca e Ibiza, este haplogrupo no tuvo representación.

El **subhaplogrupo U5**, el más antiguo de los haplogrupos (Richards *et al.*, 1996), presentó la mayor frecuencia en la población talayótica de **IP** (0,194) seguida de Cerdeña y Mallorca (ambas 0.122); no obstante, las poblaciones de **SR** y Francia contemporánea, presentan un porcentaje muy cercano a los anteriores. Sin embargo, este subhaplogrupo no tuvo representación en las poblaciones antiguas de la Península ibérica así como en las poblaciones de la Península de los Balcanes, Cercano Oriente (Siria y Próximo Oriente Antiguo) y Norte de África (Argelia y Egipto). En este subhaplogrupo se incluye un individuo de la serie tardorromana de **CR**, cuya secuencia exhibió las mutaciones 16256T y 16270T que se corresponden con el subcluster U5a1a. Este linaje ubicado dentro del haplogrupo U5, y considerado un haplogrupo de influencia neolítica (Richards *et al.*, 2000), surgió en Europa hace menos de 20.000 años (Richards *et al.*, 1998; Richards *et al.*, 2000; Dubut *et al.*, 2004), y se encuentra principalmente en el noroeste y centro-norte del continente europeo. Por su distribución se cree que este linaje se encontraba entre los pobladores que habían seguido la retirada de

los hielos de Europa (http://dna-society.blogspot/2008/05/caggegi-raciti-azzolina-dna-randazzo_4646.html).

Por su parte, el **subhaplogrupo K**, estuvo representado en la mayoría de las poblaciones de comparación, pero ausente en la serie talayótica de **IP**. La mayor frecuencia la registró la serie del Próximo Oriente (0.278), seguida de otra serie antigua, Plaça Vella (0.174).

En relación al **haplogrupo J** es preciso señalar que tuvo representación en casi todas las poblaciones que se han utilizado para la comparación. Entre las series analizadas, sólo está ausente en la población de **IP**. La frecuencia reportada en la población de **SR** (0.216) es la más alta y muy cercana a la presentada por la población actual de Irak (0.212). La región de la Toscana (0.149) y Menorca (0.146), seguida de la serie antigua de Aldaieta (0.143), mantienen un valor intermedio, mientras que la menor frecuencia se registró en la serie de **CR** (0.035).

Una situación muy similar se presentó con respecto al **haplogrupo T**, que se encontró representado en cada una de las regiones geográficas del arco Mediterráneo aquí representadas, llamando la atención que sólo en dos poblaciones antiguas, **IP** y Próximo Oriente Antiguo, no hubo representación de este linaje. La mayor frecuencia la presentaron las poblaciones actuales de las Islas Baleares (Ibiza=0.265 y Mallorca=0.171), seguida de la reportada por las poblaciones de Croacia (0.160) y Menorca (0.146).

Uno de los haplogrupos menos frecuentes en Europa es el **W** (Torrioni *et al.*, 1996; Richards *et al.*, 2000; Maca-Meyer *et al.*, 2001; Metspalu *et al.*, 2004). En nuestro estudio sólo se encuentra representado en 18 de las 30 poblaciones empleadas para la comparación. No obstante, la población alto-medieval de **CR** presenta la mayor frecuencia (0.071), hallándose ligeramente por encima de la observada en la serie talayótica de **SR** (0.054) y la contemporánea de Cataluña (0.051). Cerdeña actual registró la menor frecuencia (0.008), mientras que las poblaciones del Norte de África no tienen representación de este haplogrupo.

En lo que respecta al **haplogrupo V**, la frecuencia es en general baja en todas las poblaciones comparadas. Sin embargo, la población de Cataluña actual (0.154) y la antigua de Plaça Vella (0.130), presentaron los porcentajes más altos. En las Islas Baleares, donde se incluyen las poblaciones antiguas analizadas en este estudio y las actuales de Mallorca, Chuetas, Menorca e Ibiza, sólo estuvo ausente en la población Talayótica de **SR**. Cabe señalar que entre los países del este Mediterráneo aquí representados, la frecuencia fue muy baja, teniendo sólo representación en países como Siria (0.029) y Grecia (0.064), mientras que en la Península Ibérica y en el Norte de África, fue mucho más representativo (ausente sólo en la población del Pre-Románico Ibérico).

El **Haplogrupo X** se presentó en baja frecuencia en la mayoría de las poblaciones. La frecuencia en la serie talayótica de **SR** (0.081) es ligeramente menor de la que presentan las poblaciones de la isla de Córcega (0.094) y de Toscana (0.085). Entre los países del Norte de África, este haplogrupo está ausente, mientras que entre las poblaciones de la Península Balcánica, Grecia presentó un bajo porcentaje (0.018).

En relación al **haplogrupo I**, la frecuencia entre las poblaciones fue igualmente baja, incluso entre las poblaciones estudiadas, donde sólo en la serie de **CR**, hubo representación (0.035), aunque ligeramente baja en comparación con la presentada en la población contemporánea de la Toscana (0.042) y en la serie antigua de Plaça Vella (0.435). La representación de este linaje es baja entre las poblaciones antiguas y contemporáneas de la Península Ibérica, Archipiélago Balear así como en los países del Cercano Oriente.

Poblaciones	n	HAPLOGRUPOS																					Referencias		
		H	J	K	T	U	U5	X	W	PHV	V	I	R	Prev	HV	L	L1	L2	L3	M	N	A		C	F
Son Real (SR)	37	0,243	0,216	0,081	0,027	0,162	0,108	0,081	0,054	0,027	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	Presente estudio
S'illot des Porros (IP)	31	0,452	0,000	0,000	0,000	0,226	0,194	0,032	0,032	0,000	0,065	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	Presente estudio
Can Reiners (CR)	28	0,429	0,036	0,036	0,036	0,250	0,036	0,000	0,071	0,000	0,036	0,036	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,036	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	Presente estudio
Plaça Vella (PV)	23	0,348	0,130	0,174	0,087	0,087	0,000	0,000	0,000	0,000	0,130	0,044	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	Montiel, 2001
Pre Románico Ibérico (PRM)	17	0,529	0,118	0,059	0,059	0,176	0,000	0,000	0,000	0,059	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	Samprieto et al., 2004
Próximo Oriente Ant. (PO)	18	0,167	0,056	0,278	0,000	0,111	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,056	0,278	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,056	0,000	Fernández Domínguez, 2005
Aldaieta (AD)	56	0,607	0,143	0,018	0,054	0,125	0,000	0,000	0,000	0,000	0,018	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,036	0,000	0,000	0,000	0,000	Alzuade et al., 2005
Cerdeña Ant. (CE)	21	0,913	0,043	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,043	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	Caramelli et al., 2007
Cataluña (CA)	39	0,308	0,051	0,077	0,154	0,077	0,051	0,051	0,051	0,000	0,154	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,026	0,000	0,000	0,000	0,000	Montiel, 2001
País Vasco (VAS)	61	0,672	0,016	0,082	0,066	0,016	0,066	0,000	0,000	0,000	0,082	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	Corte-Real et al., 1996
Pedroche (PE)	144	0,375	0,069	0,146	0,063	0,069	0,097	0,028	0,000	0,021	0,063	0,014	0,000	0,028	0,014	0,000	0,000	0,000	0,000	0,007	0,007	0,000	0,000	0,000	Fernández Rosas, 2005
Valencia (VL)	39	0,513	0,103	0,026	0,128	0,051	0,077	0,000	0,000	0,000	0,051	0,000	0,000	0,000	0,026	0,000	0,000	0,026	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	Picomell et al., 2005
Mallorca (MJ)	41	0,341	0,098	0,122	0,171	0,000	0,122	0,000	0,000	0,000	0,122	0,024	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	Picomell et al., 2005
Chuetas (CH)	44	0,205	0,023	0,136	0,114	0,046	0,068	0,023	0,000	0,250	0,046	0,023	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,023	0,046	0,000	0,000	0,000	0,000	Picomell et al., 2005
Menorca (MN)	41	0,268	0,146	0,171	0,146	0,049	0,049	0,024	0,049	0,000	0,024	0,024	0,049	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	Picomell et al., 2005
Ibiza (IBZ)	49	0,388	0,041	0,061	0,265	0,000	0,061	0,000	0,000	0,000	0,122	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,061	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	Picomell et al., 2005

Tabla XVI. Comparación de las frecuencias relativas de los haplogrupos obtenidos entre las series antiguas de S'illot des Porros, Son Real y Can Reiners con poblaciones antiguas y actuales de la Península Ibérica, Europa, Norte de África y Asia (Cercano Oriente). Se destacan los valores más altos de cada haplogrupo.

Poblaciones	n	HAPLOGRUPOS																							Referencias
		H	J	K	T	U	U5	X	W	PHV	V	I	R	Prev	HV	L	L1	L2	L3	M	N	A	C	F	
Marruecos (MR)	45	0,356	0,111	0,022	0,022	0,089	0,067	0,000	0,000	0,000	0,111	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,111	0,111	0,000	0,000	0,000	0,000	Brakez et al., 2001
Argelia (AR)	81	0,235	0,037	0,000	0,049	0,420	0,000	0,000	0,000	0,000	0,086	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,099	0,025	0,049	0,000	0,000	0,000	Corte-Real et al., 1996
Túnez (TZ)	154	0,234	0,039	0,065	0,143	0,091	0,006	0,000	0,000	0,000	0,052	0,026	0,000	0,000	0,058	0,000	0,039	0,065	0,110	0,039	0,033	0,000	0,000	0,000	Fadhlaoui et al., 2004
Egipto (EG)	28	0,107	0,071	0,000	0,071	0,071	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,071	0,000	0,000	0,000	0,000	0,143	0,036	0,143	0,214	0,071	0,000	0,000	0,000	Stevanovitch et al., 2003
Cerdeña actual (SD)	115	0,478	0,061	0,052	0,113	0,035	0,122	0,009	0,009	0,000	0,052	0,009	0,000	0,000	0,026	0,000	0,009	0,009	0,000	0,009	0,009	0,000	0,000	0,000	Richards et al. 2000
Toscana (TS)	47	0,426	0,149	0,064	0,106	0,106	0,000	0,085	0,021	0,000	0,000	0,043	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	Torroni et al., 1996
Córcega (CS)	53	0,453	0,113	0,132	0,094	0,113	0,000	0,094	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	Morelli et al., 2000
Francia (FR)	71	0,380	0,056	0,099	0,099	0,042	0,113	0,000	0,028	0,014	0,085	0,014	0,000	0,000	0,028	0,000	0,000	0,000	0,014	0,028	0,000	0,000	0,000	0,000	Richards et al., 2000
Croacia (CT)	108	0,278	0,093	0,037	0,139	0,204	0,000	0,019	0,019	0,000	0,065	0,019	0,000	0,000	0,046	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,083	Tolk et al., 2001
Albania (AB)	42	0,500	0,048	0,000	0,071	0,190	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,071	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,119	0,000	0,000	0,000	Bosch et al., 2006
Grecia (GR)	25	0,480	0,080	0,000	0,160	0,040	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,080	0,160	0,000	0,000	0,000	0,000	Bosch et al., 2006
Turquía (TK)	75	0,320	0,080	0,053	0,013	0,373	0,027	0,000	0,013	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,013	0,000	0,000	0,000	0,000	0,107	0,000	0,000	0,000	0,000	Mengel et al., 2004
Siría (Sy)	69	0,275	0,101	0,044	0,101	0,188	0,000	0,000	0,029	0,058	0,029	0,000	0,015	0,000	0,015	0,000	0,029	0,029	0,044	0,015	0,015	0,015	0,000	0,000	Richards et al., 2000
Israel (pl)	116	0,310	0,095	0,069	0,129	0,086	0,009	0,035	0,026	0,026	0,000	0,000	0,009	0,000	0,017	0,000	0,009	0,043	0,095	0,017	0,026	0,000	0,000	0,000	Richards et al., 2000 & Di Rienzo and Wilson, 1991
Irak (IQ)	52	0,173	0,212	0,077	0,096	0,212	0,000	0,000	0,000	0,058	0,000	0,000	0,039	0,000	0,115	0,000	0,000	0,000	0,000	0,019	0,000	0,000	0,000	0,000	Al-Zahery et al., 2003

Tabla XVI. Comparación de la frecuencia relativa de los haplogrupos obtenidos entre las series antiguas de S'Illot des Porros, Son Real y Can Reiners con poblaciones antiguas y actuales de la Península Ibérica, Europa, Norte de África y Asia (Cercano Oriente). Se destacan en negrita los valores más altos de cada haplogrupo.

Como es de esperar, las mayores frecuencias del conjunto de **haplogrupos L1,L2, L3 ó M**, se presenta en los países del Norte de África; sin embargo, es importante resaltar que en la población antigua de **CR**, un individuo segregó para este grupo, dando como porcentaje 0.037, mayor del que presentaron las poblaciones de Chuetas (0.022) y de Francia (0.014), pero bajo si se compara con el obtenido para las poblaciones de Israel (0.094) y de Siria (0.0435).

4.4.1.3 FRECUENCIAS DE HAPLOGRUPOS EN POBLACIONES ANTIGUAS Y CONTEMPORÁNEAS DEL ARCHIPIÉLAGO BALEAR.

Como complemento a este análisis, se realizó un estudio de distribución de frecuencias de haplogrupos exclusivamente entre poblaciones del Archipiélago Balear tanto antiguas como actuales, empleando el programa *Surfer* (Fig. 39), con el cual se mostró mediante mapas, la distribución de los haplogrupos más representativos entre estas poblaciones. La media porcentual para el haplogrupo H entre las series antiguas de **SR**, **IP** y **CR** fue mayor (0,374) a la de obtenida entre las poblaciones contemporáneas de este archipiélago (0,300). En el mapa generado por el programa *Surfer* se observó claramente un gradiente Oeste-Este, ya que las mayores frecuencias para este haplogrupo se encontraron en la población de Ibiza.

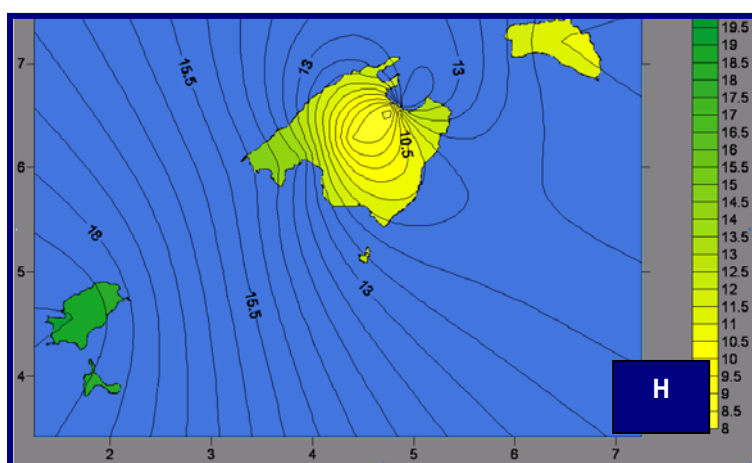


Fig. 39. Distribución de la frecuencia del haplogrupo H entre las poblaciones antiguas y contemporáneas de las Islas Baleares.

Con respecto al **haplogrupo U**, el mapa (Fig. 40) muestra que, en el Archipiélago, las mayores frecuencias, se concentran al norte de la Isla de Mallorca específicamente en la Bahía de Alcudía, en las tres poblaciones antiguas

estudiadas, que registraron una media de 0.221 muy superior a la de las poblaciones actuales de las Islas Baleares (0.023).

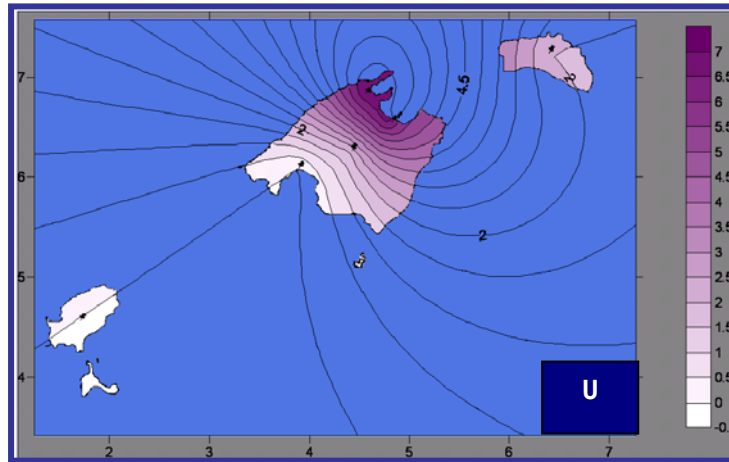


Fig. 40. Distribución de la frecuencia de los haplogrupos U y U5 entre las poblaciones antiguas y contemporáneas de las Islas Baleares.

La frecuencia del **subhaplogrupo U5** (Fig. 41) entre las poblaciones antiguas estudiadas (0.103) es superior a la observada entre las poblaciones actuales (0.075). El mapa muestra una concentración de frecuencias de haplogrupos hacia el sureste de la Isla de Mallorca, que abarca las poblaciones de Son Real y de S'illot des Porros.

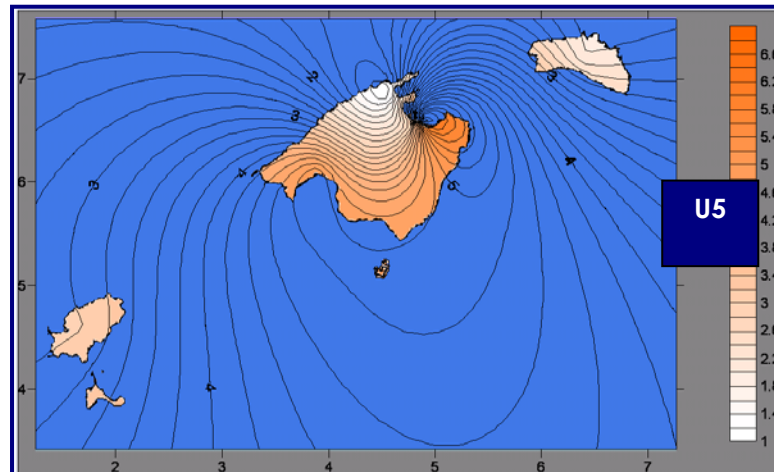
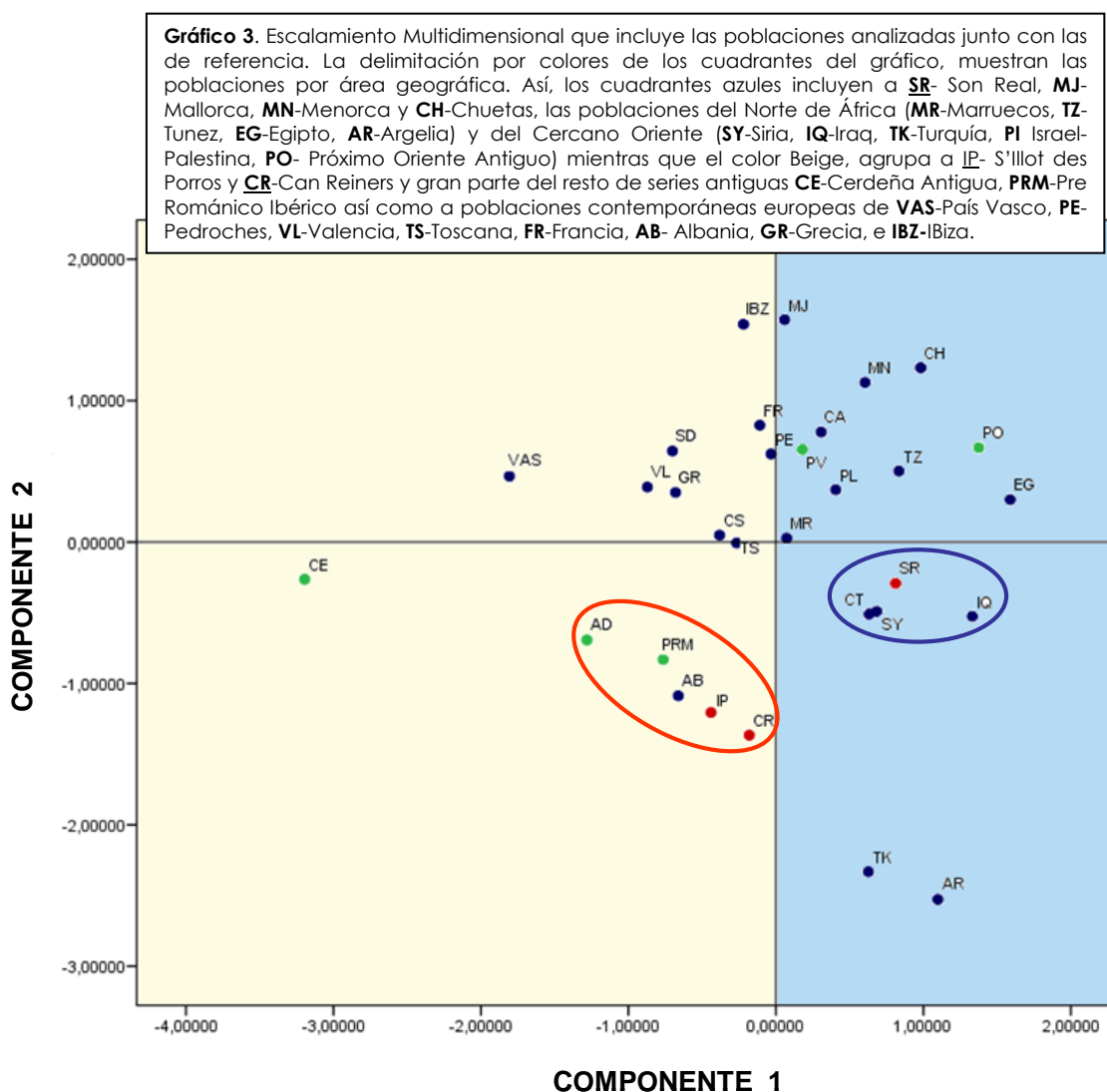


Fig. 41 Distribución de la frecuencia de los haplogrupos U y U5 entre las poblaciones antiguas y contemporáneas de las Islas Baleares.

4.4.1.4 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES.

A partir de las frecuencias relativas de haplogrupos, se realizó un análisis factorial de componentes principales, considerada una herramienta para el análisis de datos genéticos (Reich *et al.*, 2008), particularmente en los estudios de migraciones humanas y en este estudio específicamente para evaluar la relación entre las poblaciones objeto de este estudio y otras poblaciones mediterráneas antiguas y modernas. Los dos primeros componentes explican el 62,75% de la variabilidad encontrada (gráfico 3). Si se realiza la proyección sobre el primer eje, cuya variabilidad explica el 44,91%, se observa que las poblaciones de **IP** y de **CR** (circulo rojo) se encuentran en el lado negativo donde se ubican la mayoría de poblaciones europeas, incluyendo Ibiza, mientras que **SR** se relaciona sobre este eje con las poblaciones de Mallorca, Menorca, Norte de África y del Cercano Oriente (mitad positiva).



Por otro lado, sobre este mismo componente, la serie antigua de Cerdeña (**CE**), perteneciente a la cultura Nurágica se encuentra más alejada del resto de poblaciones de comparación.

En relación a la proyección de las poblaciones de **SR**, **CR** e **IP** sobre el segundo componente, que explica el 18%, las tres poblaciones analizadas quedan situadas en el lado negativo, próximas también a las poblaciones antiguas de comparación, a excepción de Plaça Vella. Se destaca la distancia entre las series antiguas y las poblaciones modernas de las Islas Baleares, siendo la serie talayótica de **SR** la que presenta una menor distancia. Sobre este mismo componente, se observa la cercanía de la serie de Cerdeña antigua a la serie de **SR** y por otra parte, la proximidad de las series Aldaieta y Pre Románico Ibérico a las series mallorquinas de **IP** y **CR**.

En el gráfico 4 se observa que la presencia de los haplogrupos H y N (círculo azul) en el cuadrante inferior derecho agrupa a dos de las poblaciones de este estudio (**IP** y **CR**) junto a Albania, Aldaieta y la serie del Pre románico-Ibérico, mientras que en el cuadrante inferior derecho se reúnen las poblaciones de **SR** con las poblaciones del Cercano Oriente de Siria e Irak junto a Croacia, por la influencia de los haplogrupos HV, J, U, W, L2, F y A (círculo naranja).

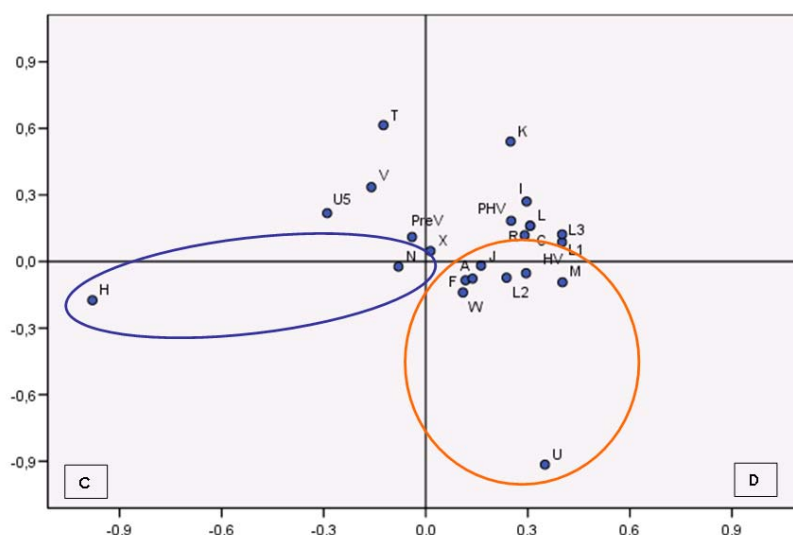
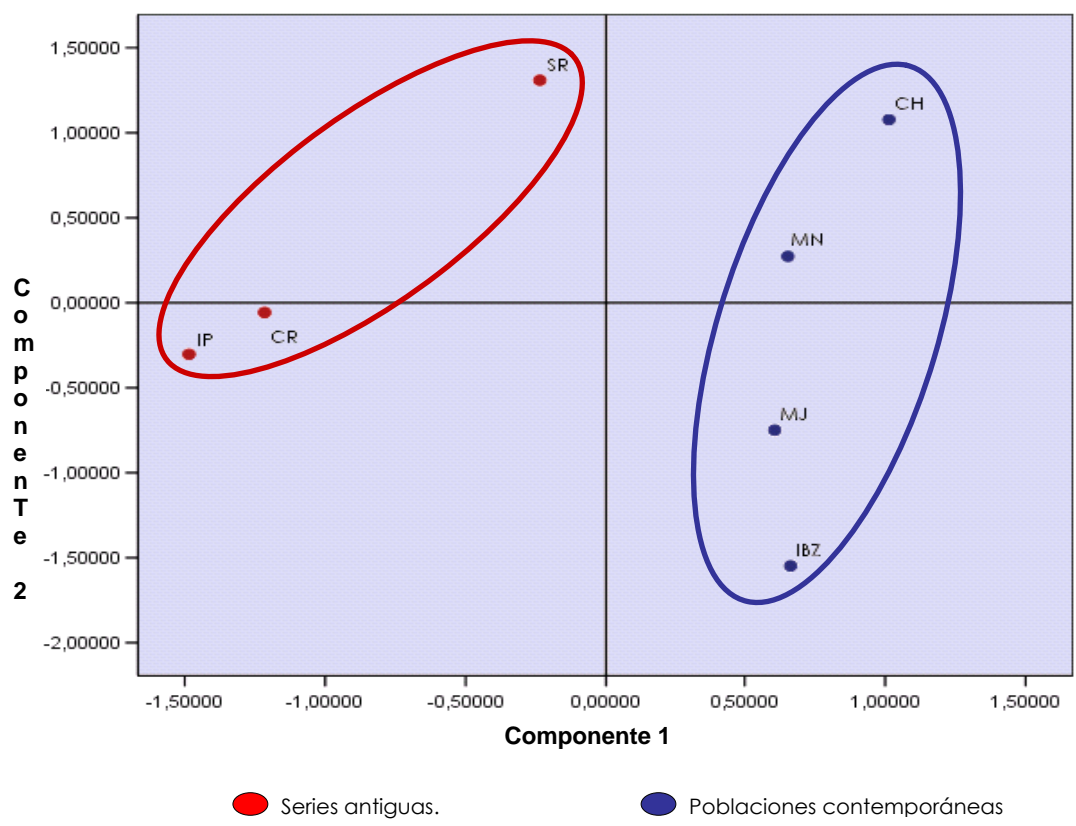


Gráfico 4. Correlaciones de los haplogrupos, reflejando el peso relativo de cada uno en el análisis de componentes principales. El círculo azul demarca los haplogrupos dominantes en el cuadrante inferior izquierdo (c) y en naranja los haplogrupos mayoritarios del cuadrante inferior derecho (d).

Para tratar de comprender mejor las relaciones poblacionales a nivel del Archipiélago Balear, se ha realizado otro análisis de componentes principales sólo con series antiguas y poblaciones contemporáneas de este Archipiélago. El análisis explica un 73,80% de la variabilidad (gráfico 5). Al analizar el componente 1 (45,55 %), se observa que las series antiguas quedan agrupadas en la mitad negativa, quedando más alejadas del resto de las poblaciones comparadas, siendo la serie de **SR** la más cercana a las poblaciones contemporáneas.

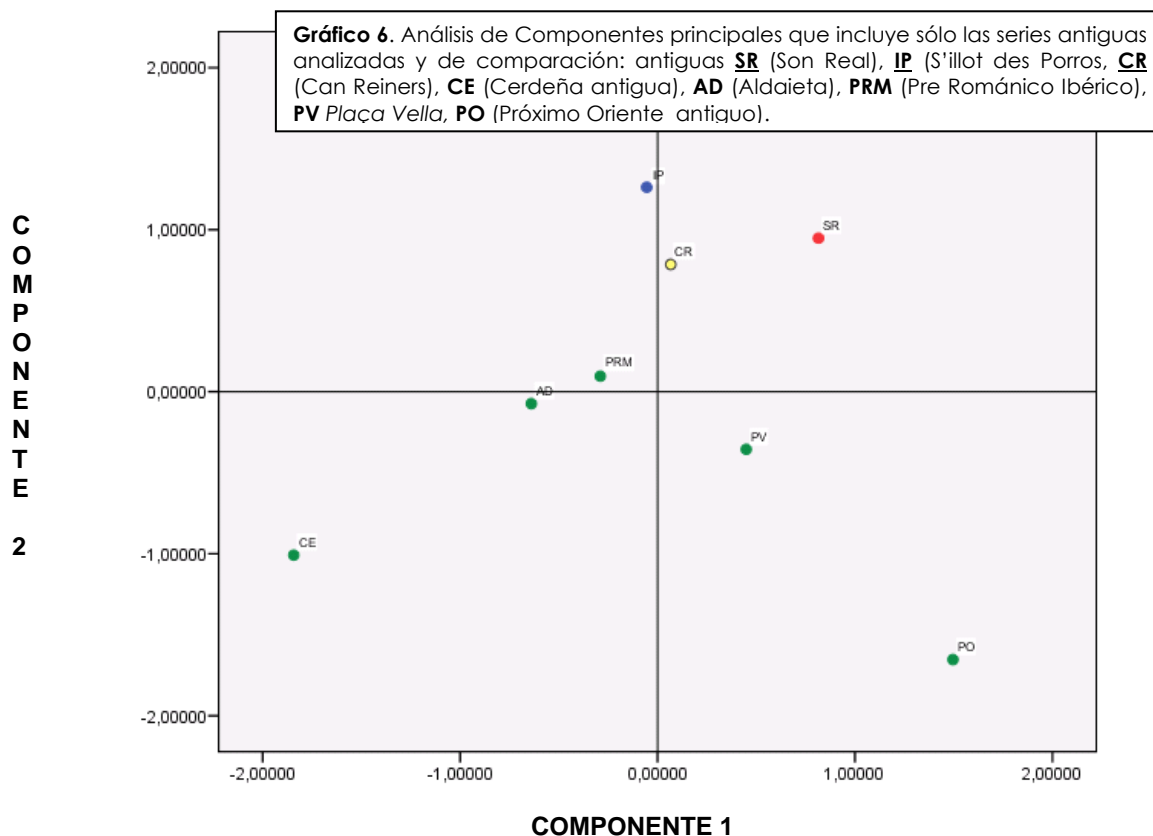
La proyección sobre el componente 2, muestra que **SR**, que se encuentra en el cuadrante superior izquierdo, se relaciona con la población actual de Chuetas, mientras que **IP** y **CR**, situadas en el cuadrante inferior izquierdo, muestran cierta aproximación entre ellas y con la población de Mallorca y Menorca.

Gráfico 5. Análisis de componentes principales en base a la frecuencia de haplogrupos entre las series antiguas (**SR**-Son Real, **IP**-S'illot des Porros, **CR**-Can Reiners) y poblaciones contemporáneas (**MJ**-Mallorca, **MN**-Menorca, **CH**-Chuetas e **IBZ**-Ibiza) del Archipiélago Balear.



Así mismo, se realizó un análisis de componentes principales que incluye sólo las series antiguas analizadas en este estudio y las de comparación. El análisis explica un 73,80% de la variabilidad (gráfico 6). Al analizar el componente 1 (66,71 %), se observa que las series antiguas mallorquinas, se agrupan en la mitad positiva, quedando el resto de series antiguas en la mitad negativa, siendo Cerdeña y Próximo Oriente antiguo las más alejadas. De las tres series mallorquinas, **IP** se encuentra muy cercana a la serie Pre Románico-Ibérica mientras que sobre esta misma proyección se observa la cercanía de Plaça Vella a las series de **SR** y **CR**.

La proyección sobre el componente 2, muestra que las tres series antiguas mallorquinas se encuentran muy cercanas. De las series de referencia, la Pre Románica Ibérica, es la más cercana a **CR** seguida de Aldaieta. Las series Cerdeña antigua y Próximo Oriente antiguo son las que se presentan más alejadas en esta proyección.



4.4.1.5 DIVERSIDAD GENÉTICA.

Las poblaciones del Norte de África (Egipto 0.907 +/- 0.026 y Túnez 0.889 +/- 0.012) muestran los valores más altos del índice de diversidad genética, mientras que la serie antigua de Cerdeña, presenta el valor más bajo (0.170 ± 0.102) (Tabla XVII), este último resultado quizás sea debido a la alta frecuencia del haplogrupo H (de 23 individuos, 21 pertenecen a este haplogrupo).

POBLACIÓN	N	K (K/N)	$\hat{H} \pm d.e$
EGIPTO	28	10(35.71)	0.907 ± 0.026
TÚNEZ	154	14 (9.09)	0.889 ± 0.012
CHUETAS	44	12 (27.27)	0.871 ± 0.027
SIRIA	69	16 (23.18)	0.869 ± 0.024
MENORCA	41	11 (26.82)	0.865 ± 0.028
IRAK	52	9 (17.30)	0.863 ± 0.019
SON REAL	37	9 (24.32)	0.861 ± 0.027
ISRAEL- PALESTINA	116	16 (13.79)	0.858 ± 0.021
CATALUÑA	39	10(25.64)	0.857 ± 0.035
CROACIA	108	11 (10.18)	0.845 ± 0.017
PRÓXIMO ORIENTE ANT	18	7 (38.88)	0.843 ± 0.052
PLAÇA VELLA	23	7 (30.43)	0.834 ± 0.051
MARRUECOS	45	9 (20.00)	0.829 ± 0.0390
FRANCIA	71	13(18.30)	0.819 ± 0.036
MALLORCA	41	7 (17.07)	0.819 ± 0.035
PEDROCHE	144	14 (9.7)	0.814 ± 0.024
TOSCANA	47	8 (17.02)	0.777 ± 0.048
CAN REINERS	28	10(35.71)	0.767 ± 0.065
IBIZA	49	7 (14.28)	0.767 ± 0.039
ARGELIA	81	8 (9.87)	0.754 ± 0.034
CÓRCEGA	53	6 (11.32)	0.748 ± 0.047
TURQUÍA	75	9 (12.00)	0.746 ± 0.031
CERDEÑA ACTUAL	115	15 (13.04)	0.738 ± 0.038
GRECIA	25	6 (24.00)	0.733 ± 0.075
S'ILLOT DES PORROS	31	6 (19.35)	0.724 ± 0.056
VALENCIA	39	9 (23.07)	0.715 ± 0.070
PRE ROMÁNICO IBERICO	17	6 (35.29)	0.705 ± 0.106
ALBANIA	42	6 (14.28)	0.703 ± 0.060
ALDAIETA	56	7 (12.5)	0.601 ± 0.066
PAÍS VASCO	61	7(11.47)	0.534 ± 0.072
CERDEÑA ANTIGUA	23	3(13,04)	0.170 ± 0.102

Tabla XVII- Índices de Diversidad obtenidos. K: Nº de haplogrupos diferentes; \hat{H} : Diversidad genética (Nei, 1987). En **Azul** la población que presenta el mayor índice y en **ocre** la que presenta el menor.

De las series analizadas en este estudio **SR** presenta un valor elevado de diversidad (0.861 ± 0.027) en relación al conjunto de series analizadas. Se observa que las series de **CR** e **IP** presentan una diversidad genética menor, aunque

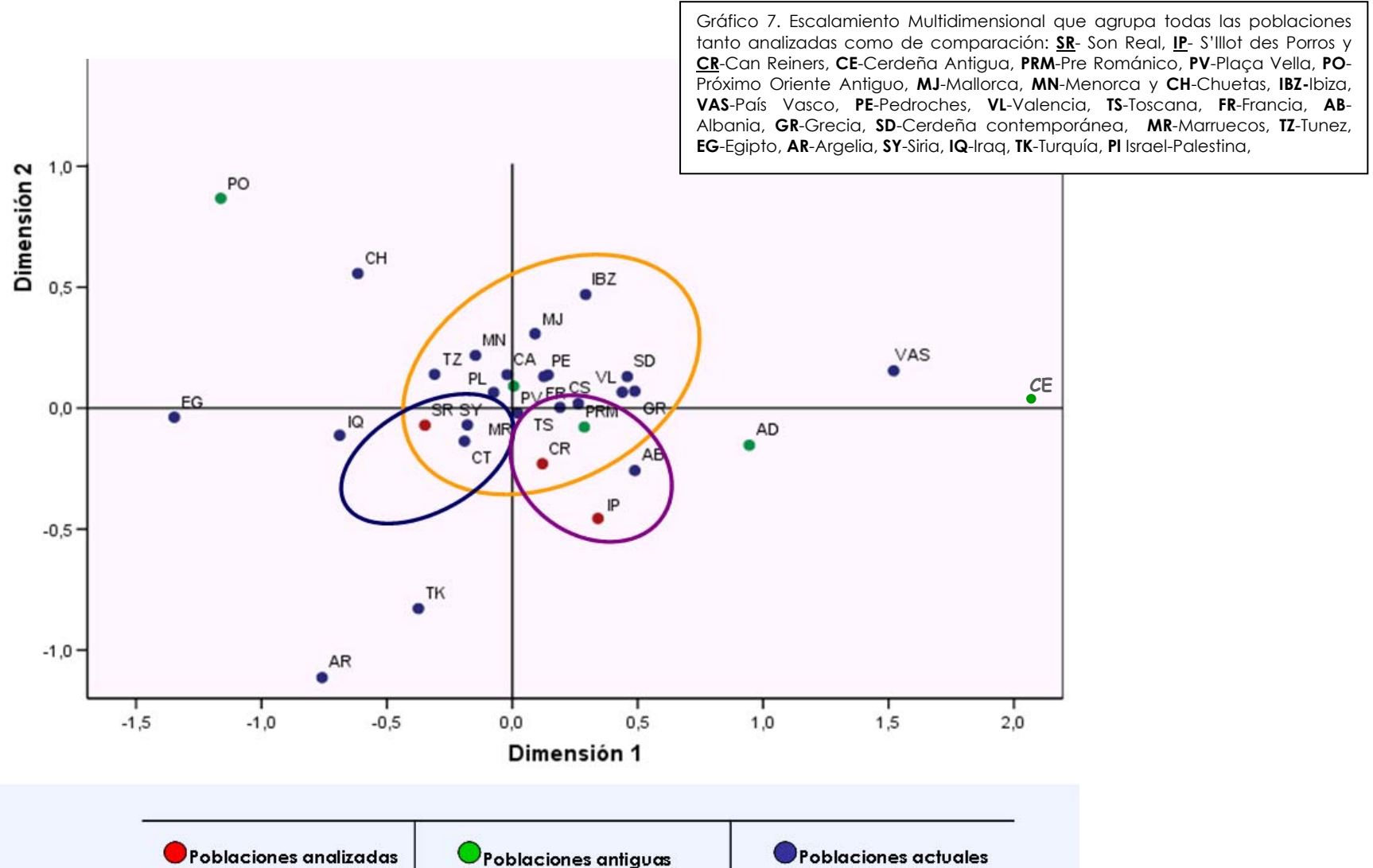
relativamente elevada (0.767 ± 0.065 y 0.724 ± 0.056) en relación a otras poblaciones de la Península Ibérica tanto actuales, como País Vasco y Valencia, como antiguas (serie Pre-Románico Ibérico y Cerdeña antigua).

4.4.1.6 DISTANCIAS GENÉTICAS.

La tabla XVIII muestra la matriz de las distancias genéticas (Reynolds *et al.*, 1983) calculada según lo descrito en el apartado 3.7.2 de Muestras y metodología, en base a la frecuencia de haplogrupos de las poblaciones en estudio y las 28 poblaciones de comparación (tabla V y fig. 34 del apartado 3.7 de Muestras y metodología). Cuando dos poblaciones, comparten haplogrupos, la distancia entre ellas será menor, pero si un haplogrupo sólo esta presente en una de las poblaciones comparadas, la distancia que entre ellas se presente, dependerá de la frecuencia de ese haplogrupo (Fernández D., 2005).

En nuestro trabajo, se observa que entre las series de **IP** y **SR** existe una menor distancia genética con respecto a las poblaciones de referencia mientras que con **CR** esta distancia es nula. Esto indica que **CR** presenta una mayor relación genética con la mayoría de las poblaciones de comparación, ya que comparten un mayor nº de haplogrupos lo que supone la existencia de una composición genética similar.

Para representar la matriz de distancias genéticas se utilizó el método del Escalamiento Multidimensional (gráfico 7). En el gráfico bidimensional de este análisis se puede observar que en la dimensión 1 existe un gradiente de poblaciones del Cercano Oriente hasta la Península Ibérica, agrupándose la mayor parte de las poblaciones de comparación en la intercepción de los ejes en el centro del gráfico. La serie de **SR**, queda ubicada en el cuadrante inferior derecho (círculo azul), coincidiendo con las relaciones poblacionales ya identificadas en el análisis de componentes principales (gráfico 7), situación similar a lo que ocurre con **IP** y **CR** (circulo morado), situadas en el cuadrante inferior derecho.



Para situar de una forma más clara las poblaciones en estudio con respecto a las poblaciones antiguas de comparación, se construyó un árbol de *Neighbor Joining* (Fig. 42), a partir de las distancias genéticas, incluyendo sólo las poblaciones antiguas, observándose lo siguiente:

1. Existe un gradiente de poblaciones de la Península Ibérica hasta el Cercano Oriente.
2. Las poblaciones de **IP** y **CR** están situadas más cerca de las poblaciones antiguas de la Península Ibérica, un poco más alejada de la serie de **SR**, la cual, se encuentra próxima a la serie antigua de la Plaça Vella. Las series del Cercano Oriente antiguo y la de Cerdeña antigua (Caramelli *et al.*, 2007), se muestran muy diferenciadas.

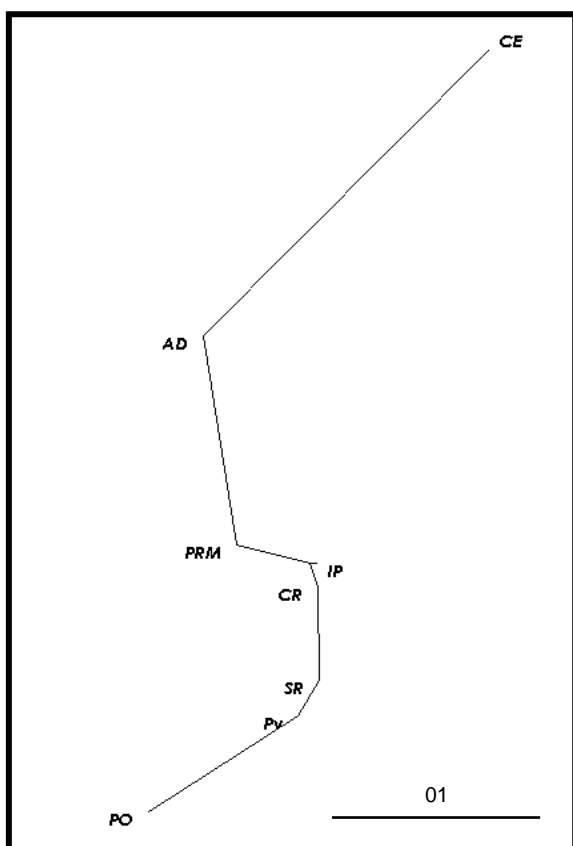


Fig. 42- Árbol de Neighbor -Joining sin raíz construido a partir de la Matriz de distancias genéticas de Reynolds (Reynolds *et al.*, 1983), entre las series antiguas **SR** (Son Real), **IP** (S'illot des Porros), **CR** (Can Reiners), **CE** (Cerdeña antigua), **AD** (Aldaieta), **PRM** (Pre Románico Ibérico), **PV** Plaça Vella, **PO** (Próximo Oriente antiguo).

	SR	IP	CR	PV	PRM	PO	AD	CE	CA	VAS	PE	VL	MJ	CH	MN	IBZ
SR	0,0000															
IP	0,0424	0,0000														
CR	0,0252	0,0000	0,0000													
PV	0,0099	0,0458	0,0108	0,0000												
PRM	0,0277	0,0076	0,0000	0,0000	0,0000											
PO	0,0613	0,1420	0,1008	0,0447	0,1149	0,0000										
AD	0,0920	0,0518	0,0263	0,0505	0,0000	0,2107	0,0000									
CE	0,3448	0,2423	0,2389	0,2903	0,1796	0,5540	0,0946	0,0000								
CA	0,0222	0,0359	0,0185	0,0000	0,0243	0,0742	0,0748	0,2737	0,0000							
VAS	0,1657	0,0753	0,0764	0,0810	0,0246	0,2611	0,0232	0,0554	0,0934	0,0000						
PE	0,0216	0,0254	0,0176	0,0000	0,0057	0,0669	0,0483	0,1848	0,0041	0,0563	0,0000					
VL	0,0526	0,0256	0,0171	0,0104	0,0000	0,1445	0,0023	0,1402	0,0169	0,0149	0,0106	0,0000				
MJ	0,0323	0,0523	0,0447	0,0000	0,0323	0,0845	0,0771	0,2636	0,0000	0,0798	0,0000	0,0088	0,0000			
CH	0,0467	0,0962	0,0762	0,0327	0,0702	0,0717	0,1547	0,3685	0,0314	0,1798	0,0395	0,0857	0,0373	0,0000		
MN	0,0042	0,0702	0,0383	0,0000	0,0298	0,0449	0,0887	0,3077	0,0000	0,1251	0,0058	0,0324	0,0000	0,0291	0,0000	
IBZ	0,0762	0,0757	0,0595	0,0131	0,0431	0,1335	0,0811	0,2484	0,0000	0,0784	0,0266	0,0101	0,0000	0,0625	0,0225	0,0000
Mr	0,0234	0,0273	0,0134	0,0027	0,0131	0,0945	0,0537	0,2317	0,0110	0,0871	0,0158	0,0155	0,0182	0,0604	0,0273	0,0342
Ar	0,0715	0,0699	0,0351	0,0854	0,0816	0,1399	0,1548	0,4004	0,0813	0,2410	0,1043	0,1338	0,1337	0,1272	0,1107	0,1438
TZ	0,0380	0,0674	0,0352	0,0128	0,0459	0,0657	0,0972	0,2622	0,0105	0,1279	0,0317	0,0470	0,0240	0,0377	0,0169	0,0299
EG	0,0664	0,1377	0,0980	0,0737	0,1231	0,1015	0,1969	0,4826	0,0656	0,2725	0,0953	0,1336	0,0890	0,0672	0,0644	0,1135
SD	0,0559	0,0227	0,0248	0,0158	0,0010	0,1350	0,0254	0,1360	0,0175	0,0233	0,0088	0,0000	0,0069	0,0793	0,0336	0,0158
TS	0,0143	0,0379	0,0057	0,0000	0,0000	0,0985	0,0165	0,1945	0,0118	0,0643	0,0096	0,0000	0,0186	0,0671	0,0084	0,0316
CS	0,0268	0,0401	0,0105	0,0000	0,0000	0,0929	0,0187	0,1824	0,0180	0,0521	0,0063	0,0042	0,0234	0,0713	0,0138	0,0377
FR	0,0275	0,0218	0,0164	0,0000	0,0085	0,0803	0,0476	0,1939	0,0000	0,0517	0,0000	0,0001	0,0000	0,0377	0,0055	0,0091
CT	0,0193	0,0437	0,0104	0,0069	0,0198	0,0781	0,0744	0,2634	0,0080	0,1276	0,0306	0,0397	0,0314	0,0559	0,0191	0,0414
AB	0,0655	0,0236	0,0000	0,0386	0,0000	0,1467	0,0150	0,1754	0,0475	0,0593	0,0368	0,0118	0,0646	0,1106	0,0670	0,0652
GR	0,0676	0,0602	0,0332	0,0274	0,0002	0,1475	0,0229	0,2051	0,0273	0,0550	0,0304	0,0000	0,0299	0,0851	0,0402	0,0231
TK	0,0409	0,0396	0,0078	0,0590	0,0324	0,1143	0,0947	0,3268	0,0700	0,1817	0,0682	0,0935	0,1084	0,1101	0,0802	0,1334
Sy	0,0064	0,0381	0,0026	0,0027	0,0071	0,0650	0,0669	0,2664	0,0083	0,1258	0,0225	0,0349	0,0294	0,0315	0,0109	0,0424
PI	0,0174	0,0512	0,0182	0,0028	0,0121	0,0701	0,0594	0,2225	0,0072	0,0970	0,0163	0,0218	0,0164	0,0353	0,0035	0,0248
IQ	0,0055	0,0929	0,0506	0,0265	0,0527	0,0615	0,1274	0,3852	0,0434	0,2164	0,0552	0,0857	0,0607	0,0519	0,0212	0,0920

Tabla XVIII . Matriz de Distancias genéticas de Reynolds (Reynolds *et al.*, 1987), estimadas a partir de las frecuencias de haplogrupos entre las series antiguas analizadas y las poblaciones de comparación, descritas en la tabla V y figura 28, destacándose en rojo los valores obtenidos entre las Series antiguas analizadas.

	MR	AR	TZ	EG	SD	TS	CS	FR	CT	AB	GR	TK	SY	PL	IQ
SR															
IP															
CR															
PV															
PRM															
PO															
AD															
CE															
CA															
VAS															
PE															
VL															
MJ															
CH															
MN															
IBZ															
MR	0,0000														
AR	0,0734	0,0000													
TZ	0,0163	0,0697	0,0000												
EG	0,0658	0,1100	0,0234	0,0000											
SD	0,0236	0,1416	0,0499	0,1317	0,0000										
TS	0,0195	0,0990	0,0348	0,0972	0,0126	0,0000									
CS	0,0285	0,1087	0,0432	0,1198	0,0146	0,0000	0,0000								
FR	0,0090	0,1089	0,0228	0,0835	0,0000	0,0109	0,0128	0,0000							
CT	0,0283	0,0407	0,0188	0,0699	0,0490	0,0176	0,0285	0,0271	0,0000						
AB	0,0405	0,0886	0,0543	0,1328	0,0256	0,0157	0,0187	0,0351	0,0352	0,0000					
GR	0,0384	0,1391	0,0405	0,0917	0,0108	0,0091	0,0174	0,0194	0,0447	0,0000	0,0000				
TK	0,0665	0,0122	0,0680	0,1017	0,0997	0,0583	0,0626	0,0760	0,0327	0,0505	0,0954	0,0000			
SY	0,0119	0,0353	0,0075	0,0435	0,0441	0,0120	0,0221	0,0204	0,0000	0,0297	0,0348	0,0245	0,0000		
PL	0,0084	0,0793	0,0033	0,0457	0,0288	0,0057	0,0128	0,0117	0,0152	0,0338	0,0189	0,0599	0,0000	0,0000	
IQ	0,0527	0,0593	0,0326	0,0609	0,0963	0,0438	0,0587	0,0581	0,0154	0,0776	0,0871	0,0434	0,0066	0,0289	0,0000

Tabla XVIII (cont) . Matriz de Distancias genéticas de Reynolds (Reynolds *et al.*, 1987), estimadas a partir de las frecuencias de haplogrupos entre las series antiguas analizadas y las poblaciones de comparación, descritas en la tabla V y figura 28, destacándose en rojo los valores obtenidos entre las Series antiguas analizadas.

4.4.1.7 TEST EXACTO DE DIFERENCIACIÓN POBLACIONAL.

Esta prueba estadística disponible en el paquete estadístico ARLEQUIN 2.000 (Schneider *et al.*, 2000; <http://anthro.unige.ch/arlequin>), se utilizó para comprobar si existen diferencias significativas entre las frecuencias de haplogrupos de las series analizadas y las poblaciones empleadas para la comparación (Montiel, 2001; Maca-Meyer, 2002; Solórzano, 2006) (Tabla XIX).

TEST EXACTO DE DIFERENCIACIÓN POBLACIONAL ($p \pm de$)						
	SR		IP		CR	
Son Real						
S'illot des Porros	0.01537 ± 0.0007	+				
Can Reiners	0.13117 ± 0.0021	-	0.42841 ± 0.0032	-		
Plaça Vella	0.08253 ± 0.0015	-	0.00165 ± 0.0001	+	0.23113 ± 0.0022	-
Pre-Románico Ibérico	0.44418 ± 0.0024	-	0.04629 ± 0.0012	+	0.88781 ± 0.0014	-
Próximo Oriente ant	0.00315 ± 0.0003	+	0.00001 ± 0.0000	+	0.00208 ± 0.0002	+
Aldaieta	0.00045 ± 0.0001	+	0.00027 ± 0.0001	+	0.03801 ± 0.0012	+
Cerdeña ant	0.00003 ± 0.0000	+	0.00065 ± 0.0001	+	0.00470 ± 0.0004	+
Cataluña	0.03973 ± 0.0010	+	0.02121 ± 0.0006	+	0.20802 ± 0.0026	-
Vascos	0.00000 ± 0.0000	+	0.00060 ± 0.0001	+	0.00140 ± 0.0002	+
Pedroches	0.02525 ± 0.0011	+	0.02993 ± 0.0012	+	0.03494 ± 0.0014	+
Valencia	0.01286 ± 0.0005	+	0.01714 ± 0.0007	+	0.11806 ± 0.0021	-
Mallorca	0.00123 ± 0.0002	+	0.00012 ± 0.0000	+	0.00198 ± 0.0002	+
Chuetas	0.00147 ± 0.0002	+	0.00004 ± 0.0000	+	0.00207 ± 0.0002	+
Menorca	0.20713 ± 0.0026	-	0.00026 ± 0.0001	+	0.05834 ± 0.0014	-
Ibiza	0.00000 ± 0.0000	+	0.00001 ± 0.0000	+	0.00019 ± 0.0000	+
Marruecos	0.00334 ± 0.0002	+	0.00954 ± 0.0004	+	0.09588 ± 0.0015	-
Argelia	0.00000 ± 0.0000	+	0.00008 ± 0.0000	+	0.00940 ± 0.0006	+
Túnez	0.00000 ± 0.0000	+	0.00002 ± 0.0000	+	0.01212 ± 0.0007	+
Egipto	0.00000 ± 0.0000	+	0.00000 ± 0.0000	+	0.00034 ± 0.0001	+
Cerdeña actual	0.00052 ± 0.0001	+	0.02505 ± 0.0013	+	0.02312 ± 0.0013	+
Toscana	0.12945 ± 0.0019	-	0.00038 ± 0.0001	+	0.12450 ± 0.0020	-
Córcega	0.02782 ± 0.0008	+	0.00011 ± 0.0000	+	0.01667 ± 0.0007	+
Francia	0.01039 ± 0.0005	+	0.03816 ± 0.0014	+	0.16668 ± 0.0026	-
Croacia	0.00052 ± 0.0001	+	0.00017 ± 0.0001	+	0.08577 ± 0.0018	-
Albania	0.00008 ± 0.0000	+	0.00082 ± 0.0001	+	0.05873 ± 0.0013	-
Grecia	0.00076 ± 0.0001	+	0.00006 ± 0.0000	+	0.01304 ± 0.0006	+
Turquía	0.00097 ± 0.0001	+	0.00120 ± 0.0002	+	0.06433 ± 0.0021	-
Siria	0.06593 ± 0.0019	-	0.00344 ± 0.0003	+	0.72444 ± 0.0038	-
Israel	0.02342 ± 0.0010	+	0.00009 ± 0.0000	+	0.12000 ± 0.0030	-
Irak	0.01817 ± 0.0007	+	0.00000 ± 0.0000	+	0.00312 ± 0.0003	+

Tabla XIX - Resultados ($p \pm de$) del Test exacto de diferenciación poblacional y su desviación estándar (Raymond y Rousset, 1995) para la comparación de cada una de las series de este estudio con las poblaciones de referencia (+, $P < 0.05$).

En este análisis, se observa que **IP** presenta diferencias significativas con todos los grupos excepto con **CR**, coincidiendo con los resultados observados en el análisis de escalamiento multidimensional, mientras que **SR** y **CR** coinciden en no exhibir

diferenciación significativa con las series de Plaça Vella y Pre Románico Ibérico (series antiguas), Menorca (Archipiélago Balear), Toscana (Europa) y Siria (Asia). La serie de **CR** no muestra diferencias con otras poblaciones del Cercano Oriente (Palestina y Turquía) así como de la Península Balcánica (Croacia y Albania). De las tres series mallorquinas analizadas, **CR** es la única que no manifiesta diferencias con Cataluña (Tabla XVII).

4.4.2 REGIÓN DE CONTROL O HVS-I DEL MTDNA.

Con el fin de obtener una mayor información genética que contribuya a esclarecer las relaciones poblacionales entre las series estudiadas y las poblaciones del arco mediterráneo empleadas para la comparación, se examinó la región de control del mtDNA. La mayoría de los haplotipos encontrados entre las series antiguas estudiadas, pueden considerarse europeos. Con estos datos se realizaron los siguientes análisis:

4.4.2.1 ÍNDICES DE DIVERSIDAD:

La diversidad dentro de cada una de las poblaciones en estudio, fue analizada a partir de los distintos fragmentos de secuencias (126 pb y 156 pb) de la HVS-I del mtDNA, valorándose los siguientes parámetros: Diversidad genética (\hat{H}), Número de haplotipos diferentes (**K**), Diversidad de sitios polimórficos (**S**), Diversidad nucleotídica (π) y Número medio de diferencias por parejas ($\theta\pi$).

4.4.2.1.1 DIVERSIDAD GENÉTICA (\hat{H}):

La tabla **XX** registra la diversidad genética (\hat{H}) de cada población basada en las secuencias de la HVS-I del mtDNA. Este índice define la probabilidad de que dos haplotipos dentro de una misma población elegidos de forma aleatoria, sean diferentes. Al analizar este índice con el fragmento de 126 pb, se observa que las tres series analizadas en este estudio se encuentran muy cercanas entre si y con otras series antiguas de referencia, tendiendo a acercarse al rango de menor valor, que lo presenta la población de Turquía (0.551 ± 0.069), siendo **IP** la que presenta los valores más bajos (0.818 ± 0.083), mientras que **SR** y **CR** presentan valores similares. Con respecto al segmento de 156 pb, **SR** y **CR** presentan valores

distantes, ocupando posiciones distintas, destacándose que **CR** se agrupa con poblaciones de Europa y **SR** se encuentra muy próximo a poblaciones contemporáneas del Archipiélago Balear como son Mallorca y Chuetas. Dentro de este parámetro, la serie de Cerdeña antigua presenta los valores más bajos (0.391 ± 0.125).

4.4.2.1.2 N° DE HAPLOTIPOS DIFERENTES:

En la tabla **XXI**, se muestran los porcentajes de haplotipos diferentes (**K**) presentados por cada población, según el fragmento analizado, observándose que la población de **IP** analizada con el fragmento de 126 pb, presentó un alto porcentaje de haplotipos diferentes (72.7%), a pesar de tener un tamaño muestral bajo ($n=11$), mientras que la población de Túnez que presenta un mayor número de individuos, se sitúa entre las poblaciones con un número menor de haplotipos diferentes. En relación al fragmento de 156 pb, se observó que la población de Irak presentó el mayor porcentaje de haplotipos diferentes y Argelia en contraposición, presenta el más bajo porcentaje. Además, se puede distinguir que entre las poblaciones de comparación, Pedroches ($n=144$), Túnez ($n=154$), y Cerdeña ($n=116$), que presentan un elevado tamaño muestral, presentan también un bajo porcentaje de haplotipos diferentes, lo que podría ser explicado por una elevada endogamia.

Estos resultados evidencian que el porcentaje de haplotipos diferentes varía a medida que se reduce el n° de pares de bases secuenciadas ya que los fragmentos más cortos pueden excluir sitios polimórficos. Por ejemplo, el fragmento más corto situado entre las posiciones 16243-16365 (126pb), excluye la posición 16224T. Aunque también debemos considerar que un fragmento corto que incluya una región altamente polimórfica presentará una mayor diversidad que un fragmento más largo en el que no haya sitios polimórficos importantes. Por eso es importante en DNA antiguo encontrar fragmentos pequeños que contengan la mayor cantidad de información posible, es decir que incluyan el mayor número posible de polimorfismos a pesar del reducido tamaño (Montiel, 2001).

Poblaciones n		Fragmento 126pb ($\hat{H} \pm de$)	Poblaciones n		Fragmento 156 pb ($\hat{H} \pm de$)
Irak	52	0,974 ± 0.011	Irak	52	0.992 ± 0.006
Israel	116	0.960 ± 0.012	Egipto	28	0.976 ± 0.018
Siria	69	0.939 ± 0.022	Israel	116	0.976 ± 0.009
Grecia	25	0.937 ± 0.037	Valencia	39	0.968 ± 0.020
Menorca	41	0.939 ± 0.022	Próximo Oriente	18	0.967 ± 0.050
Georgia	44	0.936 ± 0.018	Menorca	41	0.966 ± 0.014
Túnez	154	0.923 ± 0.015	Siria	69	0.957 ± 0.018
Valencia	39	0.919 ± 0.037	Túnez	154	0.952 ± 0.010
Egipto	28	0.918 ± 0.044	Grecia	25	0.940 ± 0.037
Cataluña	39	0.916 ± 0.031	Georgia	44	0.940 ± 0.019
Francia	71	0.910 ± 0.024	Cataluña	39	0.938 ± 0.028
Mallorca	41	0.909 ± 0.032	Francia	71	0.938 ± 0.021
Ibiza	49	0.901 ± 0.017	Albania	42	0.937 ± 0.028
Pedroches	144	0.900 ± 0.017	Pedroches	144	0.933 ± 0.014
Cerdeña actual	115	0.887 ± 0.025	Can Reiners	15	0.933 ± 0.054
Toscana	47	0.883 ± 0.044	Toscana	47	0.926 ± 0.034
Albania	42	0.879 ± 0.044	Ibiza	49	0.924 ± 0.015
Próximo Oriente	18	0.869 ± 0.049	Argelia	81	0.923 ± 0.010
Suiza	69	0.864 ± 0.029	Plaça Vella	23	0.913 ± 0.041
Argelia	81	0.864 ± 0.022	Mallorca	41	0.913 ± 0.032
Can Reiners	15	0.857 ± 0.090	Son Real	22	0.909 ± 0.044
Son Real	22	0.844 ± 0.061	Chuetas	44	0.909 ± 0.029
Chuetas	44	0.844 ± 0.066	Suiza	69	0.905 ± 0.025
Sur de Portugal	59	0.832 ± 0.049	Cerdeña actual	115	0.899 ± 0.024
Marruecos	45	0.831 ± 0.047	Sur de Portugal	59	0.873 ± 0.042
S'illot des Porros	11	0.818 ± 0.083	Marruecos	45	0.865 ± 0.046
Pre Románico Ibérico	17	0.824 ± 0.084	Pre Románico Ibérico	17	0.858 ± 0.087
País Vasco	61	0.779 ± 0.054	País Vasco	61	0.802 ± 0.053
Plaça Vella	23	0.783 ± 0.073	Turquía	75	0.764 ± 0.052
Aldaieta	56	0.666 ± 0.054	Aldaieta	56	0.666 ± 0.054
Turquía	75	0.551 ± 0.069	Cerdeña antigua	23	0.391 ± 0.125
Cerdeña antigua	23	0.249 ± 0.116			

Tabla XX - Diversidad genética estimada para cada población y su desviación estándar, según los distintos tamaños de fragmentos.
En **ocre** se resaltan los menores porcentajes y en **azul** los mayores.


Poblaciones		Fragmento 126pb			Poblaciones		Fragmento 156 pb	
n		K	%K		n		K	%K
S'ilot des Porros	11	8	72.7		Irak	52	44	84.6
Irak	52	36	69.2		Egipto	28	22	78.5
Grecia	25	17	68.0		Próximo Oriente	18	14	77.7
Can Reiners	15	10	66.6		Valencia	39	30	76.9
Egipto	28	18	64.2		Can Reiners	15	11	73.3
Valencia	39	24	61.5		Grecia	25	18	72.0
Toscana	47	28	59.5		Israel	116	82	70.6
Israel	116	69	59.5		Toscana	47	33	70.2
Pre Románico Ibérico	17	9	52.9		Siria	69	47	68.1
Albania	42	22	52.3		Menorca	41	25	60.9
Siria	69	41	59.4		Albania	42	25	59.5
Francia	71	36	50.7		Francia	71	42	59.1
Menorca	41	21	51.2		Cataluña	39	23	58.9
Sur de Portugal	59	29	49.1		Pre Románico Ibérico	17	10	58.8
Cataluña	39	19	48.7		Plaça Vella	23	13	56.5
Próximo Oriente	18	8	44.4		Sur de Portugal	59	33	55.9
Mallorca	41	18	43.9		Son Real	22	12	54.5
Son Real	22	9	40.9		Mallorca	41	20	48.7
Georgia	44	18	40.9		Marruecos	45	21	46.6
Chuetas	44	17	38.6		Georgia	44	21	47.7
Cerdeña actual	115	43	37.3		Chuetas	44	20	45.4
Plaça Vella	23	8	34.7		Cerdeña actual	115	49	42.6
País Vasco	61	21	34.4		País Vasco	61	26	42.6
Marruecos	45	15	33.3		Túnez	154	63	40.9
Túnez	154	51	33.1		Suiza	69	27	39.1
Suiza	69	22	31.8		Pedroches	144	52	36.1
Ibiza	49	14	28.5		Turquía	75	27	36.0
Pedroches	144	39	27.0		Ibiza	49	16	32.6
Turquía	75	18	24.0		Argelia	81	19	23.4
Aldaieta	56	11	19.6		Cerdeña antigua	23	5	21.7
Argelia	81	15	18.5		Aldaieta	56	11	19.6
Cerdeña antigua	23	4	17.3					

Tabla XXI - N° de haplotipos K(K/n) estimada para cada población, según los distintos tamaños de fragmentos En **ocre** se resaltan los menores porcentajes y en **azul** los mayores.

4.4.2.1.3 DIVERSIDAD DEL NÚMERO DE SITIOS POLIMÓRFICOS (S).

En el presente estudio, las series de **SR**, **IP** y **CR** junto al resto de series antiguas empleadas para la comparación, presentaron los valores más bajos, tomando en consideración los dos fragmentos analizados. Por otra parte, las poblaciones contemporáneas de Israel (46/60) y Túnez (44/58), mostraron un mayor número de sitios polimórficos (tabla XXII).

Fragmento de 126 pb			Fragmento de 156 pb		
Población	n	S	Población	n	S
Israel	116	46	Israel	116	60
Túnez	154	44	Túnez	154	58
Siria	69	35	Siria	69	46
Irak	52	29	Irak	52	39
Pedroches	144	27	Pedroches	144	39
Cerdeña actual	115	33	Cerdeña actual	115	38
Sur de Portugal	59	29	Sur de Portugal	59	36
Toscana	47	28	Toscana	47	34
Francia	71	26	Francia	71	33
Egipto	28	23	Egipto	28	32
Valencia	39	22	Valencia	39	29
País Vasco	61	22	País Vasco	61	28
Albania	42	22	Turquía	75	28
Grecia	25	21	Suiza	69	25
Suiza	69	19	Georgia	44	25
Georgia	44	19	Albania	42	25
Cataluña	39	18	Grecia	25	24
Chuetas	44	18	Cataluña	39	22
Turquía	75	17	Menorca	41	22
Menorca	41	17	Chuetas	44	22
Marruecos	45	15	Marruecos	45	20
Argelia	81	13	Argelia	81	19
Mallorca	41	13	Mallorca	41	18
Ibiza	49	13	Ibiza	49	16
Can Reiners	15	13	Can Reiners	15	15
Próximo Oriente	18	12	Próximo Oriente	18	15
Son Real	22	10	Son Real	22	14
Aldaieta	56	11	Aldaieta	56	13
Plaça Vella	23	8	Plaça Vella	23	12
Pre Románico Ibérico	17	9	Pre Románico Ibérico	17	10
S'illot des Porros	11	5	Cerdeña antigua	23	4
Cerdeña antigua	23	3			

Tabla XXII - Diversidad del número de sitios polimórficos: n: número de muestra y s: nº de sitios polimórficos.

4.4.2.1.4 DIVERSIDAD NUCLEOTÍDICA Y N° MEDIO DE DIFERENCIAS POR PAREJA:

En las tablas XXIII y XXIV se presentan los valores del índice de Diversidad nucleotídica (π) y número medio de diferencias por parejas de secuencias ($\theta\pi$), estimados por medio del método de Tamura-Nei, con un parámetro alfa de 0.47. Estos dos índices están relacionados y por lo tanto presentarán resultados similares a la hora de valorar la diversidad entre las secuencias.

De las series antiguas mallorquinas analizadas en este estudio y considerando el fragmento de 126 pb, la serie Talayótica de **IP** presenta los mayores valores de diversidad ($\pi = 0.019 \pm 0.013$ y $\theta\pi = 1.806 \pm 1.125$), seguida de la serie alto medieval de **CR** ($\pi = 0.0172 \pm 0.011$ y $\theta\pi = 2.114 \pm 1.247$), mientras que los menores valores los presenta la población de **SR** ($\pi = 0.016 \pm 0.010$ y $\theta\pi = 1.996 \pm 1.170$).

En el conjunto de las poblaciones de comparación, para este mismo fragmento de 126 pb, la población de Egipto presenta los mayores valores ($\pi = 0.029 \pm 0.016$ y $\theta\pi = 3.572 \pm 1.870$) mientras que Turquía ($\pi = 1.716 \pm 1.013$ y $\theta\pi = 0.914 \pm 0.640$) entre las poblaciones contemporáneas y Aldaieta entre las series antiguas, exhiben los menores valores ($\pi = 0.007 \pm 0.005$ y $\theta\pi = 0.914 \pm 0.640$). La serie antigua del Próximo Oriente ($\pi = 0.025 \pm 0.015$ y $\theta\pi = 3.094 \pm 1.685$), presenta valores superiores al del resto de poblaciones antiguas.

Con respecto al segmento de 156 pb, en general los resultados conseguidos son concordantes con los obtenidos del fragmento más corto de 126 pb, como se observa en la tabla XXI, donde se muestra que de las series antiguas analizadas en este estudio, **SR** exhibe un mayor valor ($\pi = 0.016 \pm 0.010$ y $\theta\pi = 2.653 \pm 1.470$) en relación a la serie de **CR** ($\pi = 0.016 \pm 0.010$ y $\theta\pi = 2.614 \pm 1.480$); mientras que en relación a las poblaciones de referencia, los mayores valores los presenta Egipto ($\pi = 0.030 \pm 0.017286$ y $\theta\pi = 4.847 \pm 2.437$), variando con respecto al rango inferior que corresponde a la serie de Cerdeña antigua ($\pi = 0.002 \pm 0.002$ y $\theta\pi = 0.446 \pm 0.412$), destacando así mismo que la serie antigua del Próximo Oriente presenta valores superiores al del resto de poblaciones antiguas ($\pi = 0.027 \pm 0.015$ y $\theta\pi = 4.296 \pm 2.231$).

En relación a la diversidad nucleotídica calculada a partir de las secuencias de 156 pb, los valores oscilan entre $\pi = 0.030 \pm 0.017$ (de la población de Egipto) y $\pi = 0.002 \pm 0.002$ (en la serie antigua de Cerdeña), observándose que las series de **SR** y **CR** exhiben valores cercanos a la media, lo que hace suponer que entre estas dos poblaciones el nº de haplotipos únicos es parecido. Por otra parte, los valores para este mismo parámetro, considerando el fragmento de 126 pb, se encuentran entre $\pi = 0.029 \pm 0.016$ (para la población de Egipto) y de $\pi = 0.002 \pm 0.002$ (en la serie antigua de Cerdeña), siendo la serie de **IP** la que presenta un mayor índice de diversidad nucleotídica, relacionándose con las poblaciones de Cerdeña actual y Chuetas, manteniéndose **SR** y **CR** muy cercanos.


Poblaciones		Fragmento 126pb		Poblaciones		Fragmento de 156 pb
n		($\pi \pm de$)		n		($\pi \pm de$)
Egipto	28	0.029 ± 0.016	Egipto	28	0.030 ± 0.017	
Irak	52	0.028 ± 0.016	Israel	116	0.028 ± 0.015	
Israel	116	0.027 ± 0.015	Próximo Oriente	18	0.027 ± 0.015	
Grecia	25	0.026 ± 0.015	Túnez	154	0.027 ± 0.014	
Siría	69	0.025 ± 0.015	Irak	52	0.026 ± 0.014	
Túnez	154	0.025 ± 0.014	Siría	69	0.025 ± 0.014	
Próximo Oriente	18	0.025 ± 0.015	Grecia	25	0.024 ± 0.014	
Toscana	47	0.022 ± 0.013	Toscana	47	0.022 ± 0.012	
Francia	71	0.021 ± 0.012	Francia	71	0.020 ± 0.011	
Valencia	39	0.020 ± 0.012	Argelia	81	0.020 ± 0.011	
Ibiza	49	0.020 ± 0.012	Cataluña	39	0.020 ± 0.011	
Mallorca	41	0.020 ± 0.012	Chuetas	44	0.019 ± 0.011	
Sur de Portugal	59	0.020 ± 0.012	Sur de Portugal	59	0.019 ± 0.011	
Cataluña	39	0.020 ± 0.012	Georgia	44	0.019 ± 0.011	
Georgia	44	0.019 ± 0.012	Valencia	39	0.019 ± 0.011	
Chuetas	44	0.019 ± 0.012	Pedroches	144	0.019 ± 0.011	
S'illot des Porros	11	0.019 ± 0.013	Mallorca	41	0.018 ± 0.011	
Cerdeña actual	115	0.018 ± 0.011	Menorca	41	0.018 ± 0.011	
Pedroches	144	0.018 ± 0.011	Ibiza	49	0.018 ± 0.010	
Menorca	41	0.017 ± 0.011	Son Real	22	0.016 ± 0.010	
Albania	42	0.017 ± 0.010	Albania	42	0.016 ± 0.010	
Can Reiners	15	0.017 ± 0.011	Marruecos	45	0.016 ± 0.010	
Son Real	22	0.016 ± 0.010	Cerdeña actual	115	0.016 ± 0.009	
Argelia	81	0.015 ± 0.009	Can Reiners	15	0.016 ± 0.010	
Marruecos	45	0.015 ± 0.009	Suiza	69	0.014 ± 0.009	
Suiza	69	0.015 ± 0.009	Plaça Vella	23	0.014 ± 0.009	
País Vasco	61	0.013 ± 0.008	País Vasco	61	0.013 ± 0.008	
Plaça Vella	23	0.012 ± 0.008	Turquía	75	0.010 ± 0.007	
Pre Románico Ibérico	17	0.012 ± 0.008	Pre Románico Ibérico	17	0.010 ± 0.007	
Aldaieta	56	0.009 ± 0.007	Aldaieta	56	0.008 ± 0.005	
Turquía	75	1.716 ± 1.013	Cerdeña antigua	23	0.0027 ± 0.002	
Cerdeña antigua	23	0.0021 ± 0.002				

Tabla XXIII - Diversidad nucleotídica y su desviación estándar ($\pi \pm de$) estimada para los distintos fragmentos de cada población. En azul y ocre se resaltan los valores

mayores y menores, respectivamente.

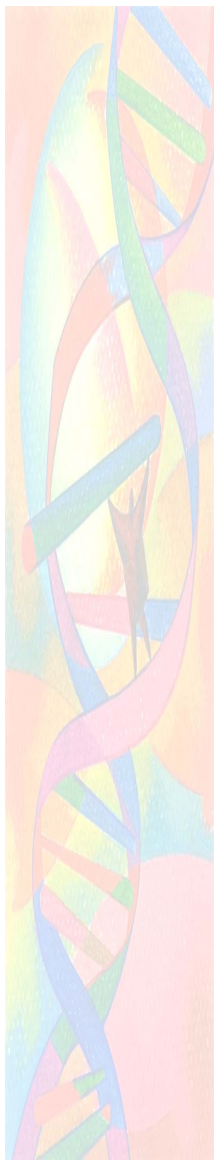
Poblaciones		Fragmento 126		Poblaciones		Fragmento 156
n		pb		n		pb
		($\theta_n \pm de$)			($\theta_n \pm de$)	
Egipto	28	3.572 ± 1.870	Egipto	28	4.847 ± 2.437	
Israel	116	3.395 ± 1.750	Israel	116	4.440 ± 2.205	
Túnez	154	3.187 ± 1.657	Túnez	154	4.248 ± 2.118	
Siria	69	3.187 ± 1.668	Próximo Oriente	18	4.296 ± 2.231	
Grecia	25	3.205 ± 1.712	Irak	52	4.191 ± 2.116	
Irak	52	3.497 ± 1.811	Siria	69	4.020 ± 2.033	
Próximo Oriente	18	3.094 ± 1.685	Grecia	25	3.801 ± 1.979	
Toscana	47	2.811 ± 1.511	Toscana	47	3.470 ± 1.802	
Francia	71	2.655 ± 1.433	Francia	71	3.213 ± 1.679	
Valencia	39	2.564 ± 1.406	Argelia	81	3.213 ± 1.676	
Cataluña	39	2.506 ± 1.380	Cataluña	39	3.148 ± 1.666	
Ibiza	49	2.545 ± 1.391	Chuetas	44	3.127 ± 1.653	
Mallorca	41	2.492 ± 1.372	Sur de Portugal	59	3.108 ± 1.636	
Sur de Portugal	59	2.491 ± 1.363	Georgia	44	3.060 ± 1.623	
Georgia	44	2.440 ± 1.347	Valencia	39	3.038 ± 1.617	
Chuetas	44	2.418 ± 1.337	Pedroches	144	2.992 ± 1.572	
Cerdeña	115	2.304 ± 1.271	Mallorca	41	2.974 ± 1.587	
Pedroches	144	2.275 ± 1.256	Menorca	41	2.941 ± 1.572	
Menorca	41	2.187 ± 1.235	Ibiza	49	2.887 ± 1.543	
Albania	42	2.147 ± 1.217	Son Real	22	2.653 ± 1.470	
Can Reiners	15	2.114 ± 1.247	Albania	42	2.634 ± 1.435	
Son Real	22	1.996 ± 1.170	Marruecos	45	2.625 ± 1.429	
Argelia	81	1.929 ± 1.108	Cerdeña	115	2.619 ± 1.410	
Marruecos	45	1.898 ± 1.103	Can Reiners	15	2.614 ± 1.480	
Suiza	69	1.890 ± 1.092	Suiza	69	2.347 ± 1.296	
S'illot des Porros	11	1.806 ± 1.125	Plaça Vella	23	2.300 ± 1.307	
País Vasco	61	1.674 ± 0.996	País Vasco	61	2.077 ± 1.178	
Plaça Vella	23	1.527 ± 0.950	Turquía	75	1.716 ± 1.013	
Pre Románico Ibérico	17	1.478 ± 0.939	Pre Románico Ibérico	17	1.589 ± 0.992	
Aldaieta	56	1.218 ± 0.787	Aldaieta	56	1.322 ± 0.835	
Turquía	75	0.914 ± 0.640	Cerdeña antigua	23	0.446 ± 0.412	
Cerdeña antigua	23	0.275 ± 0.308				

Tabla XIV- Nº medio de distribución por parejas y su desviación estándar ($\theta_n \pm de$), estimada para los distintos fragmentos de cada población. En azul y amarillo se resaltan los valores mayores y menores, respectivamente.

4.4.3 RECONSTRUCCIÓN FILOGENÉTICA.

4.4.3.1 DISTANCIAS GENÉTICAS.

En las tablas XXV y XXVI se muestran las matrices diagonales con los valores de las distancias genéticas basadas en la transformación de Reynolds del estadístico F_{st} (Reynolds *et al.*, 1983), calculados por parejas de poblaciones. El cálculo se realizó a partir de las secuencias de los fragmentos de 126 y 156 pb de la región hipervariable I del mtDNA para las series antiguas estudiadas y las poblaciones empleadas para la comparación, detalladas en la tabla del capítulo de Muestras y Metodología. El patrón de distancias que se observa guarda bastante semejanza con el obtenido con las frecuencias de haplogrupos.

Si se toma en cuenta la distancia genética obtenida con las secuencias de 126 pb (tabla XXVI), se observa que **SR** exhibe una distancia nula con **IP** y **CR**, quedando la distancia entre estas últimas con un valor estimado de 0.0425.

En el contexto general, la población de Argelia es la más distante en relación a las series antiguas mallorquinas analizadas (**SR**/Ar = 0.0764, **IP**/Ar = 0.2323 y **CR**/Ar = 0.0559). Cabe destacar que las menores distancias genéticas varían en relación a las tres series analizadas. Así observamos que la serie Pre Románica Ibérica y las poblaciones contemporáneas del Sur de Portugal, Toscana, Cerdeña e Israel presentan menores distancias en relación a **SR**, mientras que Cataluña, Mallorca, Valencia, Grecia y Francia exhiben distancias nulas con respecto a la serie antigua de **IP**. De las tres series analizadas se observa que la mayoría de las poblaciones de comparación presentan distancias menores e inclusive nulas con respecto a **CR**.

De igual manera, la distancia genética obtenida con las secuencias de 156 pb (tabla XXVII), es nula entre las series **SR** y **CR** y de estas dos series antiguas, **CR** mantiene, en el contexto general, una distancia muy reducida con todas las poblaciones de comparación.

	1SR	1IP	1CR	1PV	1PRM	1PO	1CE	1AD	2CA	2PE	1MJ	1VL	2IQ	2MN	2CH	2TS
1SR	0,0000															
1IP	0,0000	0,0000														
1CR	0,0000	0,0261	0,0000													
1PV	0,0375	0,0000	0,0000	0,0000												
1PRM	0,0058	0,0639	0,0000	0,0000	0,0000											
1PO	0,0406	0,0395	0,0000	0,0200	0,0149	0,0000										
1CE	0,0416	0,2193	0,0000	0,0290	0,0186	0,0458	0,0000									
1AD	0,0863	0,1155	0,0440	0,0683	0,0309	0,1089	0,0516	0,0000								
2CA	0,0219	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0230	0,0000	0,0279	0,0000							
2PE	0,0275	0,0339	0,0000	0,0000	0,0000	0,0343	0,0180	0,0572	0,0311	0,0000						
1MJ	0,0309	0,0000	0,0020	0,0000	0,0017	0,0391	0,0249	0,0229	0,0000	0,0322	0,0000					
1VL	0,0108	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0126	0,0000	0,0422	0,0000	0,0262	0,0000	0,0000				
2IQ	0,0415	0,0263	0,0000	0,0097	0,0000	0,0127	0,0062	0,0020	0,0206	0,0351	0,0138	0,0185	0,0000			
2MN	0,0108	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0224	0,0163	0,0403	0,0073	0,0000	0,0109	0,0067	0,0110	0,0000		
2CH	0,0359	0,0213	0,0118	0,0252	0,0000	0,0623	0,0386	0,0070	0,0257	0,0294	0,0069	0,0329	0,0076	0,0121	0,0000	
2TS	0,0044	0,0051	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0289	0,0015	0,0093	0,0137	0,0000	0,0061	0,0000	0,0262	0,0000
2IBZ	0,0721	0,0000	0,0396	0,0379	0,0686	0,0377	0,0634	0,1144	0,0199	0,0838	0,0379	0,0140	0,0636	0,0607	0,1055	0,0298
2GR	0,0110	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0169	0,0442	0,0000	0,0223	0,0000	0,0000	0,0051	0,0000	0,0170	0,0000
2VAS	0,0193	0,0305	0,0000	0,0000	0,0000	0,0428	0,0000	0,0365	0,0085	0,0099	0,0170	0,0044	0,0180	0,0001	0,0259	0,0000
2PS	0,0038	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0088	0,0000	0,0362	0,0000	0,0147	0,0051	0,0000	0,0229	0,0025	0,0310	0,0000
2EG	0,0344	0,0551	0,0019	0,0153	0,0115	0,0156	0,0415	0,0947	0,0513	0,0175	0,0573	0,0444	0,0262	0,0091	0,0387	0,0193
2Ar	0,0764	0,2001	0,0559	0,0894	0,0914	0,0434	0,0693	0,1236	0,0679	0,0738	0,1136	0,0808	0,0819	0,0735	0,1120	0,0501
2pl	0,0091	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0159	0,0070	0,0201	0,0128	0,0000	0,0039	0,0004	0,0183	0,0000
2sy	0,0121	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0146	0,0000	0,0082	0,0028	0,0205	0,0124	0,0016	0,0003	0,0000	0,0111	0,0000
2Mr	0,0372	0,0539	0,0079	0,0531	0,0425	0,0300	0,0188	0,0553	0,0175	0,0547	0,0480	0,0252	0,0404	0,0499	0,0603	0,0162
2TK	0,0533	0,1887	0,0000	0,0418	0,0138	0,0660	0,0000	0,0707	0,0304	0,0421	0,0417	0,0124	0,0316	0,0414	0,0653	0,0055
2TZ	0,0097	0,0389	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0339	0,0163	0,0133	0,0269	0,0113	0,0217	0,0006	0,0279	0,0033
2SD	0,0066	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0315	0,0000	0,0409	0,0039	0,0125	0,0087	0,0000	0,0329	0,0000	0,0320	0,0028
2FR	0,0144	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0247	0,0015	0,0343	0,0073	0,0071	0,0047	0,0000	0,0219	0,0000	0,0162	0,0000
2SZ	0,0377	0,0460	0,0000	0,0023	0,0000	0,0260	0,0096	0,0700	0,0239	0,0160	0,0255	0,0197	0,0327	0,0061	0,0464	0,0111
2GE	0,0201	0,0000	0,0000	0,0059	0,0000	0,0107	0,0222	0,0601	0,0036	0,0358	0,0163	0,0000	0,0209	0,0120	0,0381	0,0000
2Ab	0,0151	0,0000	0,0000	0,0014	0,0000	0,0344	0,0000	0,0295	0,0104	0,0255	0,0155	0,0007	0,0155	0,0099	0,0251	0,0000

Tabla XXV. Matriz de Distancias genéticas de Reynolds (Reynolds *et al.*, 1987), construidas a partir de las secuencias de un fragmento de 126 pb de la HVS-I del mtDNA entre las series antiguas analizadas y las poblaciones de comparación, descritas en la tabla V y figura 28. Se destacan con subrayado las mayores distancias respecto a las series antiguas mallorquinas. Con el **nº 1** se señalan las series antiguas: **SR**-Son Real **IP**-S'Illot des Parros, **CR**-Can Reiners, **PO**-Próximo Oriente Antiguo, **PRM**-Pre Románico Ibérico, **CE**-Cerdeña Antigua y con el **nº 2**, las poblaciones contemporáneas **CA**-Cataluña, **PE**-Pedroches, **MJ**-Mallorca, **VL**-Valencia, **IQ**-Irak, **MN**-Menorca, **CH**-Chuetas, **TS**-Toscana, **IBZ**-Ibiza, **GR**-Grecia, **VAS**-País Vasco, **PS**- Sur de Portugal, **EG**-Egipto, **AR**-Argelia, **PI**-Israel-Palestina, **SY**-Siria, **MR**-Marruecos, **TK**-Turquía, **TZ**-Tunez, **SD**-Cerdeña contemporánea, **FR**-Francia, **SZ**-Suiza, **GE**-Georgia, **AB**-Albania.

	2IBZ	2GR	2VAS	2PS	2EG	2Ar	2pl	2sy	2Mr	2TK	2TZ	2SD	2FR	2SZ	2GE	2Ab
1SR																
1IP																
1CR																
1PV																
1PRM																
1PO																
1CE																
1AD																
2CA																
2PE																
1MJ																
1VL																
2IQ																
2MN																
2CH																
2TS																
2IBZ	0,0000															
2GR	0,0165	0,0000														
2VAS	0,0699	0,0087	0,0000													
2PS	0,0235	0,0011	0,0003	0,0000												
2EG	0,1007	0,0179	0,0401	0,0376	0,0000											
2Ar	0,0935	0,0909	0,0900	0,0576	0,0824	0,0000										
2pl	0,0307	0,0000	0,0032	0,0020	0,0194	0,0429	0,0000									
2sy	0,0440	0,0000	0,0016	0,0038	0,0228	0,0519	0,0000	0,0000								
2Mr	0,0505	0,0500	0,0413	0,0148	0,0852	0,0237	0,0143	0,0230	0,0000							
2TK	0,0980	0,0263	0,0096	0,0086	0,0792	0,1301	0,0088	0,0143	0,0694	0,0000						
2TZ	0,0457	0,0088	0,0118	0,0076	0,0160	0,0243	0,0084	0,0055	0,0179	0,0273	0,0000					
2SD	0,0477	0,0081	0,0027	0,0000	0,0377	0,0721	0,0123	0,0138	0,0344	0,0152	0,0125	0,0000				
2FR	0,0538	0,0016	0,0000	0,0000	0,0351	0,0922	0,0087	0,0113	0,0456	0,0189	0,0213	0,0042	0,0000			
2SZ	0,0905	0,0187	0,0095	0,0110	0,0358	0,1153	0,0227	0,0229	0,0766	0,0213	0,0251	0,0117	0,0059	0,0000		
2GE	0,0267	0,0000	0,0191	0,0003	0,0406	0,0921	0,0023	0,0061	0,0520	0,0369	0,0175	0,0123	0,0078	0,0274	0,0000	
2Ab	0,0745	0,0114	0,0000	0,0013	0,0458	0,1021	0,0048	0,0083	0,0416	0,0008	0,0219	0,0046	0,0005	0,0135	0,0131	0,0000

Continuación - Tabla XXV. Matriz de Distancias genéticas de Reynolds (Reynolds *et al.*, 1987), construidas a partir de las secuencias de un fragmento de 126 pb de la HVS-I del mtDNA entre las series antiguas analizadas y las poblaciones de comparación, descritas en la tabla V y figura 28. **SR**-Son Real **IP**-S'Illot des Porros, **CR**-Can Reiners, **PO**-Próximo Oriente Antiguo, **PRM**-Pre Románico Ibérico, **CE**-Cerdeña Antigua y con el **nº 2**, las poblaciones contemporáneas **CA**-Cataluña, **PE**-Pedroches, **MJ**-Mallorca, **VL**-Valencia, **IQ**-Irak, **MN**-Menorca, **CH**-Chuetas, **TS**-Toscana, **IBZ**-Ibiza, **GR**-Grecia, **VAS**-País Vasco, **PS**- Sur de Portugal, **EG**-Egipto, **AR**-Argelia, **PI**-Israel-Palestina, **SY**-Siria, **MR**-Marruecos, **TK**-Turquía, **TZ**-Tunez, **SD**-Cerdeña contemporánea, **FR**-Francia, **SZ**-Suiza, **GE**-Georgia, **AB**-Albania.

	1SR	1CR	1PV	1PRM	1PO	1CE	1AD	2CA	2PE	2MJ	2VL	2IQ	2MN	2CH	2TS
1SR	0,0000														
1CR	0,0000	0,0000													
1PV	0,0280	0,0000	0,0000												
1PRM	0,0024	0,0000	0,0009	0,0000											
1PO	0,0427	0,0011	0,0297	0,0463	0,0000										
1CE	0,0206	0,0000	0,0383	0,0241	0,0770	0,0000									
1AD	0,0737	0,0478	0,0741	0,0270	0,1500	0,0465	0,0000								
2CA	0,0126	0,0000	0,0000	0,0000	0,0382	0,0000	0,0247	0,0000							
2PE	0,0201	0,0000	0,0000	0,0000	0,0477	0,0160	0,0473	0,0261	0,0000						
2MJ	0,0272	0,0089	0,0000	0,0000	0,0545	0,0280	0,0255	0,0019	0,0232	0,0000					
2VL	0,0112	0,0000	0,0052	0,0000	0,0557	0,0000	0,0346	0,0005	0,0253	0,0025	0,0000				
2IQ	0,0319	0,0000	0,0083	0,0000	0,0365	0,0039	0,0000	0,0182	0,0274	0,0101	0,0158	0,0000			
2MN	0,0042	0,0000	0,0000	0,0000	0,0251	0,0158	0,0413	0,0082	0,0000	0,0088	0,0147	0,0113	0,0000		
2CH	0,0215	0,0017	0,0203	0,0000	0,0539	0,0298	0,0132	0,0193	0,0213	0,0080	0,0335	0,0087	0,0056	0,0000	
2TS	0,0000	0,0000	0,0029	0,0000	0,0120	0,0000	0,0258	0,0000	0,0119	0,0172	0,0019	0,0063	0,0013	0,0189	0,0000
2IBZ	0,0613	0,0371	0,0416	0,0577	0,0681	0,0557	0,1005	0,0173	0,0675	0,0334	0,0145	0,0517	0,0554	0,0896	0,0272
2GR	0,0108	0,0000	0,0195	0,0145	0,0192	0,0179	0,0552	0,0042	0,0350	0,0177	0,0090	0,0164	0,0116	0,0190	0,0000
2VAS	0,0186	0,0000	0,0061	0,0000	0,0818	0,0000	0,0326	0,0135	0,0095	0,0142	0,0048	0,0133	0,0040	0,0277	0,0048
2PS	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0324	0,0000	0,0285	0,0000	0,0136	0,0075	0,0000	0,0179	0,0040	0,0241	0,0000
2EG	0,0574	0,0155	0,0757	0,0730	0,0354	0,0796	0,1578	0,0758	0,0802	0,1133	0,0993	0,0784	0,0580	0,0655	0,0454
2Ar	<u>0,0799</u>	<u>0,0619</u>	<u>0,0954</u>	0,0989	0,0915	0,0763	0,1312	0,0821	0,0918	0,1227	0,0879	0,0976	0,0959	0,1106	0,0700
2pl	0,0046	0,0000	0,0106	0,0000	0,0084	0,0000	0,0211	0,0073	0,0267	0,0238	0,0112	0,0150	0,0065	0,0151	0,0000
2sy	0,0058	0,0000	0,0068	0,0000	0,0266	0,0000	0,0134	0,0026	0,0232	0,0207	0,0095	0,0080	0,0057	0,0095	0,0000
2Mr	0,0261	0,0000	0,0577	0,0506	0,0467	0,0164	0,0603	0,0167	0,0553	0,0584	0,0350	0,0443	0,0506	0,0496	0,0132
2TK	0,0261	0,0000	0,0359	0,0085	0,0721	0,0000	0,0551	0,0252	0,0381	0,0395	0,0186	0,0299	0,0292	0,0462	0,0067
2TZ	0,0128	0,0000	0,0214	0,0187	0,0118	0,0084	0,0484	0,0232	0,0321	0,0472	0,0336	0,0415	0,0159	0,0288	0,0097
2SD	0,0076	0,0000	0,0000	0,0000	0,0696	0,0000	0,0356	0,0055	0,0128	0,0101	0,0025	0,0271	0,0047	0,0310	0,0062
2FR	0,0085	0,0000	0,0000	0,0000	0,0404	0,0000	0,0285	0,0046	0,0059	0,0043	0,0018	0,0177	0,0000	0,0108	0,0000
2SZ	0,0274	0,0000	0,0090	0,0000	0,0563	0,0056	0,0574	0,0205	0,0142	0,0211	0,0165	0,0257	0,0082	0,0391	0,0106
2GE	0,0111	0,0000	0,0059	0,0000	0,0255	0,0140	0,0504	0,0012	0,0256	0,0122	0,0000	0,0148	0,0069	0,0272	0,0000
2Ab	0,0072	0,0000	0,0144	0,0000	0,0489	0,0000	0,0303	0,0064	0,0254	0,0224	0,0079	0,0172	0,0125	0,0189	0,0000

Tabla XXVL. Matriz de Distancias genéticas de Reynolds (Reynolds *et al.*, 1987), construidas a partir de las secuencias de un fragmento de 126 pb de la HVS-I del mtDNA entre las series antiguas analizadas y las poblaciones de comparación, descritas en la tabla V y figura 28. Se destacan con subrayado las mayores distancias respecto a las series antiguas mallorquinas. Con el **nº 1** se señalan las series antiguas: **SR**-Son Real, **CR**-Can Reiners, **PO**-Próximo Oriente Antiguo, **PRM**-Pre Románico Ibérico, **CE**-Cerdeña Antigua y con el **nº 2**, las poblaciones contemporáneas **CA**-Cataluña, **PE**-Pedroches, **MJ**-Mallorca, **VL**-Valencia, **IQ**-Irak, **MN**-Menorca, **CH**-Chuetas, **TS**-Toscana, **IBZ**-Ibiza, **GR**-Grecia, **VAS**-País Vasco, **PS**- Sur de Portugal, **EG**-Egipto, **AR**-Argelia, **PI**-Israel-Palestina, **SY**-Siria, **MR**-Marruecos, **TK**-Turquía, **TZ**-Tunez, **SD**-Cerdeña contemporánea, **FR**-Francia, **SZ**-Suiza, **GE**-Georgia, **AB**-Albania.

	2IBZ	2GR	2VAS	2PS	2EG	2Ar	2pl	2sy	2Mr	2TK	2TZ	2SD	2FR	2SZ	2GE	2Ab
1SR																
1CR																
1PV																
1PRM																
1PO																
1CE																
1AD																
2CA																
2PE																
2MJ																
2VL																
2IQ																
2MN																
2CH																
2TS																
2IBZ	0,0000															
2GR	0,0284	0,0000														
2VAS	0,0614	0,0356	0,0000													
2PS	0,0203	0,0057	0,0036	0,0000												
2EG	0,1391	0,0258	0,1220	0,0750	0,0000											
2Ar	0,1059	0,0961	0,1164	0,0783	0,1115	0,0000										
2pl	0,0332	0,0000	0,0192	0,0048	0,0280	0,0614	0,0000									
2sy	0,0416	0,0000	0,0159	0,0047	0,0367	0,0631	0,0000	0,0000								
2Mr	0,0517	0,0355	0,0598	0,0178	0,0792	0,0376	0,0089	0,0149	0,0000							
2TK	0,0809	0,0282	0,0166	0,0078	0,1135	0,1282	0,0120	0,0172	0,0549	0,0000						
2TZ	0,0564	0,0052	0,0412	0,0197	0,0158	0,0481	0,0069	0,0069	0,0146	0,0362	0,0000					
2SD	0,0410	0,0237	0,0044	0,0000	0,1031	0,1025	0,0211	0,0185	0,0448	0,0231	0,0342	0,0000				
2FR	0,0452	0,0094	0,0024	0,0000	0,0755	0,1059	0,0120	0,0116	0,0442	0,0181	0,0308	0,0042	0,0000			
2SZ	0,0754	0,0296	0,0083	0,0090	0,0949	0,1226	0,0263	0,0238	0,0724	0,0199	0,0398	0,0109	0,0035	0,0000		
2GE	0,0234	0,0037	0,0165	0,0000	0,0788	0,1021	0,0059	0,0068	0,0478	0,0270	0,0273	0,0106	0,0039	0,0205	0,0000	
2Ab	0,0660	0,0094	0,0121	0,0004	0,0651	0,1042	0,0024	0,0037	0,0321	0,0048	0,0212	0,0090	0,0009	0,0143	0,0104	0,0000

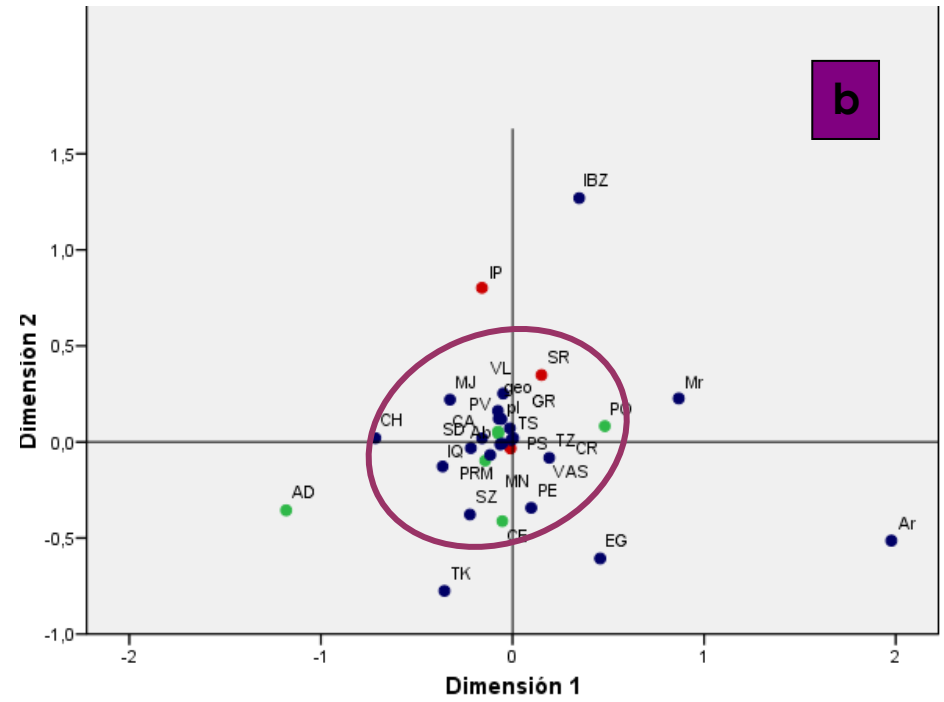
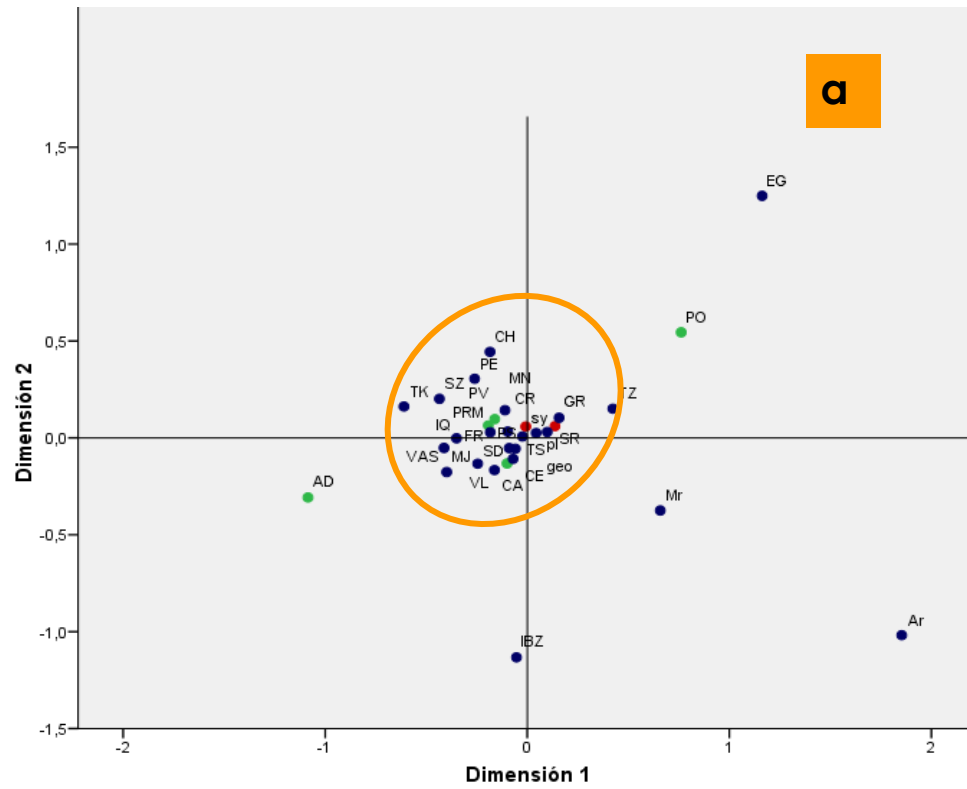
Continuación - Tabla XXVI. Matriz de Distancias genéticas de Reynolds (Reynolds *et al.*, 1987), construidas a partir de las secuencias de un fragmento de 156 pb de la HVS-I del mtDNA entre las series antiguas analizadas y las poblaciones de comparación, descritas en la tabla V y figura 28. Con el **nº 1** se señalan las series antiguas: **SR**-Son Real, **CR**-Can Reiners, **PO**-Próximo Oriente Antiguo, **PRM**-Pre Románico Ibérico, **CE**-Cerdeña Antigua y con el **nº 2**, las poblaciones contemporáneas **CA**-Cataluña, **PE**-Pedroches, **MJ**-Mallorca, **VL**-Valencia, **IQ**-Irak, **MN**-Menorca, **CH**-Chuetas, **TS**-Toscana, **IBZ**-Ibiza, **GR**-Grecia, **VAS**-País Vasco, **PS**- Sur de Portugal, **EG**-Egipto, **AR**-Argelia, **PI**-Israel-Palestina, **SY**-Siria, **MR**-Marruecos, **TK**-Turquía, **TZ**-Tunez, **SD**-Cerdeña contemporánea, **FR**-Francia, **SZ**-Suiza, **GE**-Georgia, **AB**-Albania.,

En el análisis de distancias genéticas empleando la distribución de frecuencias de haplogrupos, las poblaciones contemporáneas de las Islas Baleares presentaron un comportamiento similar en relación con las series antiguas analizadas en este estudio.

En relación con la población mallorquina actual, destaca que las series de **IP** y **CR** exhibieron distancias nulas mientras que **SR**, mostró una distancia genética menor, a las obtenidas para el conjunto de poblaciones contemporáneas del Archipiélago Balear.

Para apreciar de forma gráfica ambas matrices de distancias genéticas (Reynolds *et al.*, 1983) estimadas a partir de los grupos de secuencias de 126 pb y 156 pb, para cada par de las poblaciones de comparación, se realizó un escalamiento multidimensional (MSD) (gráfico 8). En los gráficos obtenidos se observa que la mayoría de las poblaciones, incluyendo **SR** y **CR**, se agrupan (círculos rojo y amarillo), tanto en la dimensión 1 como en la 2, haciendo patente las reducidas distancias genéticas que existen entre ellas, mientras que la serie antigua de **IP** exhibe una mayor distancia con las dos series antiguas mallorquinas y con la mayoría de las poblaciones de referencia, quedando alejada del núcleo central.

Destaca además en ambos gráficos la posición de la población de Argelia, localizada en el cuadrante inferior izquierdo, siendo la población más distante (tablas XXV y XXVI). Sin embargo existe otro grupo de poblaciones a los alrededores del núcleo central que comparten las poblaciones que se comportan de forma más homogénea y entre ellas se encuentran Ibiza (Archipiélago Balear), Aldaieta (serie antigua de la Península Ibérica), Marruecos y Egipto (Norte de África).



● Poblaciones presente estudio, ● Poblaciones Antiguas, ● Poblaciones Actuales

Gráfico 8. - Gráficos de Escalamiento Multidimensional realizados a partir de las Matrices de Reynolds para los fragmentos de secuencias de 156 pb (a) y de 126 pb (b).

4.4.3.2 REDES MEDIAS (NETWORKS) .

A partir de las secuencias nucleotídicas, se construyeron redes filogenéticas mediante el algoritmo *Median Joining Network* (Bandelt *et al.*, 1995) a fin de observar los haplotipos compartidos y derivados entre las series antiguas de la Bahía de Alcudia analizadas en este estudio, así como los de las poblaciones antiguas y modernas empleadas para la comparación. La Figura 43, muestra la distribución geográfica de las poblaciones del arco mediterráneo utilizadas para la construcción de las redes medias o *Networks*, asignándole un color a cada región geográfica.



Fig. 43. Distribución geográfica de las poblaciones del arco mediterráneo utilizadas para la construcción de las redes medias o *Networks* (@graficmaps.com).

Para lograr una mejor interpretación de los datos, en este análisis se le agregó a cada haplotipo compartido entre las poblaciones estudiadas, un n° que

representa la sumatoria de la frecuencia absoluta en el total de poblaciones (Tabla XXVII).

INDIVIDUOS	CÓDIGO ^(a)	MOTIVOS ^(b)
SR/54.2	SR01H	
SR/1	SR 02H	
CR/93.1	CR 23H	
CR/31.1	CR 24H	
IPB-33 1962	IP 38H	
SR/1-67-A(5)	SR 06PHV	CRS
SR/3-67-A	SR 07J	
SR/43.1 (R15)	SR 08J	
SR/1-67-A	SR 09J	
CR/17.1	CR 32U	
CR/107.1	CR 33U	
IP B-7	IP 41U	
IP SW-97-3	IP 39H	16378T /CRS
SR/1-67-A(1)	SR 03H	16221TT
SR/22.D	SR 04H	16291T, 16293G
SR/2.3	SR 05H	16278T
CR/32.1	CR 25H	16274A
CR/17.2	CR 26H	16290T
CR/E-89	CR27H	16266T, 16294T, 16311C
CR/32	CR 28H	16291T
IP CN-14	IP 40H	16223T, 16262T, 16293G
CR/83.1	CR 36V	16261T 16298T
SR/1-67-A(2)	SR 10J	16278T
SR/43.5	SR 11J	16242T
SR/47.3	SR 15T	16292T, 16294T, 16344T
CR/47.57	CR 34U	16260T, 16278T
IP BC-16	IP 42U	16325C
IP C-20	IP 43U	16325C, 16355T, 16356C
SR/13	SR 17U5	
SR/70.1	SR 18U5	
SR/Sep-74	SR 19U5	16270T
IP C 1964-42'	IP 46U5	
SR/54.1.	SR 16U5	16270T, 16290T, 16292T, 16294T
IP B-2	IP 44U5	16257Y(AÓT); 16270T
IP B-5	IP 45U5	16270T, 16304C
IP C-56'	IP 47U5	16261T, 16270T
IP M-15	IP 48U5	16270T, 16378T
CR/131.1	CR 35U5a1a	16256T, 16270T
SR/75.1	SR 12K	
SR/53.4	SR 13K	16224C, 16311C
CR/169.1	CR30K	
SR/29.05	SR 14K	16311C, 16327T
SR/4-67(2)	SR 22X	16223T, 16278T
CR/67.1	CR 29.1	16223T
SR/Sep-72	SR 20W	
SR/Sep-68	SR 21W	16223T, 16292T
CR/23.1	CR 37W	
CR/70.1	CR 31L3	16223T

Tabla XXVII - a) Códigos asignados a cada individuo. **b)** motivos presentes en las secuencias de las tres poblaciones analizadas en este estudio. Los haplotipos únicos se marcan con filas de color salmón. En negrita se señalan los individuos con las mutaciones 16378T, casos que se detallan más adelante.

Tal como se expresó en el apartado 3.7 del capítulo de Muestras y Metodología, la construcción de las redes medias se basó en dos tipos de base de datos: *Binary data*, para el análisis filogenético de la serie talayótica de **IP** (Finnilä *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 2002, han empleado este tipo de datos para identificar mutaciones paralelas) y *DNA nucleotide data*, para realizar el mismo análisis en las series **SR** y **CR**.

En la tabla XXVII, se señala en negrita dos de los individuos de la serie de S'Illot des Porros que presentaron la mutación 16378T, quedando excluida dicha mutación por la extensión de ambos fragmentos hasta la posición 16365, por lo que al realizar los distintos análisis, el individuo **IP SW-97-3** quedó incorporado al nodo CRS para el haplogrupo H. Con respecto al individuo **IP M-15**, que presentó no sólo esta mutación sino también la 16270T, quedó agrupado como U5.

4.4.3.2.1 REDES FILOGENÉTICAS A PARTIR DEL FRAGMENTO DE 156PB (16209-16365)

- HAPLOGRUPO H

Debido al elevado número de secuencias analizadas pertenecientes al **haplogrupo H**, se construyeron dos redes filogenéticas, con dos grupos de poblaciones distintas, en las que figura la serie **IP**, que se encuentra representada sólo por una secuencia. El resto de secuencias recuperadas de haplotipos pertenecientes a **H** de esta serie antigua, quedan excluidas por presentar un menor número de pares de bases.

H (Fig. 44a): agrupa las series de **IP**, **SR** y **CR** y las poblaciones antiguas y contemporáneas de:

- **Península Ibérica** (Cataluña, Valencia, Pedroches País Vasco y Sur de Portugal).
- **Islas Baleares** (Mallorca, Chuetas, Menorca, Ibiza).
- **Poblaciones Antiguas** (Plaça Vella, Pre Románico Ibérico, Aldaieta).

- **Resto de Europa:** Italia (Toscana, Cerdeña), Francia, Suiza, Península Balcánica (Grecia, Albania).
- **África:** Marruecos, Argelia, debido a su cercanía con las poblaciones antiguas de **SR**, **IP** y **CR**.

H (Fig. 44b) : agrupa las series en estudio (**IP**, **SR** y **CR**) y las poblaciones de:

- **Islas Baleares:** Mallorca, Chuetas, Menorca, Ibiza
- **África:** Túnez y Egipto, por estar más alejadas geográficamente.
- **Asia:** Turquía, Georgia, Siria, Israel e Irak y la serie Antigua del Próximo Oriente.

El nodo principal basal de estas redes, (241-SR01H y 97-SR01H), representa el motivo CRS y agrupa un total de 338 secuencias. De este nodo central, derivan el resto de haplotipos. En estas redes, se observa además que los nodos 3-SR03H, representando a la mutación 16221T y el 7-SR05H con el motivo 16278T, son compartidos por la serie talayótica de **SR** con poblaciones contemporáneas de la Península Ibérica, Islas Baleares y Asia y con la serie antigua de la isla de Cerdeña. Por otra parte, **CR** comparte los haplotipos CR25H (con el motivo 16274A) y el CR28H, (con el motivo 16291T), con poblaciones europeas y asiáticas; así como el haplotipo CR26H que es compartido con poblaciones de la Península ibérica y del resto de Europa. Sin embargo, si la red se realiza con poblaciones asiáticas y resto de poblaciones africanas, este último haplotipo se convierte en haplotipo único, lo que supondría que se trata de una mutación exclusiva para poblaciones europeas.

Se observan además, tres nodos que representan haplotipos únicos dentro del grupo de las series mallorquinas analizadas: el SR04H (con el haplotipo 16291T-16293G), presenta dos posibles orígenes ancestrales: la mutación 16293G que une SR04H al nodo 6-CR28H y por otra parte, la mutación 16291T, que separa a este haplotipo del nodo PE110H. En todo caso, este haplotipo se encuentra a dos mutaciones de la secuencia de mayor frecuencia (CRS), representada por el nodo 241-SR07H.

En el caso concreto de este haplotipo, las mutaciones 16291T y 16293G son consideradas por Gilbert y colaboradores (2005), como cambios nucleotídicos con un daño *post mortem* relativamente bajo, lo que induce a pensar que ambas vías evolutivas, son posibles.

El nodo IP40H (con el motivo 16223T, 16262T y 16293G) se origina de un nodo que representa una secuencia ancestral hipotética producto de la fusión de la mutación 16293G al nodo CE16H (que se observa en 2 individuos de la serie de Cerdeña antigua y que contiene la mutación 16223T) y de la mutación 16223T, que se une al nodo PE110H.

De igual manera que el caso anterior, la mutación 16223T, representa un *hot-spot* mutacional (Excoffier y Yang, 1999; Stoneking, 2000), por lo que es un sitio inestable con una alta tasa de mutación y además es considerado por Gilbert y colaboradores (2005), como un cambio nucleotídico que presenta una alta ocurrencia de daño *post mortem*. No obstante, esta posibilidad puede verse reducida al observar que esta mutación está presente en otras poblaciones formando parte de otros haplotipos (Richards *et al.*, 2000).

De todos modos, esta situación reduce en parte la posibilidad de que el nodo PE110H, represente la base ancestral de este haplotipo y por lo tanto, el origen se sitúe en el nodo CE16H, que agrupa a 2 individuos de la serie antigua de Cerdeña. Por otra parte, al analizar el haplotipo CR27H (con el motivo 16266T, 16294T, 16311C), se observa que su origen está en un nodo que representa una secuencia ancestral hipotética, pudiéndose encontrar dos mutaciones (16294T y la 16311C) que lo separan del nodo de mayor frecuencia (241-SR07H – CRS). Sin embargo, este nodo hipotético se une ó separa del nodo PRM02H, a través de la mutación 16294T. En ambos casos se crea la disyuntiva al determinar el origen ancestral de este haplotipo, dado que ambas mutaciones son consistentes con un daño molecular *post mortem* relativamente bajo según Gilbert y colaboradores (2005) y con una alta tasa mutacional *in vivo* para Excoffier y Yang (1999). En todo caso, este haplotipo único se encuentra

separado del nodo CRS que agrupa la mayor frecuencia (241-SR07H) por medio de tres mutaciones.

- HAPLOGRUPOS PHV, HV, PREV Y V:

La red filogenética que agrupa los haplogrupos PHV, HV, PreV y V (Fig. 45), presenta un nodo central (8-6PHV) con el motivo basal CRS, que comparte la Población de **SR** con al menos una población de cada continente: Europa (Pedroches, Cerdeña); África (Túnez); y Asia (Turquía). De este nodo deriva el nodo PV21V, que representa al haplotipo 16261T y 16298C, del que se extiende el nodo 3-CR36V representando al haplotipo 16298C que comparte la población de **CR** con poblaciones del Norte de África.

- HAPLOGRUPO U:

El **haplogrupo U** fue analizado a partir de un grupo de poblaciones donde figura la serie **IP**, representada sólo por dos secuencias. El resto de secuencias recuperadas de haplotipos pertenecientes a U de esta serie antigua, quedan excluidas por presentar un menor número de pares de bases. Se observa una red muy ramificada con numerosos nodos que representan haplotipos únicos. El nodo 23-CR32U, que representa el haplotipo CRS, lo comparte la población de **CR** con diversas poblaciones asiáticas, de la Península Ibérica, africanas y del resto de Europa (Fig. 46).

En esta red se observan tres haplotipos únicos: dos de **IP** (IP42U e IP43U) y uno de **CR** (CR34U). El nodo que representa al haplotipo IP42U, se forma una vez que aparece la mutación 16325C, separándose del nodo principal por medio de una sola mutación mientras que el haplotipo IP43U, se desprende de un nodo que representa una secuencia ancestral hipotética, el cual se forma por la conjunción de dos mutaciones: 16325C proveniente del nodo PRM15U y la 16356C que separa a este nodo de secuencia ancestral hipotética del haplotipo IP42U (16325T). Por ambas vías el haplotipo IP43U se encuentra separado de la secuencia más frecuente 23-CR32U (que representa al motivo CRS) por 3 mutaciones.

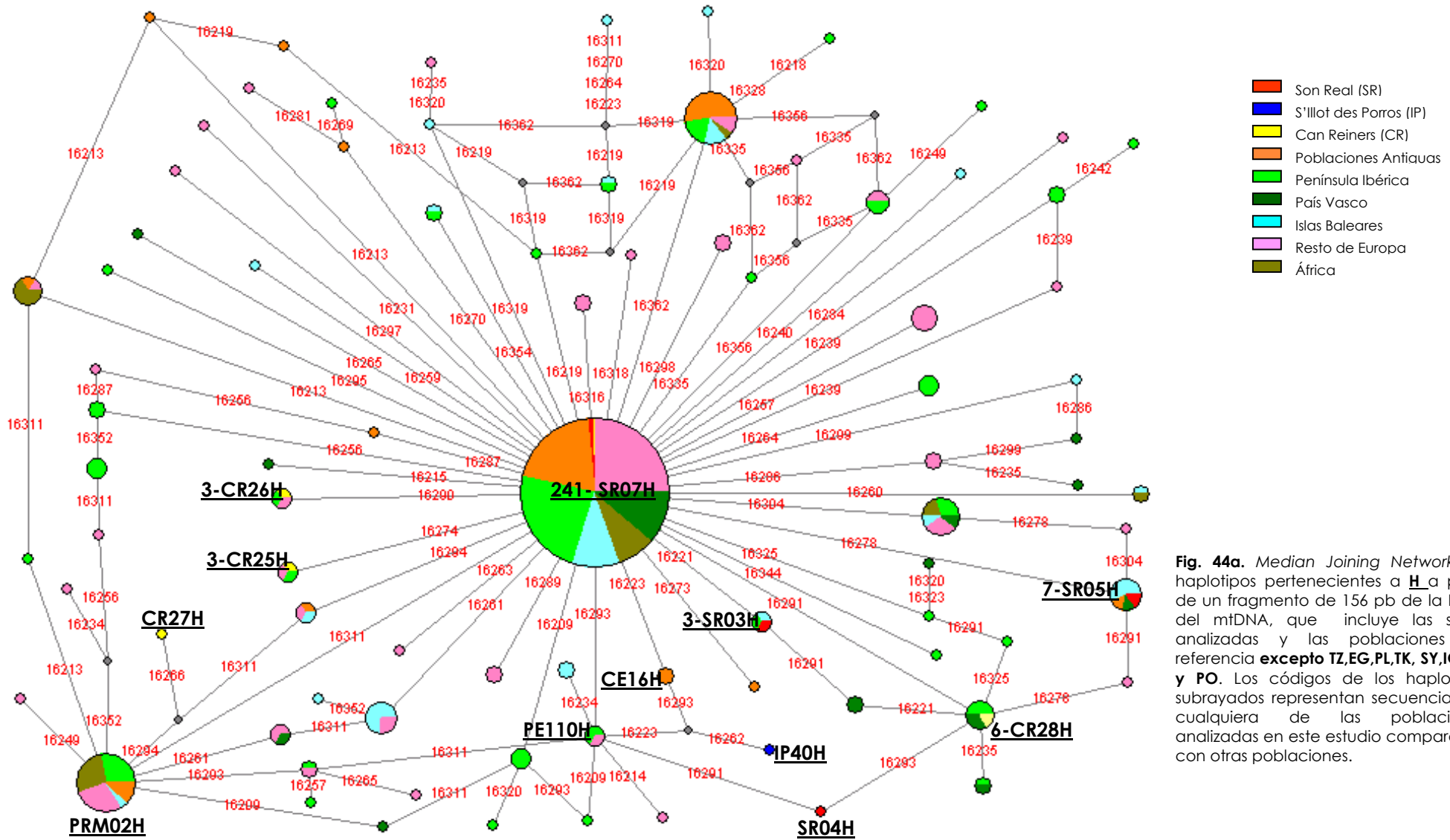


Fig. 44a. Median Joining Network de haplotipos pertenecientes a H a partir de un fragmento de 156 pb de la HVS-I del mtDNA, que incluye las series analizadas y las poblaciones de referencia **excepto TZ,EG,PL,TK, SY,IQ,GE y PO**. Los códigos de los haplotipos subrayados representan secuencias de cualquiera de las poblaciones analizadas en este estudio comparadas con otras poblaciones.

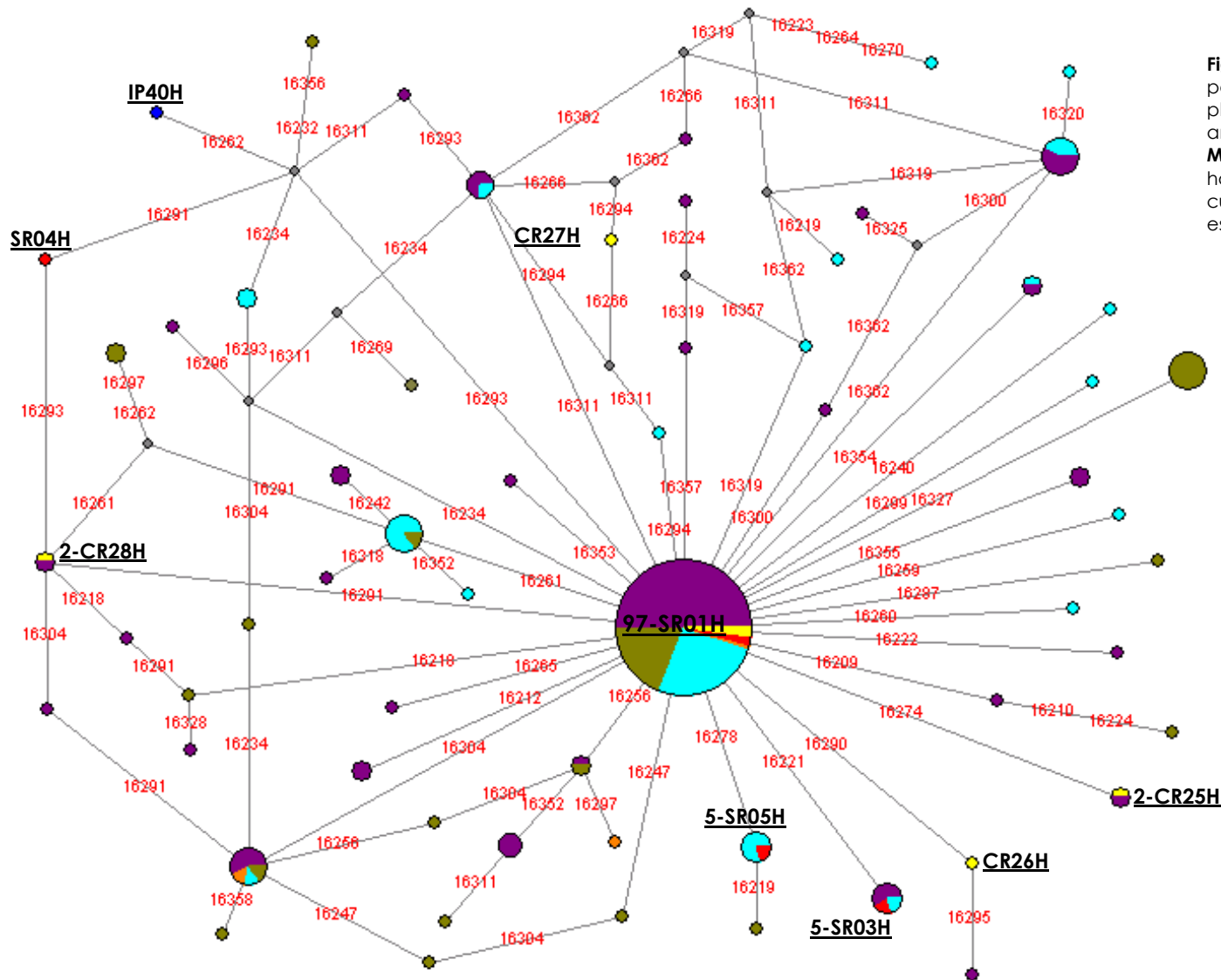


Fig. 44b. Median Joining Network de haplotipos pertenecientes a **H** a partir de un fragmento de 156 pb de la HVS-I del mtDNA, que incluye las series analizadas y las poblaciones de referencia **excepto Mr,AR,TS,SD,FR,SZ,GR y AB**. Los códigos de los haplotipos subrayados representan secuencias de cualquiera de las poblaciones analizadas en este estudio comparadas con otras poblaciones.

- S'Illot des Porros (IP)
- Son Real (SR)
- Can Reiners (CR)
- Islas Baleares
- África
- Asia

Para definir el origen ancestral del haplotipo CR34U, que se encuentra flanqueado por dos nodos que suponen ser la representación de secuencias ancestrales hipotéticas, es necesario considerar 4 vías:

- 1º vía: El nodo hipotético está formado por las mutaciones 16278T y la 16260T.
- 2º vía: El nodo hipotético surgió a partir de las mutaciones 16260T y 16278T.
- 3º vía: La conjunción de las mutaciones 16278T y la 16265G, forman este nodo hipotético. Por esta vía el haplotipo CR34U se separa de la secuencia ancestral por medio de 4 mutaciones: 16265G, 16260T, 16265G, 16278T.
- 4º vía: El nodo hipotético se forma por la acumulación de las mutaciones 16278T, 16343G, 16260T y 16343G.

Esto supone una dificultad para conocer con exactitud el origen ancestral de este haplotipo; más aún cuando la mutación 16278T, incluida en todas las alternativas presentadas, es una de las posiciones definidas por Excoffier y Yang (1999) y Gilbert y colaboradores (2005) como expuestas a altas tasa de mutación y/o daño molecular *post mortem*, respectivamente.

- HAPLOGRUPO U5, U5A1A Y K:

Las relaciones de las secuencias pertenecientes a los sublinajes del haplogrupo U como son U5, U5a1a y K, se presentan en la figura 47, donde se observan nodos representativos de cada haplotipo pertenecientes a cada uno de estos sublinajes. Así vemos que el nodo 17-SR17U5 que representa al motivo basal 16270T, es compartido por **SR** y un grupo de poblaciones antiguas y contemporáneas del colectivo Ibérico, Balear, del Norte de África y de Europa. Se deriva de este nodo la representación de dos haplotipos únicos de

la serie de **SR**: SR16U5 con el motivo 16270T-16290T, 16292T-16294T y el SR14K con los motivos 16311C y 16327T.

Al analizar el primero de ellos (SR16U5), se observa que este haplotipo se encuentra separado del nodo que representa la mayor frecuencia de U5 (17-SR17U5) por medio tres mutaciones, lo que hace suponer que se trata de un haplotipo específico de esa población antigua.

El segundo de los haplotipos (SR14K), se origina de un nodo que representa una secuencia ancestral hipotética, acumulando las mutaciones 16270T, 16224C y 16278T. De estas tres posiciones la 16270T (aunque representa el motivo basal para el haplogrupo U5), y la 16278T, son consistentes con una alta tasa de mutación y/o de daño molecular *post mortem* (Gilbert *et al.*, 2005), mientras que el cambio nucleotídico 16224T, no representa una posición susceptible a daño molecular, por lo que la determinación en cuanto al origen ancestral de este haplotipo, se le puede atribuir a la vía de la mutación 16224T.

Al incorporarse la mutación 16256T, se forma el nodo 11-CR35U5a1a, que representa al subhaplogrupo U5a1a, que comparte **CR** con series antiguas y poblaciones contemporáneas de la Península Ibérica, Baleares y Asia; destacando esta última relación poblacional ya que desde el punto de vista filogenético, puede suponer una posible relación de **CR** con el Cercano Oriente.

Por otra parte, el nodo 79-SR12K, que representa el haplotipo 16224T- 16311C, propio del subhaplogrupo K, lo comparten las poblaciones antiguas de **SR** y **CR** con la mayoría de las poblaciones antiguas y contemporáneas del arco mediterráneo.

- HAPLOGRUPOS I, X Y W:

La red filogenética para los haplogrupos I, X y W presenta sus nodos principales dispuestos en forma de "Y", donde se observa el nodo que representa el haplotipo 5-CR29I, con el motivo 16223T, que comparte la población antigua de **CR** con poblaciones de la Península Ibérica y Norte de África (Fig. 48). A partir de este haplotipo surge la mutación 16292C, que representa el nodo principal de W (7-21W), que comparten las series de **SR** y **CR** con poblaciones asiáticas y europeas, del cual se irradian otros nodos. Así mismo, el haplotipo nodal identificado como 6-SR22X exhibe las mutaciones 16223T y 16278T, típicas del haplogrupo X, el cual es compartido por la serie antigua de **SR** con poblaciones de la Península Ibérica, Asia y Norte del continente africano.

- HAPLOGRUPOS J Y T:

La red filogenética que reúne a los haplogrupos J y T (Fig. 49), exhibe el nodo 66-SR03J, que representa a la secuencia CRS. La mayoría de los haplotipos pertenecen al haplogrupo J, sin embargo, se encuentran también 4 haplotipos de la población africana de Túnez con este mismo motivo CRS pero definidos como T. Esto se debe a la limitación del fragmento utilizado para este estudio entre las posiciones 16209-16365, que deja fuera las mutaciones basales del haplogrupo T, agrupándose como CRS y coincidiendo con el haplotipo 66-SR03J, encontrado en **SR**. En este nodo 66-SR03J, que reúne series antiguas y poblaciones contemporáneas representativas de cada continente, se observa que una de las series mallorquinas analizadas en este estudio (**SR**), comparte 3 secuencias caracterizadas como J.

Al incorporarse la mutación 16278T al nodo 66-SR03J, da lugar al haplotipo 14-SR10J (16278T), que comparte la serie de **SR** con series antiguas así como con poblaciones contemporáneas del Norte de África, poblaciones del resto de Europa y del Archipiélago Balear (en este último caso, con 2 individuos de la población de Ibiza).

Si se analizan los haplotipos únicos generados en esta red, se puede observar que el haplotipo único SR11J de la serie de **SR**, se encuentra separado del

nodo de mayor frecuencia (66-SR03J) únicamente por la mutación 16242T, lo que significa un camino evolutivo corto. A pesar de no ser frecuente esta mutación, se ha encontrado en poblaciones de Roma y de Rusia (Richard et al., 2000), que no están representadas en este trabajo.

Asimismo, del nodo 2VL30T que representa el motivo 16292T-16294T típico del haplogrupo T y que agrupa las poblaciones de Chuetas, Cerdeña actual, Francia, Israel-Palestina y Valencia, se deriva el haplotipo único SR15T, de la población de SR, que conlleva la mutación 16344T y que por lo tanto se encuentra a dos mutaciones del nodo de mayor frecuencia (66-SR03J) que representa al motivo CRS.

- HAPLOGRUPOS L3:

La red para este conjunto de haplogrupos de ascendencia africana esta representada en la figura 50, donde se observa la presencia de un nodo central (23-CR31L3), definido por la mutación 16223T. Este haplotipo es compartido por la serie mallorquina de CR con individuos de poblaciones contemporáneas de la Península Ibérica (Sur de Portugal, Cataluña y Pedroches), Isla de Cerdeña, Norte de África (Túnez, Marruecos y Egipto) y Asia (Turquía, Siria y Palestina).

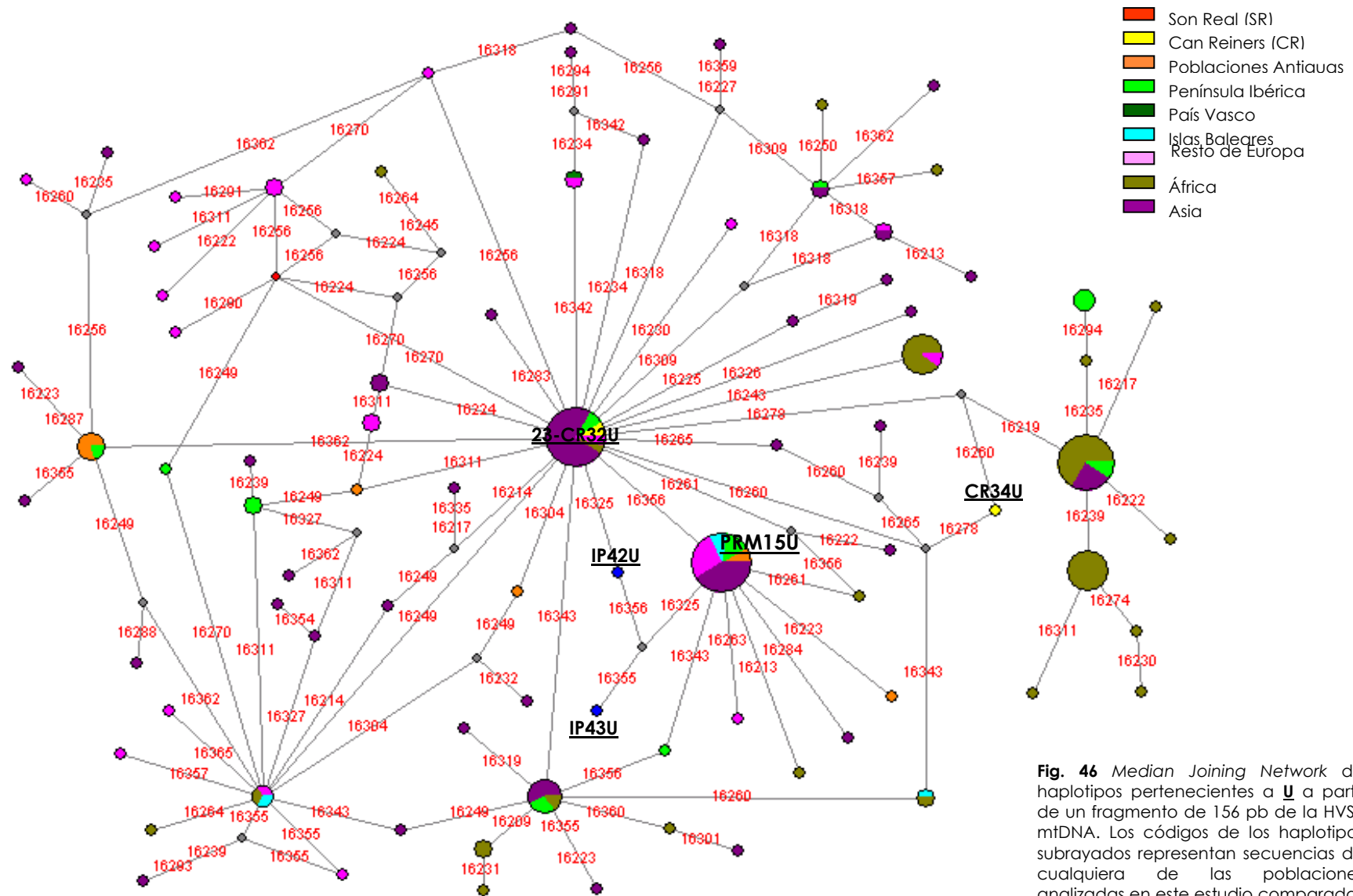


Fig. 46 Median Joining Network de haplotipos pertenecientes a U a partir de un fragmento de 156 pb de la HVS-I mtDNA. Los códigos de los haplotipos subrayados representan secuencias de cualquiera de las poblaciones analizadas en este estudio comparadas con otras poblaciones.

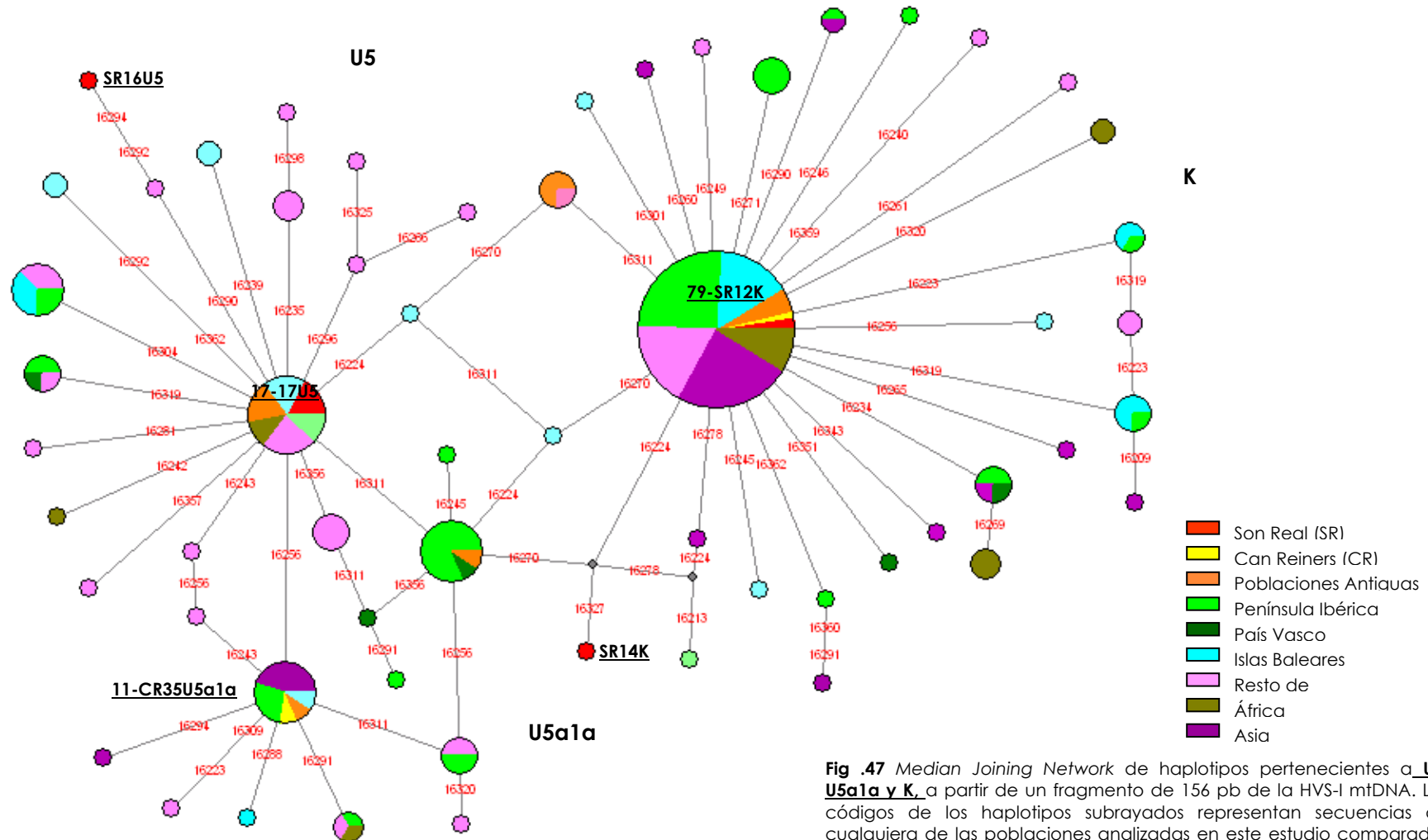


Fig .47 Median Joining Network de haplotipos pertenecientes a U5, U5a1a y K, a partir de un fragmento de 156 pb de la HVS-I mtDNA. Los códigos de los haplotipos subrayados representan secuencias de cualquiera de las poblaciones analizadas en este estudio comparadas con otras poblaciones.

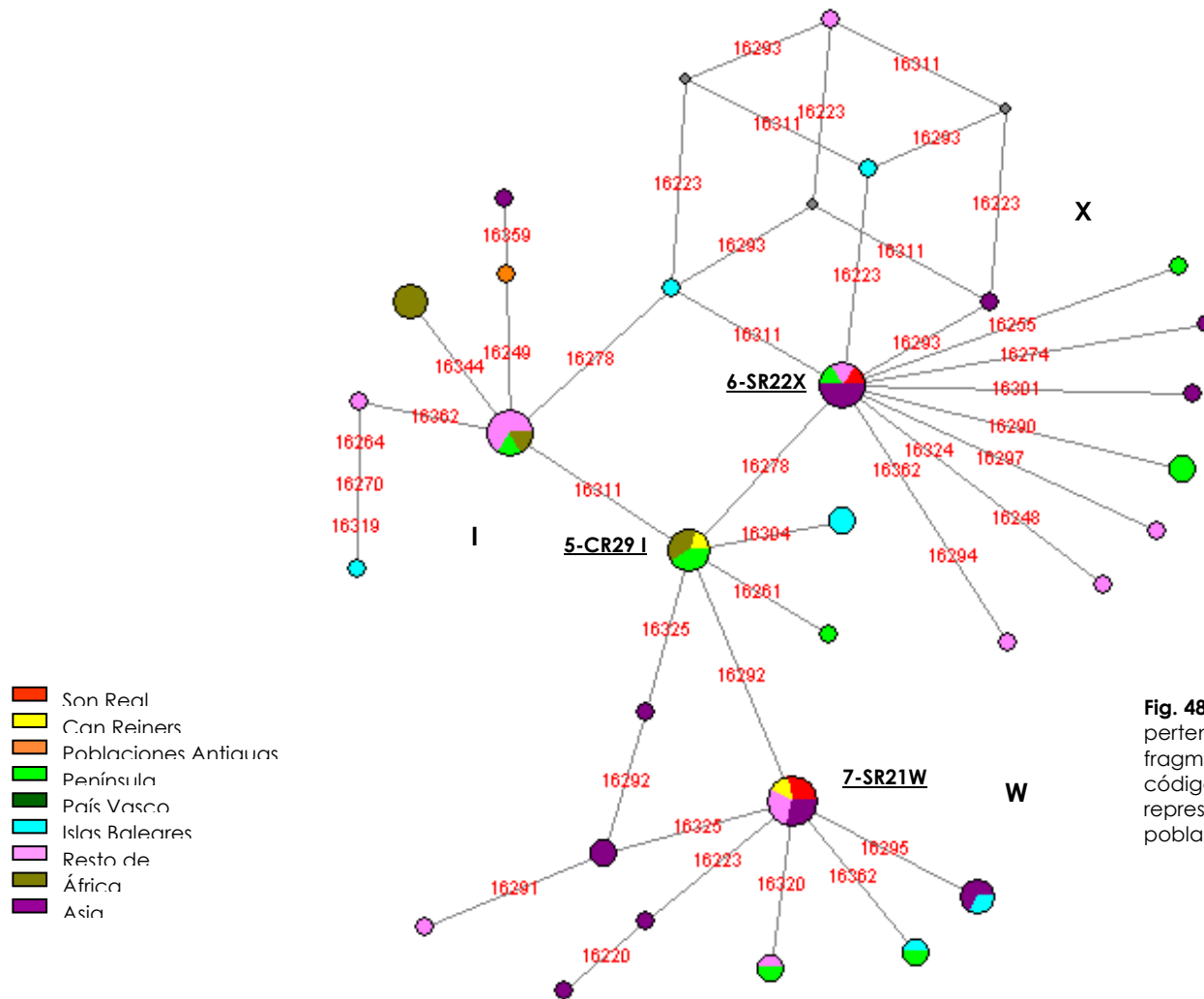


Fig. 48. Median Joining Network de haplotipos pertenecientes a I, X y W, a partir de un fragmento de 156 pb de la HVS-I mtDNA. Los códigos de los haplotipos subrayados representan secuencias de cualquiera de las poblaciones analizadas en este estudio.

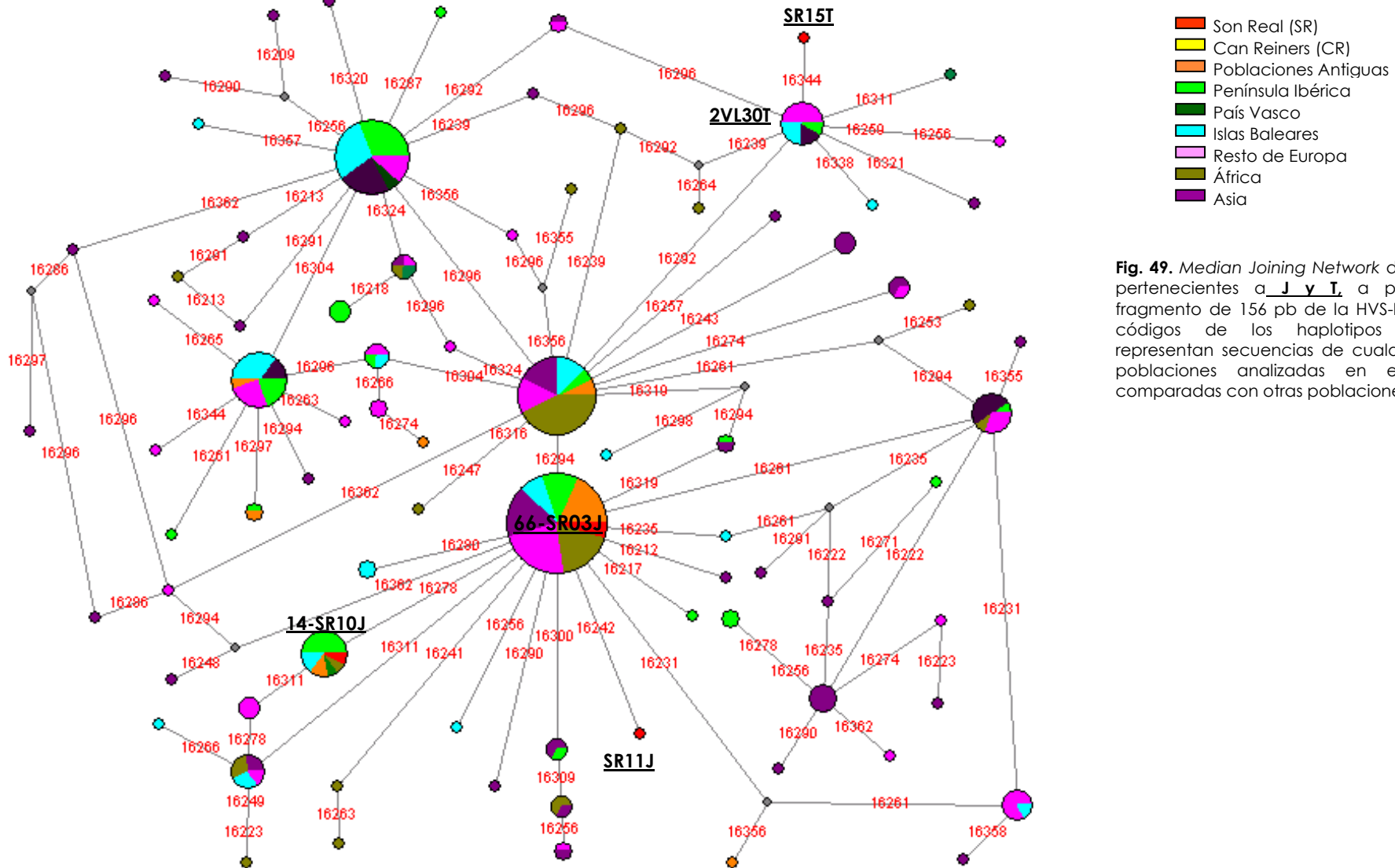
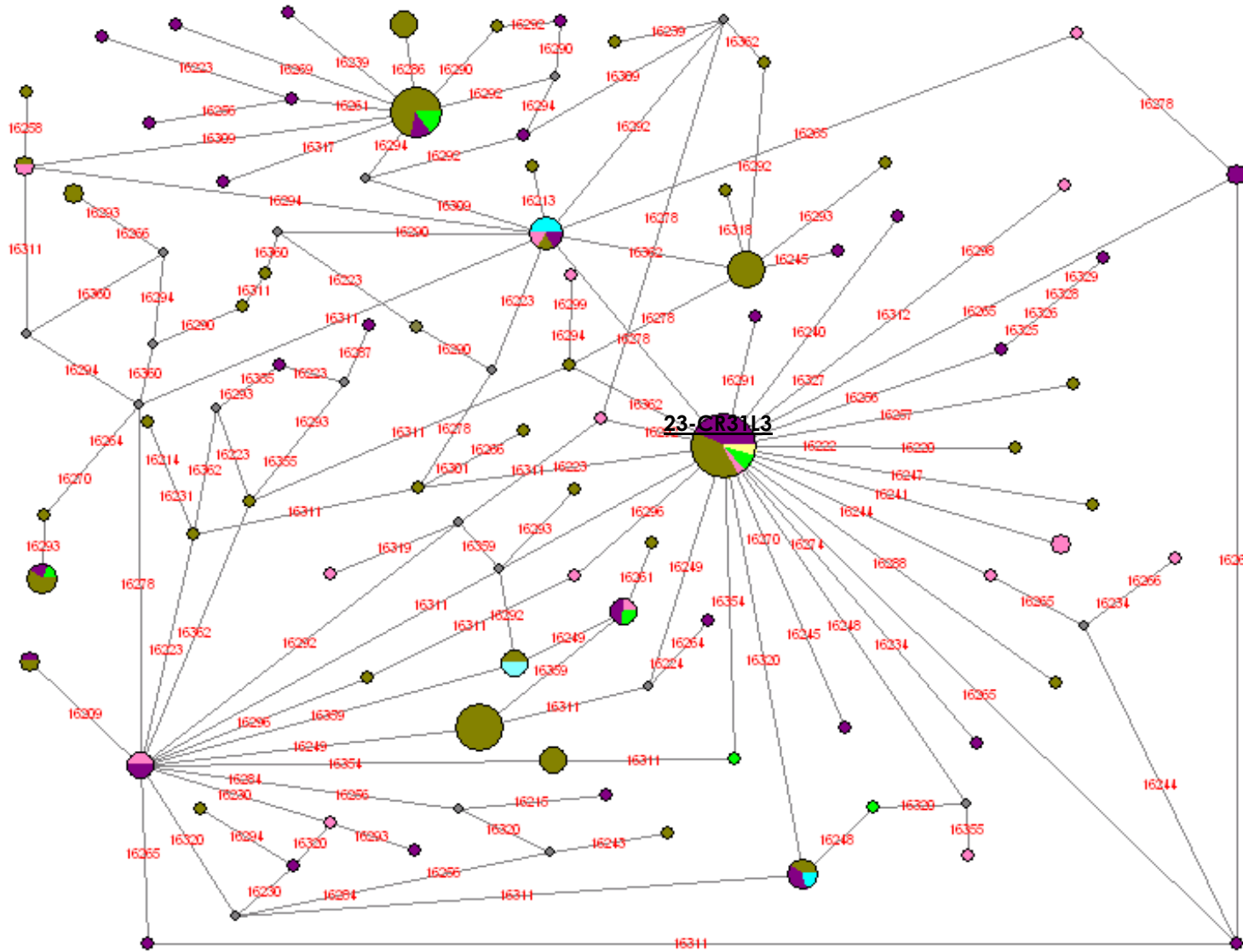


Fig. 49. Median Joining Network de haplotipos pertenecientes a J y I, a partir de un fragmento de 156 pb de la HVS-I mtDNA. Los códigos de los haplotipos subrayados representan secuencias de cualquiera de las poblaciones analizadas en este estudio comparadas con otras poblaciones.



- Son Real (SR)
- Can Reiners (CR)
- Poblaciones Antiguas
- Península Ibérica
- País Vasco
- Islas Baleares
- Resto de Europa
- África
- Asia

Fig. 50. Median Joining Network de haplotipos pertenecientes a **L1, L2, L3, M y N** a partir de un fragmento de 156 pb de la HVS-I mtDNA. Los códigos de los haplotipos subrayados representan secuencias de cualquiera de las poblaciones analizadas en este estudio comparadas con otras poblaciones.

4.4.3.2.2 REDES FILOGENÉTICAS CON BINARY DATA Y FRAGMENTO DE 126PB (16243-16365) .

- HAPLOGRUPO H:

La red del haplogrupo H (Fig. 51), presenta un nodo principal 371-IP38H, basal, de gran tamaño, con el motivo CRS, donde están incorporadas 371 secuencias de casi todas las poblaciones de comparación, incluyendo las tres poblaciones analizadas en este estudio. De este nodo, se desprenden numerosas conexiones: El nodo 7-SR05H, representando al haplotipo 16278T, es compartido por la población de **SR** con poblaciones contemporáneas de las Islas Baleares, del País Vasco y Norte de África. Así mismo de este nodo central basal se desprenden dos haplotipos (4-CR25H con la mutación 16274A y el 4-CR26H con la mutación 16290T) compartidos por la población de **CR** con poblaciones, en su mayoría, pertenecientes a la Península Ibérica y resto de Europa. No obstante, el haplotipo 4-CR25H representa también algunas secuencias asiáticas.

El haplotipo 13-CR28H representado por la mutación 16291T es compartido por la serie antigua de **CR** con poblaciones contemporáneas de la Península Ibérica, País Vasco, Norte de África, Asia y resto de Europa.

Con respecto a los haplotipos únicos relacionados con las tres series mallorquinas SR04H, CR27H y IP40H, podemos decir que siendo los mismos que se generaron al analizar el fragmento de 156 pb, el origen ancestral de alguno de ellos se modifica debido a la reducción del tamaño del fragmento (126 pb), que excluye mutaciones tales como 16223T.

En el caso del haplotipo SR04H de la serie antigua de **SR**, con el motivo 16291T y 16293G, se observan dos posibles orígenes ancestrales: la vía que parte del nodo 13-CR28H (al que se le anexa la mutación 16293G) y la que parte del nodo PE110H (al que se le añade la mutación 16291T), quedando en ambos casos, a dos mutaciones del nodo de mayor frecuencia (371-IP38H). De igual manera, como se analizó en la figura 44a, se debe hacer la misma observación en cuanto a los cambios nucleotídicos que rodean a este

haplotipo único. Autores como Gilbert y colaboradores (2005), consideran que las mutaciones 16291T y 16293G representan cambios nucleotídicos con una frecuencia de daño *post mortem* relativamente baja, lo que induce a pensar que ambas vías evolutivas son posibles.

Ahora, en el caso del haplotipo único IP40H de la serie **IP**, éste se origina del nodo PE15H, al añadirse la mutación 16262T y donde una sola mutación lo aleja del ancestro más cercano (PE15H), quien reúne secuencias de poblaciones de la Península Ibérica, resto de Europa y de las Islas Baleares (Menorca), abriendo la posibilidad de que este haplotipo haya surgido, por ejemplo, en Menorca y no haya llegado por migración, o que se encuentre en otras poblaciones europeas y no haya sido muestreado.

De un haplotipo perteneciente a la serie antigua Pre-Románica Ibérica (PRM02H) que representa al motivo 16311C, el cual se origina directamente del nodo basal de 371-IP38H (motivo CRS), parten dos reticulaciones que dan origen al haplotipo único CR27H de la serie de **CR** (con el motivo 16266T, 16294T, 16311C). De igual manera como fue analizado este haplotipo único con el fragmento de 156 pb, se crea la disyuntiva a la hora de determinar su origen ancestral, dado que las mutaciones 16266T, 16294T, 16311C son consistentes con una tasa de daño molecular *post mortem* relativamente baja, según Gilbert y colaboradores (2005) y con una alta tasa mutacional *in vivo* para Excoffier y Yang (1999).

- HAPLOGRUPO U:

En relación al haplogrupo U (Fig. 52), se presenta un nodo o círculo principal, basal, compuesto por 30 secuencias provenientes de distintas poblaciones (30-IP41U), de cada continente tomados para la comparación, resaltando el elevado número de secuencias de los países asiáticos. De las tres poblaciones en estudio, **SR** no comparte este haplotipo.

Del nodo de mayor frecuencia que representa al motivo CRS, se desprende el nodo 2PE82U con la mutación 16278T, del cual se ramifica un haplotipo único

con el motivo 16260T-16278T de la población de **CR**. Al incluirse al nodo central la mutación 16325C, se forma el nodo IP42U de la serie de **IP** que representa al haplotipo 16270T-16325C.

Otro de los haplotipos únicos generados en esta red perteneciente a U, de la serie de **IP**, surge de un nodo que representa una secuencia ancestral hipotética formada por la mutación 16356C (nodo IP42U) y 16355T (nodo PRM15U). Al analizar estas posiciones para poder definir el origen ancestral del nodo IP43U, parece más verosímil la vía del nodo IP42U, dado que el cambio nucleotídico 16355T y es consistente con una alta tasa de mutación *in vivo* (Excoffier y Yang, 1999) y con mayor daño molecular *post mortem* (Gilbert *et al.*, 2005), lo que sugiere posibles daños moleculares.

- SUBHAPLOGRUPO U5 Y U5A1A:

En la red del conjunto U5 y U5a1a (Fig. 53), hay dos nodos principales separados por la mutación 16256T, donde el primero (24-IP46U5) representa al subhaplogrupo U5 con el motivo 16270T y el segundo al subhaplogrupo U5a1a (14-35U5a1a) que comparte la serie de **CR** con poblaciones representantes de Europa y Asia. De igual manera, del nodo central se desprende una conexión con el nodo 9-IP45U5 con el motivo 16270T y 16304C, que comparte la población de **IP** con Península Ibérica, Islas Baleares y resto de Europa.

En relación a los haplotipos únicos, de esta red se generan 3: SR16U5, IP44U5 e IP47U5. Si se analiza el origen ancestral de dichos haplotipos, se observa que los de la serie de **IP**, se derivan directamente del nodo 24-IP46U5 mientras que el haplotipo de la serie de **SR** (SR16U5), se origina de un nodo que representa una secuencia de la población contemporánea de Suiza con el motivo 16270T-16290T al cual se le añaden las mutaciones 16292T y 16294T, quedando SR16U5 separado del nodo de mayor frecuencia (24-IP46U5) por medio de 3 mutaciones.

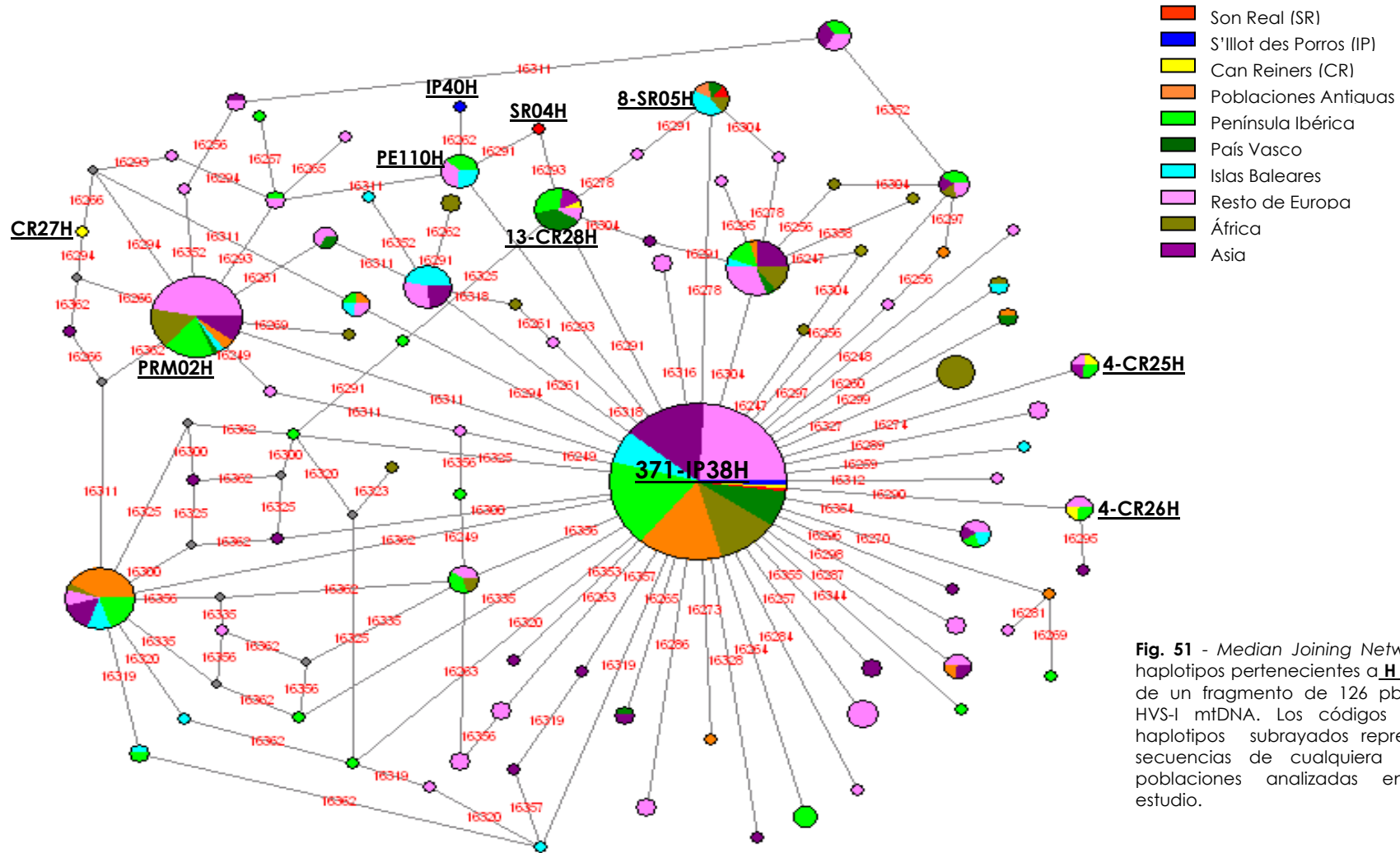
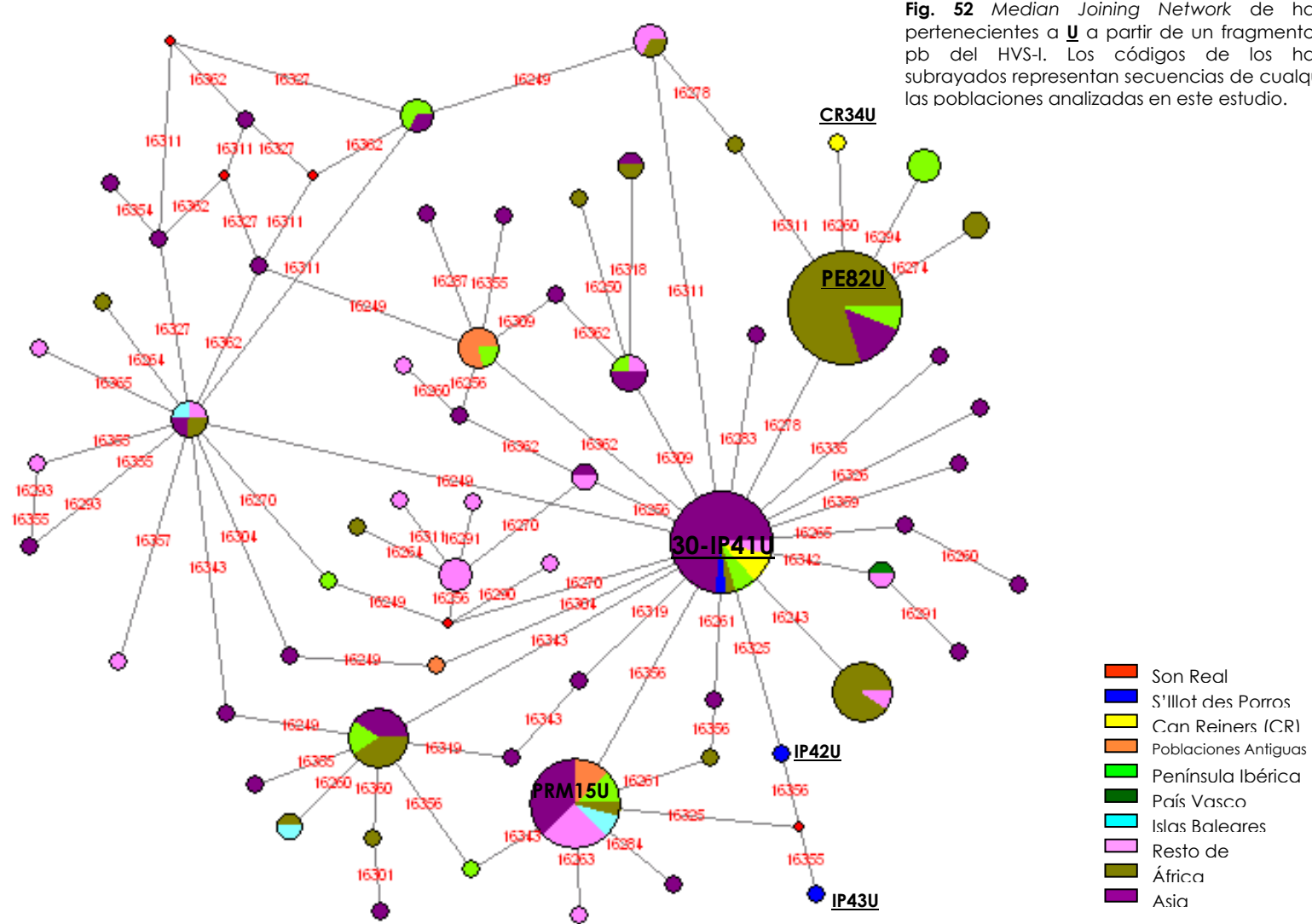


Fig. 51 - Median Joining Network de haplotipos pertenecientes a Ha partir de un fragmento de 126 pb de la HVSI mtDNA. Los códigos de los haplotipos subrayados representan secuencias de cualquiera de las poblaciones analizadas en este estudio.



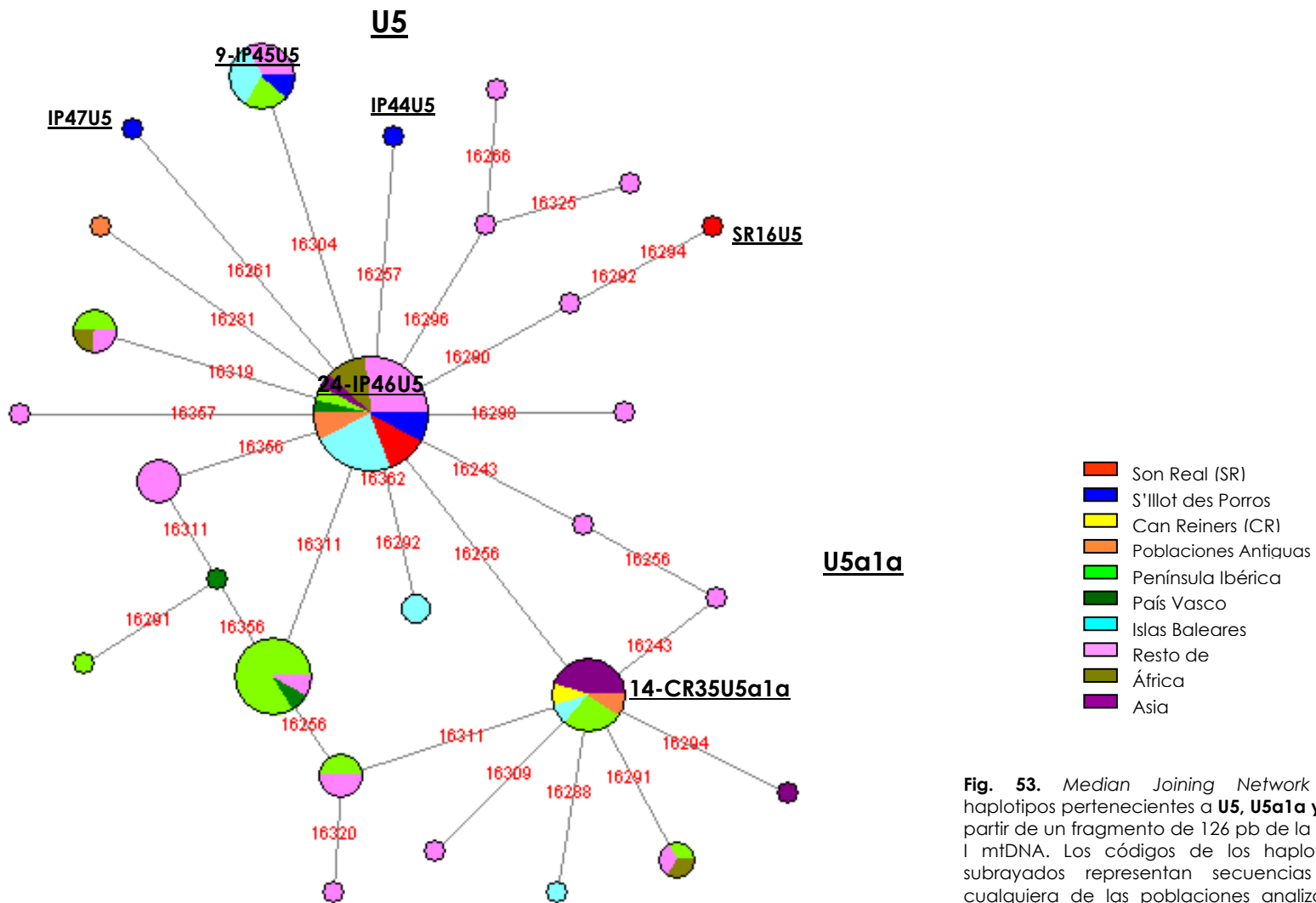


Fig. 53. Median Joining Network de haplotipos pertenecientes a **U5**, **U5a1a** y **K** a partir de un fragmento de 126 pb de la HVS-I mtDNA. Los códigos de los haplotipos subrayados representan secuencias de cualquiera de las poblaciones analizadas en este estudio, compartidas con otras poblaciones.

4.4.3.2.3 REDES FILOGENÉTICAS A PARTIR DE SECUENCIAS OBTENIDAS ENTRE SERIES ANTIGUAS.

La red media obtenida a partir del conjunto de haplogrupos encontrados entre las series antiguas (Fig. 54), muestra un nodo principal 74-IP46U, donde están incorporadas 74 secuencias de casi todas las series de comparación con el motivo basal CRS, incluyendo las tres poblaciones analizadas en este estudio. De este nodo, se desprenden numerosas conexiones:

El nodo 8-IP46U5, representando al haplotipo 16270T, es compartido por la población de **IP** con las series de Son Real, Aldaieta y Pre románico Ibérico. Por otra parte, con la incorporación de las mutaciones 16224C y 16311C, se origina otro nodo, 11-SR12K, el cual comparte **SR** con la mayoría de las series de comparación, excepto **IP** y Cerdeña antigua. El nodo 3-SR20W que representa al haplotipo 16223T-16298C, lo comparten las series de **SR** y **CR**. Así mismo, el haplotipo 16223T representado a través del nodo 6-CR31L3 lo comparten las series de **CR** con Próximo Oriente antiguo (Fernández D., 2005) y la serie de Cerdeña antigua (Caramelli *et al.*, 2007). El nodo 5-SR10J representando el cambio nucleotídico 16278T, lo comparte **SR** con Cerdeña y la serie antigua vasca Aldaieta.

Se observan además, algunos haplotipos únicos encontrados en las redes medias obtenidas entre las series antiguas y las poblaciones contemporáneas. Sin embargo llama la atención que entre este grupo de haplotipos únicos se encuentra el IP45U5, que representa el motivo 16270T-16304C, debido a que al realizar la red media del haplogrupo U5 a partir de un fragmento de 126 pb de la HVS-I, aparece compartiéndolo la serie talayótica de **IP** con poblaciones actuales de las Islas Baleares (Mallorca), Península Ibérica y del resto de Europa. Esto refleja una posible continuidad genética a través del tiempo.

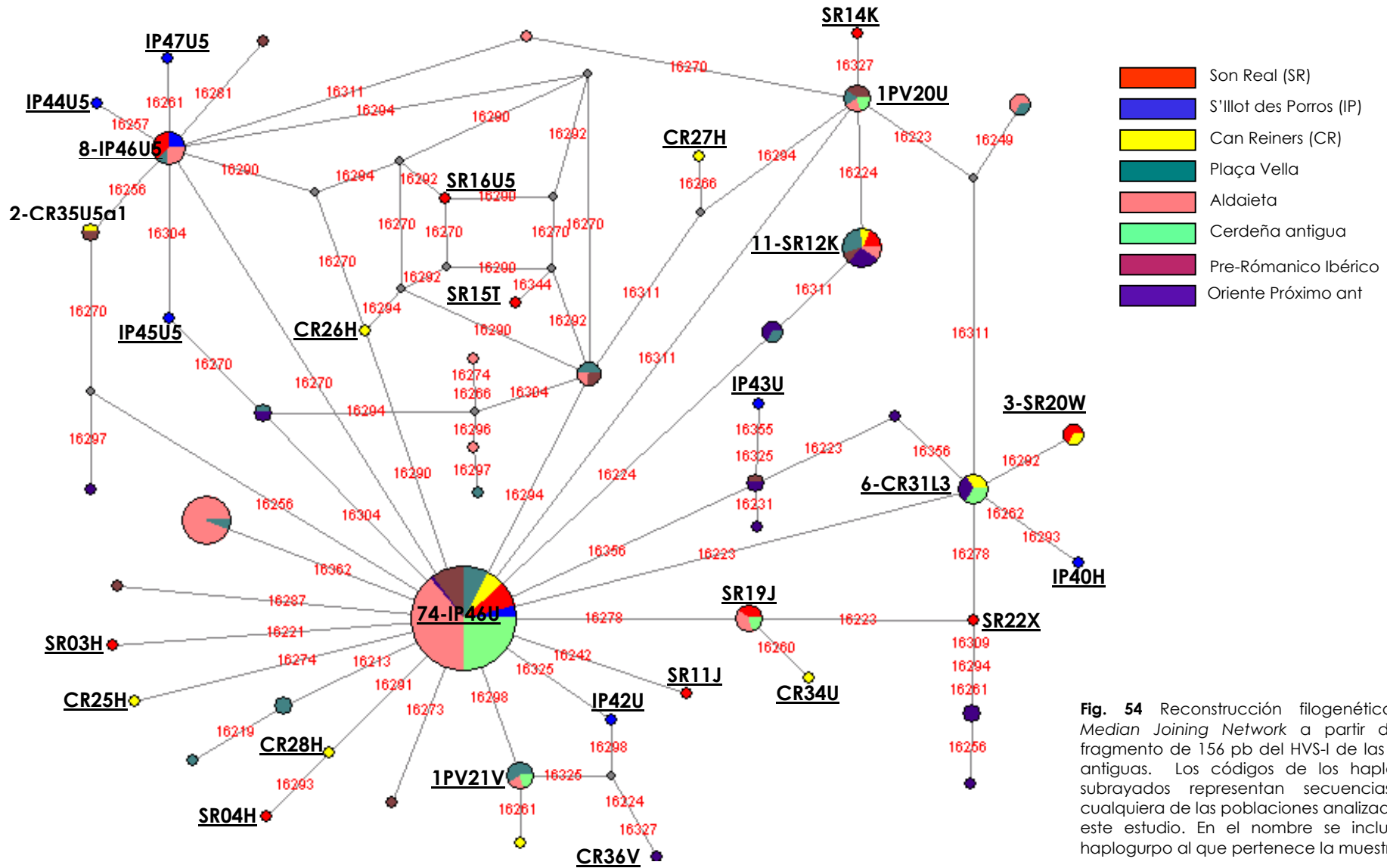


Fig. 54 Reconstrucción filogenética de Median Joining Network a partir de un fragmento de 156 pb del HVS-I de las series antiguas. Los códigos de los haplotipos subrayados representan secuencias de cualquiera de las poblaciones analizadas en este estudio. En el nombre se incluye el haplogrupo al que pertenece la muestra.

4.4.4 HAPLOTIPOS ÚNICOS Y COMPARTIDOS.

Las 48 secuencias antiguas obtenidas fueron comparadas con las secuencias de las poblaciones de referencia (Tabla V - Muestras y Metodología), observándose que las poblaciones de **SR** y **CR** compartieron 8 y 10 haplotipos respectivamente. El resultado de los haplotipos compartidos por las poblaciones antiguas de **SR** y **CR** con el resto de poblaciones de comparación utilizando el fragmento de 156 pb son:

➤ **HAPLOGRUPO H.**

- Dentro de este haplogrupo, se encontraron 8 haplotipos de los cuales 6 son compartidos y 2 son únicos. La secuencia de referencia o **CRS** se encontró en 4 individuos (2 en **CR**, 2 en **SR**) como posible haplotipo fundador, encontrándose representación en la mayoría de poblaciones antiguas y contemporáneas del arco mediterráneo empleadas para la comparación, no pudiéndose establecer un nexo determinado con una región específica.

- Los 5 haplotipos de H restantes (16221T; 16274A; 16278T; 16290T; 16291T) se encuentran distribuidos entre **SR** y **CR** y las poblaciones contemporáneas de las Islas Baleares (Picornell *et al.*, 2005), Península Ibérica (Corte-Real *et al.*, 1996; Montiel, 2001; Picornell *et al.*, 2005, Fernández Rosas, 2005), Cerdeña actual (Richards *et al.*, 2000) e Irak (Al-Zahery *et al.*, 2003), observándose además que **SR** comparte una secuencia con un individuo de la serie antigua de la isla de Cerdeña (Caramelli *et al.*, 2005) con el motivo 16278T.

- Además de estos haplotipos compartidos, existen tres únicos: uno en la población de **SR** que presenta las mutaciones 16291T-16293G, otro en **CR** con el motivo 16266T, 16294T y 16311C y un tercer haplotipo en **IP** con los cambios nucleotídicos 16223T, 16262C y 16293G.

➤ **HAPLOGRUPOS U, U5, U5A1A Y K.**

- En relación al **haplogrupo U**, se han encontrado dos individuos con el motivo CRS en la población de **CR**, compartido con las poblaciones contemporáneas de la Península Ibérica (Pereira *et al.*, 2000; Fernández Rosas, 2005); Cercano Oriente (Richards *et al.*, 2000; Mergen *et al.*, 2004); Suiza (Pult *et al.*, 1994) y Túnez (Fadhlaoui *et al.*, 2004). Así mismo, se han encontrado tres haplotipos únicos:

- 2 en **IP**: IP42U (16325C) e IP43U (16325C, 16355T, 16356C)
- 1 en **CR**: CR34U (16260T-16278T)

- El motivo 16270T perteneciente al subhaplogrupo U5 es compartido por 3 individuos de **SR**, estando relacionado con secuencias de las poblaciones de las Islas Baleares (Picornell *et al.*, 2005), antiguas y actuales del País Vasco (Alzuade *et al.*, 2006; Corte-Real *et al.*, 1996;), Sur de Portugal (Pereira *et al.*, 2000), Cerdeña contemporánea (Richards *et al.*, 2000), Suiza (Pult *et al.*, 1994) y Marruecos (Brakez *et al.*, 2001); mientras que el haplotipo 16270T-16290T-16292T-16294T representa una secuencia única encontrada en esta misma serie antigua (**SR**).

- Para el subhaplogrupo U5a1a, sólo se ha encontrado el haplotipo 16256T – 16270T en la serie de **CR**, el cual también se halla representado en una de las series antiguas (Pre Románico Ibérico) y en poblaciones contemporáneas de la Península Ibérica, tales como Pedroches (Fernández Rosas, 2005) y Sur de Portugal (Pereira *et al.*, 2000), así como en tres poblaciones del continente asiático (Israel [Richards *et al.*, 2000], Turquía [Mergen *et al.*, 2004] y Georgia [Comas *et al.*, 2000]).

- Por su parte el subhaplogrupo K, muestra 3 secuencias con los motivos fundadores 16224C y 16311C que comparten las series de **SR** y **CR** con al menos tres poblaciones de cada continente aquí representados. Cabe señalar que dentro de este haplogrupo, existe un haplotipo de la población de **SR**, cuyos cambios nucleotídicos (16311C-16327T), no incluyen la

mutación 16224C considerada un motivo fundador, probablemente debido a una retromutación, ya que han sido identificados casos similares en otras poblaciones europeas (Santos *et al.*, 2004).

➤ **HAPLOGRUPO PHV Y V.**

- El haplogrupo V, se encuentra en una frecuencia muy baja entre las series antiguas analizadas en este estudio, detectando únicamente el haplotipo 16261T-16298C. Sin embargo, este haplotipo lo comparte la serie de **CR** con la población de Túnez (Fadhlaoui *et al.*, 2004).

- Con respecto al haplogrupo PHV, representado por el motivo CRS, éste sólo se encontró en la serie de **SR**. Esta serie talayótica, mediante este haplogrupo, se relaciona sólo con la población de Pedroche, mientras que con Túnez (Fadhlaoui *et al.*, 2004), Cerdeña actual (Richards *et al.*, 2000) y Turquía (Mergen *et al.*, 2004) lo hace a través del haplogrupo HV. Esto último quizás sea debido al tamaño del fragmento empleado en este estudio situado entre las posiciones 16209-16365, que hace que las mutaciones que caracterizan a determinados haplogrupos, en este caso al HV, queden fuera de dicho fragmento y se agrupen como secuencias CRS.

➤ **HAPLOGRUPOS J Y T.**

- Con respecto al haplogrupo J, **SR** presenta 5 individuos con haplotipos pertenecientes a este linaje, de los cuales 3 presentan el motivo CRS.

- El otro haplotipo que comparte la serie antigua de **SR**, está representado por la mutación 16278T, también se encuentra en la serie antigua del País Vasco de Aldaieta (Alzualde *et al.*, 2006), y en poblaciones contemporáneas de la Península Ibérica (Cataluña [Montiel, 2001] y Pedroches [Fernández Rosas, 2005]), Valencia (Picornell *et al.*, 2005) y País Vasco (Corte-Real *et al.*, 1996); así como en Ibiza (Picornell *et al.*, 2005), Marruecos (Brakez *et al.*, 2001) y la Isla de Cerdeña (Richards *et al.*, 2000). El haplotipo único representado por la mutación 16242T pertenece a **SR** y está representado por la mutación 16242T.

o Por su parte el haplogrupo T sólo presenta un haplotipo único en la población de **SR** con dos mutaciones típicas de este cluster, la 16292T y la 16294T, a las cuales se les suma el cambio nucleotídico 16344T, que lo hace diferir del resto de poblaciones de comparación aquí representadas.

➤ **HAPLOGRUPOS I, W Y X.**

- Entre las muestras analizadas, sólo se encontró representación del haplogrupo I en la serie de **CR**, con el haplotipo 16223T. Dado que esta mutación presenta una alta tasa de mutación, de no contar con la caracterización por RFLP, la determinación del haplogrupo no hubiera sido posible. Este haplotipo aparece compartido con poblaciones de la Península Ibérica (Cataluña [Montiel, 2001] y Pedroches [Fernández Rosas, 2005]) y del Noreste del continente africano, como Egipto (Stevanovitch *et al.*, 2003).

- Con respecto al haplogrupo W, se encontraron 3 haplotipos con el motivo ancestral 16223T y 16292T y que comparten las series antiguas de **SR** y **CR** con dos poblaciones distintas del oeste asiático como Turquía (Mergen *et al.*, 2004) y Georgia (Comas *et al.*, 2000)) y con dos poblaciones contemporáneas de Europa (Cerdeña actual y Francia [Richards *et al.*, 2000]).

- Por último, en relación al haplogrupo X, se encontró una secuencia en la serie de **SR** con el haplotipo 16223T-16278T, compartida con la población de Cataluña (Montiel, 2001), la región de la Toscana (Torrioni *et al.*, 1996), Israel (Richards *et al.*, 2000) y Georgia (Comas *et al.*, 2000).

No obstante, al hacer la comparación con el fragmento de 126 pb, que se utilizó únicamente para la serie Talayótica de **IP**, se puede observar que dicha serie presenta 3 haplotipos únicos (IP40H; IP42U; IP43U) y 4 haplotipos compartidos (IP38H; IP41U; IP45U5; IP46U5), referido en la tabla XXII-Resultados:

➤ **HAPLOGRUPO H.**

- Con respecto al **haplogrupo H**, en la serie **IP** se observan 2 secuencias con el motivo fundador CRS, el cual comparte con la mayor parte de las poblaciones de comparación. Cabe destacar que uno de ellos, presenta la mutación 16378T, pero como este fragmento sólo se analizó entre las posiciones 16243-16365, este cambio nucleotídico no se incluye, quedando como CRS.

- Una situación similar se presenta con otro de los haplotipos de H que presenta los cambios nucleotídicos 16223T-16262T-16293G, no siendo incluido el primero de ellos al restringir el fragmento a las posiciones 16243-16365, y resultando como haplotipo único.

➤ **HAPLOGRUPO U.**

- El **haplogrupo U**, igual que el anterior, presenta 3 haplotipos, dos de los cuales presentan secuencias únicas con las mutaciones 16325C y el otro con los cambios nucleotídicos 16325C, 16355T y 16356T.

- Un tercer haplotipo lo representa el motivo CRS, compartido por **IP** y **CR** con otras poblaciones actuales de la Península Ibérica (Pedroche [Fernández Rosas, 2005]) y Sur de Portugal (Pereira *et al.*, 2000), la región Italiana de Toscana (Torroni *et al.*, 1996), Suiza (Pult *et al.*, 1994), Túnez (Fadhlaoui *et al.*, 2004) y con un número importante de individuos de Turquía (Mergen *et al.*, 2004).

➤ **HAPLOGRUPO U5.**

- Dentro de este subhaplogrupo, se encuentran 5 haplotipos. Uno de ellos representa el motivo basal 16270T, el cual comparte la población de **IP** con una gran parte de poblaciones aledañas a la Bahía de Alcudia. Este haplotipo, incluye las mutaciones 16270T y 16378T, pero por estar este fragmento ubicado entre las posiciones 16243 y 16365, esta última mutación queda excluida.

- Por otra parte, el haplotipo 16270T-16304C, **IP** lo comparte con dos individuos de Cataluña (Montiel, 2001) y Valencia (Picornell *et al.*, 2005), con 3 individuos de las Islas Baleares (Picornell *et al.*, 2005) y con 3 de la población actual de la de la Isla de Cerdeña (Richards *et al.*, 2000).

4.4.5 ANÁLISIS DE LA HVS-I DE LAS SERIES ANTIGUAS Y POBLACIONES CONTEMPORÁNEAS DEL ARCHIPIÉLAGO BALEAR.

Con el fin de conocer las posibles vinculaciones que existen a nivel genético entre las poblaciones antiguas analizadas en este estudio (**SR**, **IP** y **CR**) y contemporáneas del archipiélago Balear Mallorca (**MJ**), Menorca (**MN**), Chuetas (**CH**) e Ibiza (**IBZ**), se ha realizado un análisis de las secuencias entre estas poblaciones para de esta forma determinar si existe o no una continuidad genética.

En las tablas XXVIII, XXIX y XXX se observa que dentro de los fragmentos analizados se encuentran haplotipos que comparten las series antiguas analizadas con las actuales del archipiélago. Sin embargo, existen mutaciones entre las poblaciones de comparación que se encuentran fuera del fragmento analizado en nuestras series y que por lo tanto no pudieron ser tomadas en cuenta.

SON REAL:

Entre esta serie antigua y las poblaciones de las Islas Baleares contemporáneas se comparten 5 haplotipos que exhiben mutaciones diagnósticas para los haplogrupos H, J, K y U5. Cabe destacar que el nodo SR06H que exhibe la mutación 16221T, se observa en **SR** y en un individuo de la población contemporánea de Menorca (tabla XXVIII).

Haplotipo	Hg	n	MJ	CH	MN	IBZ
CRS	H	25	9	7	2	7
CRS	J	5	2	-	3	-
16221T	H	1	-	-	1	-
16278T	H	4	-	-	4	-
16278T	J	2	-	-	-	2
16224C-16311C	K	10	1	3	3	3
16270T	U5	2	-	-	2	1

Tabla XXVIII. Haplotipos compartidos entre la serie talayótica de Son Real y las poblaciones contemporáneas del archipiélago Balear: Mallorca (**MJ**), Chuetas (**CH**), Menorca (**MN**) e Ibiza (**IBZ**) (Picornell *et al.*, 2005).

S' ILLOT DES PORROS:

Entre los haplotipos que comparte la serie Talayótica de **IP**, destaca el IP45U5 el cual se encuentra en individuos de las poblaciones de Mallorca e Ibiza (tabla XXIX).

Haplotipo	Hg	n	MJ	CH	MN	IBZ
CRS	H	27	9	8	3	7
16270T	U5	6	1	2	2	1
16270T-16304C	U5	3	2	-	-	1

Tabla XXIX. Haplotipos compartidos entre la serie talayótica de S'Illot des Porros y las poblaciones contemporáneas del archipiélago Balear: Mallorca (**MJ**), Chuetas (**CH**), Menorca (**MN**) e Ibiza (**IBZ**) (Picornell *et al.*, 2005).

CAN REINERS:

Con respecto a los haplotipos compartidos entre la serie **CR** y las poblaciones contemporáneas de Baleares, destaca el haplotipo CR35U5a1a que muestra las mutaciones 16256T-16270T para definir el subhaplogrupo U5a1a, frecuente entre poblaciones europeas (tabla XXX).

Haplotipo	Hg	n	MJ	CH	MN	IBZ
CRS	H	25	9	7	2	7
16256T-16270T	U5a1a	1	-	-	-	1
16224C-16311C	K	10	1	3	3	3

Tabla XXX. Haplotipos compartidos entre la Serie talayótica de Can Reiners y las poblaciones contemporáneas del archipiélago Balear: Mallorca (**MJ**), Chuetas (**CH**), Menorca (**MN**) e Ibiza (**IBZ**) (Picornell *et al.*, 2005).



5.- DISCUSIÓN.

5.1 METODOLOGÍA.

La posibilidad de recuperar la información genética a partir de restos antiguos, está condicionada por diversos factores relacionados con el estado de conservación de los restos esqueléticos. Los resultados de las investigaciones con aDNA, han demostrado que el éxito en la obtención del DNA amplificable proveniente de restos antiguos, depende en gran parte de las condiciones y calidad de las muestras analizadas.

No cabe duda que la interacción de factores ambientales (humedad, pH, presión y temperatura, entre otros) con los factores endógenos, trae consigo la degradación *postmortem* de los organismos (procesos autolíticos y liberación de enzimas lisosómicas, responsables de la biodegradación molecular) lo que en parte, afecta a los yacimientos antiguos, contribuyendo al deterioro de la estructura biológica (Pääbo *et al.*, 1989), aumentando la velocidad de degradación del DNA y por ende, condicionando su preservación (Bär *et al.*, 1988; Schwartz *et al.*, 1991; Baker *et al.*, 2001; Montiel, 2001; Tuross *et al.*, 2003; Iwamura *et al.*, 2004; entre otros).

La humedad como elemento nocivo para el DNA, suele alterar sus condiciones biológicas, conllevando a la fragmentación de las cadenas y, de acuerdo con Lindahl (1993a), son los procesos hidrolíticos y oxidativos los que complementan la degradación del material genético, debido a que se acelera el proceso de depurinización del DNA (Lindahl y Nyberg, 1972; Höss *et al.*, 1996), por lo cual en aquellos yacimientos arqueológicos cuyos ambientes sean secos y fríos, será más ventajosa la conservación del material genético.

En este trabajo, se analizó el DNA de tres necrópolis localizadas en la Bahía de Alcudia, Mallorca, dos de las cuales, pertenecientes al período cultural Talayótico (**SR** e **IP**), estuvieron expuestas a condiciones ambientales negativas para su conservación, ya que una de ellas (**SR**) se situaba en la región costera y la otra (**IP**) en un islote. No obstante, se ha logrado recuperar material

genético de las muestras analizadas, lo que ha permitido caracterizar algunos individuos, hecho que ya se reflejaba en los estudios moleculares preliminares realizados por Montiel y colaboradores (2001), Díaz y col. (2002) y Montiel y Malgosa (2003), así como en la presente investigación.

De las tres series, los restos de **SR** y **CR** presentaron mejores condiciones de conservación, lo que permitió la obtención de un mayor número de secuencias; situación contraria a la presentada por las muestras de **IP** que mostraron una menor eficiencia en la recuperación de secuencias, probablemente debido a las condiciones ambientales, fortaleciendo la posición de Fernández Domínguez (2005) al afirmar que el éxito en la recuperación de material genético no depende tanto de la antigüedad de las muestras sino más bien de las condiciones ambientales y de conservación de los yacimientos.

El trabajo experimental de la presente tesis, se basó en la metodología básica empleada en el laboratorio de aDNA de la UAB (Montiel, 2001), la cual ha sido sometida de manera paulatina, a ciertas modificaciones, con especial atención a la degradación y fragmentación del aDNA, así como a la prevención de la contaminación con DNA moderno. La mejora metodológica va dirigida especialmente a aumentar la eficiencia en la extracción y amplificación, siguiendo el criterio sustentado por algunos investigadores que afirman la necesidad de adaptar cada protocolo a las características particulares de cada laboratorio (Montiel, 2001) y de los distintos yacimientos analizados (Cipollaro *et al.*, 2005).

Las precauciones y requisitos del diseño experimental se inician, en nuestro caso, con la llegada de las muestras al laboratorio de aDNA, ya que las colecciones analizadas provienen de excavaciones antiguas en las que no se preveía el análisis molecular, por lo que se ha dado un énfasis especial a la selección de piezas dentales y a los procesos de descontaminación superficial.

Con la finalidad de minimizar la posible contaminación con DNA exógeno procedente de fuentes naturales, así como de productos de amplificaciones previas (amplicones), la fase experimental se realizó en un laboratorio exclusivo para aDNA (Handt *et al.*, 1994), acondicionado para la ejecución de los procesos Pre-PCR (extracción y preparación de reacciones de PCR), siguiendo las directrices de esterilización (Montiel, 2001; Kemp *et al.*, 2005; entre otros) y los criterios de autenticidad (Pääbo *et al.*, 2004; Montiel *et al.*, 2007) descritos en el apartado de Muestras y Metodología.

En relación al tipo de muestra, la misma estuvo conformada por dientes, por ser entidades anatómicas con tejidos altamente mineralizados que de por sí se convierten en una barrera externa y natural contra la acción adversa de factores ambientales (Grimoud *et al.*, 2004), lográndose recuperar un DNA de mejor calidad que el que proviene de otros tejidos (Richards *et al.*, 1995; Durán *et al.*, 1998; Gilbert *et al.*, 2003). En este sentido, los dientes fueron seleccionados de acuerdo a lo reseñado por Montiel (2001) y Solórzano (2006), quienes han tomado como parámetro fundamental la integridad morfológica de la pieza dentaria, de tal forma que permitiera el abordaje endocanalicular como técnica para la obtención del polvo dentario, a partir del cual se extrae el material genético.

En el presente estudio se incorporó un instrumental rotatorio diamantado de uso odontológico, el cual es de suma importancia, ya que su efectividad en el corte y pulverización, evita el sobrecalentamiento producido por material no diamantado menos eficiente y que obliga a operar a mayores velocidades, aumentando la fricción y por consiguiente, un aumento de la temperatura, que supone un deterioro adicional al ya fragmentado DNA que pueda estar presente.

La aplicación de estas medidas técnicas, permitió obtener un polvo dentario muy fino que pudo facilitar la desmineralización del tejido con el EDTA

incorporado al tampón de extracción, promoviendo a su vez una mejor liberación del DNA incluido en los cristales de hidroxiapatita.

Dos de las hipótesis que intentan explicar la supervivencia del DNA *post-mortem* en tejidos duros (hueso y diente), se basa en la presencia de la matriz orgánica mineralizada que recubre a las células metabólicamente activas de estos tejidos, tal es el caso de los osteocitos en el hueso y de las prolongaciones de los odontoblastos en la dentina, siendo las mitocondrias una de las estructuras intracelulares más abundantes. Es posible que estos elementos celulares puedan sufrir un proceso de "momificación" al estar rodeados de la matriz mineralizada y quedar excluidos físicamente de microbios y contaminantes externos (Hummel y Herrmann, 1994); o bien, que el DNA, por su afinidad a la hidroxiapatita (compuesto cristalino de fosfato de calcio), pueda unirse a este compuesto y por lo tanto quedar protegido, en gran medida, de la acción de las enzimas autolíticas (Lindahl, 1993a; Nielsen *et al.*, 1994).

En la literatura actual, son muy pocos los investigadores que describen el tipo de revestimiento de las fresas o brocas que se emplean en la obtención del polvo dentario, representando para nuestro laboratorio un punto importante dadas las condiciones de las muestras que se analizan. Sin embargo, se han publicado técnicas para la obtención del polvo dentario de forma general, tales como el seccionamiento vertical de la pieza dentaria atendiendo a la morfología y posterior fractura del diente (Calvo *et al.*, 2002; Grimoud *et al.*, 2004) o la utilizada por Lalueza-Fox (1995); Di Benedetto *et al.* (2000) y Baker *et al.* (2001), basada en la trituración total del diente. En nuestra opinión, esta última técnica no es recomendable ya que puede traer como consecuencia el arrastre de un mayor número de elementos que pueden inhibir la PCR y de moléculas de DNA contaminantes que hayan podido penetrar las capas superficiales del esmalte.

No siempre la condición macroscópica del diente se corresponde con la integridad que pueden presentar internamente los tejidos que lo conforman. En este estudio, la mayoría de los dientes de los individuos de la serie de **IP**, presentaron alteraciones tales como desmineralización y obturación de la cámara pulpar, lo que en algunos casos condujo al descarte de al menos 4 de ellas, ya que al ser manipuladas con el fórceps se fragmentaron. Por otra parte, 17 individuos mostraron obliteración de la cámara pulpar, requiriendo de la técnica de apiceptomía, descrita en detalle en el apartado 3.2.2.2 de Muestras y Metodología. La incorporación de la apiceptomía como técnica de abordaje dental al protocolo de nuestro laboratorio, representó un avance que aportó resultados positivos a este trabajo en consonancia con Cobb (2002), quien la llamó *Reverse-Root-Canal technique*. Por una parte, esta técnica permitió, obtener el polvo dentario necesario para los análisis moleculares en piezas dentarias que presentaban este tipo de alteraciones y por otra parte, la posibilidad de conservar las piezas dentarias provenientes de restos antiguos por el innegable valor que representan.

El cierre de la cavidad pulpar que impide el acceso a los conductos radiculares, suele producirse por diversos factores tales como:

a) Traumas oclusales, debido al consumo de alimentos muy duros que convierten las fuerzas masticatorias en irritantes, provocando la retracción de la pulpa cameral, (Andreansen,1987, b) Cambios fisiológicos inducidos por la edad (Cohen *et al.*, 1998; Solheim, 1992; Ranly *et al.*, 1997; Otero, 2007; entre otros) que conllevan la disminución gradual de dicha cavidad por la continua aposición de dentina secundaria, c) Dentinogénesis imperfecta, en la que el diente se presenta opalescente, y la dentina formada irregularmente e hipomineralizada que puede llegar a provocar cámaras pulpares obliteradas y mayor tendencia a fracturas del esmalte, tal como lo sustentan Pardo *et al.* (2006) y Kim *et al.* (2007) y d) las condiciones ambientales de los yacimientos, que pueden provocar el cierre *post mortem* de la cavidad.

Sin embargo, la reconstrucción del estilo de vida de esta población respecto a la dieta, patología relacionada con la edad o patología oral, (Subirá y

Malgosa, 1992a y b; Carrasco y Malgosa, 1990; Malgosa y Campillo, 1991) no indica ninguna de las tres primeras causas, con lo que las condiciones ambientales que rodearon los enterramientos se postulan como los responsables principales de su aparición. Las alteraciones dentarias antes descritas (desmineralización y obturación de la cámara pulpar), no fueron observadas en las muestras de los individuos de Son Real y de Can Reiners, pudiendo indicar que los individuos de estas dos series se preservaron en mejores condiciones que los de **IP**.

En concordancia con la mayoría de los estudios de aDNA, en este estudio se seleccionó el mtDNA como marcador genético para la caracterización de los individuos de las series mallorquinas, por considerarse una herramienta genética fiable e idónea para el estudio evolutivo (Krings *et al.*, 1997; Richard *et al.*, 1995; Montiel, 2001; Maca-Meyer, 2002; Fernández Domínguez, 2005; Kivisild *et al.*, 2006; Solórzano, 2006). Por otra parte, la determinación de los linajes mitocondriales también representa una herramienta única para evaluar la autenticidad del aDNA, como lo vemos en el apartado 5.3, abajo.

5.2 EFICIENCIA EN LA RECUPERACIÓN DE MATERIAL GENÉTICO.

No siempre los restos esqueléticos pertenecientes a un mismo yacimiento presentan iguales condiciones de conservación y de preservación, debido tal vez a la existencia de factores inherentes a cada enterramiento que modifican estas condiciones. Se puede hipotetizar también que la edad de los individuos, las condiciones ante y *postmortem*, además del sitio preciso de enterramiento, pudieran ser responsables de una preservación diferencial. En este estudio, de los 134 individuos analizados, en 38 no se logró obtener DNA amplificable (Tabla XXXI).

Los resultados de este estudio, muestran un porcentaje de eficiencia mayor en los análisis de polimorfismos de restricción que en los análisis de secuencias de la región HVS-I: de 134 muestras procesadas, 96 fueron caracterizadas por

medio de análisis de RFLPs (71,94%), mientras que sólo se logró obtener secuencias de 48 individuos (35,82%), situación que guarda similitud con los trabajos de Montiel (2001) y Maca-Meyer (2002).

El porcentaje de eficiencia obtenido en la recuperación de DNA en las tres necrópolis (**SR:** 37 (68,51%); **IP:** 31 (77,50 %) **CR:** 28 (70%)) ha sido elevado, siendo estos resultados parecidos a los que han obtenido otros autores (Montiel, 2001; Maca-Meyer *et al.*, 2003; Solórzano; 2006). En todo caso, la efectividad obtenida en la presente investigación es satisfactoria tomando en consideración la antigüedad de las muestras procesadas, las condiciones adversas de preservación y el grado de deterioro de las mismas.

SERIES ANTIGUAS MALLORQUINAS		
SR N=54	IP N=40	CR N=40
SR Sep 75	IP A 1961,	CR49.1,
SR47-15	IP b-1	CR 33.1,
SR47-1	1961,	CR43.3,
SR50-1	IP BC-49,	CR24.2,
SR50-70	IP C24B,	CR46.1,
SR4412	IP C-31,	CR126.1,
SR50-30	IP N-7,	CR93.2,
SR2	IP N-13,	CR149/30,
SR50-29	IP 4,	CR30.1,
SR3	IP B-22	CR123,
SR36-1		CR Zanja III T1/
SR46-1		esq 3,
SR22-7		CR93.2
SR65-8,		
SR13-1,		
SR50-39		
SR2-67(4)		

Tabla XXXI. Individuos analizados en los que no se logró obtener DNA amplificable

5.3 CRITERIOS DE AUTENTICIDAD .

La mayoría de los métodos aplicados en la fase experimental de este estudio para evitar y detectar la contaminación, son compartidos por una colectividad importante de investigadores y publicados en diversos artículos (Handt *et al.*, 1994; Kalmár *et al.*, 2000; Montiel *et al.*, 2001; Haynes *et al.*, 2002; Fernández Domínguez, 2005; Solórzano, 2006; Montiel *et al.*, 2007; entre otros), pasando a formar parte de los llamados criterios de autenticidad. Con estos criterios se pretende demostrar la veracidad de los resultados, sin estar bajo la sombra del principal problema que se presenta en los análisis de aDNA, como lo es, la contaminación (Pääbo *et al.*, 2004; Montiel *et al.*, 2007).

Además de contar con un laboratorio exclusivo para los análisis de Pre-PCR de aDNA, entre los criterios de autenticidad utilizados en esta investigación, está la incorporación de controles o blancos de extracción (KE) y de amplificación (K-) en cada proceso de PCR, estrategia compartida por numerosos autores (Handt *et al.*, 1996; Stone y Stoneking, 1998; Carlyle *et al.*, 2000; Kolman y Tuross 2000; Montiel, 2001; Santos, 2005; Fernández Domínguez, 2005), ya que estos permiten la detección de posibles contaminaciones durante los distintos procesos de la fase experimental (extracción y amplificación) lo que también contribuye, según Montiel (2001) y Montiel y Malgosa (2003), a determinar contaminaciones de tipo puntual, cuando se lleva un registro detallado del resultado de estos controles.

En este sentido y como se ha observado en los resultados (tabla VII), un sólo set de muestras fue descartado debido a que el blanco de extracción (KE) resultó contaminado. Una vez secuenciado, la secuencia de este blanco mostró cambios nucleotídicos que se correspondían con la secuencia de la autora de esta tesis. Esta eventualidad no es nueva, pues situaciones similares fueron reportadas por Béraud-Colomb *et al.* (1995); Maca-Meyer (2002); Lalueza-Fox *et al.* (2003) y Spencer y Howe (2004). En este caso, se realizó otra extracción con nuevas muestras de estos mismos individuos, obteniendo un resultado que permitió caracterizar a estos individuos e incluirlos en el análisis.

En los casos en los que hubo indicio de contaminación en el proceso de amplificación, detectada en los blancos de PCR (K-), la situación fue afrontada repitiendo los procesos con el debido descarte de alícuotas de los reactivos y los productos de PCR contaminados.

Otro de los criterios para autenticar el aDNA consiste en replicar las muestras tanto en el propio laboratorio, como en un laboratorio independiente. En este estudio, fueron seleccionadas de forma aleatoria dos muestras (SR 43.1 y SR Sep 74), analizadas previamente (Laboratorio 1), para ser replicadas en el nuevo laboratorio (Laboratorio 2) de la Unidad de Antropología biológica de la UAB (apartado 3.2.1 de Muestras y Metodología). Los resultados fueron idénticos, descartando con ello la posibilidad de contaminación intra-laboratorio, tal como lo sugieren autores como Willerslev y Cooper (2004).

La necesidad de realizar múltiples amplificaciones de un mismo extracto o desde extractos diferentes de un mismo individuo, resulta de mucha importancia a la hora de autenticar resultados y en nuestro caso, se realizó seleccionando al azar 5 muestras de cada serie (16%) que fueron amplificadas en varias oportunidades, tanto la región codificante como la región hipervariable I, seguido de su respectivo análisis por RFLPs y secuenciación, obteniéndose resultados concordantes.

La presencia de determinadas sustituciones nucleotídicas permite inferir el linaje mitocondrial al que pertenece la secuencia (Torrioni *et al.*, 1996), por lo que la correspondencia entre los análisis de secuencia de la HVS-I y los RFLP's, resulta fundamental para la autenticación del DNA mitocondrial en restos antiguos (Stone y Stoneking, 1998; Montiel, 2001), permitiendo una mejor interpretación tanto de la reconstrucción filogenética dentro de las series analizadas, como en el estudio de las relaciones interpoblacionales. En nuestro trabajo existe una total correspondencia entre los polimorfismos detectados mediante RFLP's y las secuencias de la de la región control de 48 individuos, de un total de 96 muestras, representando el 50% de las muestras efectivas,

pudiendo este resultado ser considerado un argumento a favor de la autenticidad de nuestros resultados (Montiel *et al.*, 2001; 2007; Bandelt, 2005).

La variabilidad mitocondrial encontrada entre las muestras de un mismo grupo o set de extracción de las series antiguas mallorquinas analizadas en el presente trabajo, se ajusta al modelo de variabilidad esperado para poblaciones europeas, lo que nos permite afirmar que las muestras analizadas cumplen con otro de los criterios de autenticidad, aplicados a estudios poblacionales humanos descritos, por Montiel y colaboradores (2001) y Pääbo y colaboradores (2004), referido al principio de "sentido filogenético".

La diversidad obtenida en los sets analizados y la variabilidad genética encontrada entre las series antiguas, son consistentes con el contexto filogenético, por lo tanto, refuerzan la autenticidad. Consideramos además que la clonación como proceso debe ser realizado en casos puntuales y bajo condiciones específicas, ya que representa también un riesgo adicional de contaminación (Montiel *et al.*, 2007) y por este motivo dicho procedimiento no se realizó en el presente estudio, siendo substituido por un análisis crítico de los porcentajes de eficiencia y contaminación, siguiendo la línea propuesta por Gilbert y colaboradores (2005).

5.4 ANÁLISIS FILOGENÉTICOS Y POBLACIONALES .

La población antigua analizada está formada por tres yacimientos ubicados en el norte de la isla de Mallorca, con una datación que va desde la edad de Hierro, a finales del siglo VI a.C., hasta época Tardorromana. Por su ubicación geográfica en el centro del Mediterráneo Occidental, el Archipiélago Balear (y por ende, la isla de Mallorca), ha sido considerado como un punto estratégico cultural (Massanet *et al.*, 1997), por lo que las series antiguas pueden aportar una información fundamental en la interpretación de los movimientos políticos y sociales.

Considerando estas relaciones históricas, se analizó y caracterizó la estructura genética de muestras poblacionales provenientes de las Necrópolis Talayóticas de S'Illot des Porros y Son Real y de la Necrópolis Tardorromana-Alto medieval de Can Reiners, empleando el *mtDNA* como marcador genético. Con este análisis se intentó determinar la eventual continuidad genética a lo largo de la cronología representada, contribuyendo al esclarecimiento de la dinámica de la población mallorquina y estableciendo las posibles relaciones filogenéticas con otras poblaciones que conforman el arco mediterráneo.

En este estudio se caracterizaron 96 individuos a través de RFLPs del *mtDNA*, de los cuales, en 48 se logró obtener la secuencia de la región HVI para analizar la correspondencia entre los dos análisis. Cabe señalar que la mayoría de los individuos analizados fueron clasificados entre los haplogrupos descritos en la literatura para poblaciones europeas, con la excepción de un individuo de la serie de CR que presentó la mutación 16223T y que fue definido, por RFLP, como perteneciente a un posible linaje africano (L3); caso similar al reportado por González *et al.* (2001).

El haplogrupo H fue el más frecuente, resultado que está en concordancia con los presentados por otros autores (Torroni *et al.*, 1996; Massanet *et al.*, 1997; Richards *et al.*, 2000; Montiel, 2001; Picornell *et al.*, 2005; Caramelli *et al.*, 2007).

La variabilidad mitocondrial encontrada entre las series antiguas analizadas, basadas en la frecuencia de haplogrupos y la diversidad entre las secuencias de la región HVS-I, sugieren ciertas divergencias entre la serie de **IP** y las series de **SR** y **CR**. Las diferencias afectan principalmente los valores de diversidad genética dada por la mayor presencia de haplotipos únicos de **IP**, no tratándose seguramente de un grupo distinto sino más bien de una población en la que factores estocásticos, como la deriva genética, se hicieron presentes.

Para poder interpretar e inferir sobre los aspectos relacionados con la variabilidad genética presente en los grupos poblacionales estudiados, en esta tesis se compararon, con métodos estadísticos y filogenéticos, la frecuencia, los tipos mitocondriales y la variabilidad nucleotídica de la región Hipervariable I (HVS-I) del *mtDNA* de las tres series antiguas estudiadas con otras poblaciones antiguas y actuales del arco mediterráneo.

5.4.1 LAS NECRÓPOLIS TALAYÓTICAS DE SON REAL Y S'ILLOT DES PORROS.

Las series de Son Real (Font, 1974) y S'Illot des Porros (Malgosa, 1992), situadas culturalmente en la última etapa talayótica, en lo que sería la cultura autóctona de Mallorca, se ubican en el Norte de la isla de Mallorca, y se encuentran situadas una frente a otra. La proximidad geográfica no siempre avala la homogeneidad biológica y es factible la existencia de diferencias entre los núcleos poblacionales que originaron ambas series que expliquen el uso simultáneo pero a la vez diferenciado de ambas necrópolis. En este sentido, la existencia de una eventual variabilidad genética podría representar un factor explicativo de las diferencias socioeconómicas entre integrantes de una misma población o entre poblaciones diversas (Rihuete, 2000).

Los estudios previos de las necrópolis ofrecen informaciones en cierto sentido contradictorias. Por un lado, los estudios arqueológicos basados en la superposición de las dataciones, en la secuencia de ritos funerarios (**SR** incinera en su época final, mientras que **IP** lo hace en su época de mayor apogeo) y en la semejanza de los ajuares, determinan la continuidad entre estas necrópolis (Tarradell, 1964; Hernández, 1998), mientras que los estudios antropológicos han hipotetizado una diferenciación poblacional representada por la inhumación diferencial de una población de élite en **IP** (Malgosa, 1992), planteándonos la posibilidad de la existencia de diferencias intragrupalas.

En relación con otros pueblos, los análisis antropológicos sugieren que en época prehistórica, estas necrópolis se relacionaron con la cultura argárica del sudeste peninsular. En su etapa talayótica no faltan paralelos culturales en

otras islas del Mediterráneo por sus construcciones megalíticas (Malgosa, 1992; Guerrero *et al.*, 2002); tal es el caso de la cultura Nurágica de la isla de Cerdeña. Por otra parte ha quedado demostrado, por los recientes estudios realizados por Jordana (2007), la estrecha relación entre las series talayóticas mallorquinas de **SR** (Font, 1999) y de **IP** (Malgosa, 1992) con poblaciones del litoral peninsular catalán.

5.4.1.1 SON REAL:

La Necrópolis conocida como “el cementerio de los fenicios” (Font, 1974) o llamada también “Punta de los Fenicios” (Hernández *et al.*, 1998) y considerada por Guerrero y colaboradores (2006) como una necrópolis única en la isla, representa la serie más antigua de las tres que han sido analizadas en este estudio.

De los 54 individuos analizados de este yacimiento, 37 (68.5%) han sido caracterizados genéticamente, restando 17 cuyo DNA no fue amplificable. La serie antigua de **SR** presenta 8 haplogrupos distintos H, U, K, PHV, J, T W y X, donde los haplogrupos H (-7025 *Alu I*), U (+12308 *Hinf I*) y J (-15609 *Bst OI*) registraron las frecuencias más altas.

Esta serie muestra una distribución de frecuencias de haplogrupos muy parecida a la que exhiben la mayoría de las poblaciones del arco mediterráneo, tanto antiguas como contemporáneas, lo que hace suponer que el sustrato genético en la zona se ha mantenido a lo largo del tiempo. La serie de **SR** registra distancias genéticas menores con las series de **IP** y de **CR**, en relación a las otras poblaciones comparadas, sin embargo, al analizar la diversidad genética entre estas tres series antiguas mallorquinas, se observa que existen diferencias significativas, esto debido tal vez al contexto histórico-genético que envolvió a cada una de estas series poblacionales.

Por otro lado, el hecho de que una secuencia de la necrópolis talayótica de **SR** sea compartida con la serie de Cerdeña antigua, supone un posible paralelismo entre las poblaciones de las culturas talayótica y Nurágica. Así

mismo, no deja de ser interesante que **SR** exhiba algunos haplotipos que la relacionan con las poblaciones contemporáneas tanto de las islas Baleares (Picornell *et al.*, 2005) como de la Península Ibérica (Corte-Real *et al.*, 1996; Montiel, 2001; Fernández Rosas, 2005; Picornell *et al.*, 2005), como es el caso de las mutaciones 16221C y 16278C, indicando una continuidad del acervo genético de la región.

Así mismo, los estudios morfológicos de la Necrópolis de **SR** realizados por Font (1974), refieren, de igual manera, una tipología mediterránea, aunque también indican una posible relación de Mallorca con poblaciones del Norte de África y del Mediterráneo Oriental (Malgosa, 1992), lo que contribuye a confirmar nuestros datos genéticos (Ver 4.4.1.4, de resultados), que atestiguan la presencia de estas relaciones filogenéticas.

5.4.1.2 S'ILLOT DES PORROS

De los 40 individuos analizados de este cementerio prehistórico, perteneciente a la cultura talayótica avanzada de los s. VI-II a.C., de la Edad de Hierro (Malgosa, 1992; Hernández *et al.*, 1998), 31 (77.5%) han sido caracterizados genéticamente, pudiéndose obtener fragmentos de hasta 187 pb de la región Hipervariable I.

La comparación de las frecuencias de haplogrupos, los índices de diversidad genética estándar y la comparación de distancias genéticas en base a la frecuencia de haplogrupos (apartado 4.4.1.3 de Resultados), indican que la serie poblacional talayótica de S'Illot des Porros presenta una diferencia en el acervo del mtDNA respecto a **SR** y **CR**.

En la serie antigua de **IP**, se han encontrado al menos 5 haplogrupos distintos H, U, V, W y X y la frecuencia más elevada la representan los haplogrupos H, U, y U5. A partir del análisis molecular (RFLPs y las secuencias), se puede deducir que la población de **IP** poseía una diversidad genética mitocondrial que le sitúa en una posición intermedia respecto a la diversidad de otras series antiguas y modernas.

Así mismo, la serie de **IP** exhibe una mayor distancia genética con las dos series antiguas mallorquinas de **SR** y **CR** y con la mayoría de las poblaciones de referencia, mostrándose más distante, lo que genéticamente hace suponer que es distinta a las demás poblaciones analizadas, en conformidad con recientes análisis craneométricos realizados por Jordana (2007). También deberíamos evocar aquí la hipótesis de Malgosa (1992) que sugiere que los enterramientos realizados en el islote pertenecerían a una élite dentro la población mallorquina de la bahía de Alcúdia, en función de su constitución ósea más estilizada, con una mayor altura y una menor robustez. De esta forma, las características morfológicas avalan una diferenciación entre **IP** y **SR** dentro de una misma población.

Así pues, la diferenciación genética que muestra **IP** con **SR** podría ser una causa de un efecto fundador o de otros procesos estocásticos como la deriva genética, aunque la primera toma más cuerpo a la luz de otros datos antropológicos. Hay que tener en cuenta, sin embargo, que ambas necrópolis dejaron un número parecido de enterramientos (aproximadamente 250) aunque con una mayor proporción de incineraciones en **IP**, y ocupan un arco temporal de más de 4 siglos. Se trata pues de grupos pequeños como la mayoría de las poblaciones antiguas donde los diversos procesos evolutivos pudieran tener una gran influencia.

Un problema añadido es el del muestreo ya que en ninguno de los dos yacimientos existe información arqueológica sobre parentesco u otro tipo de relaciones familiares. No siendo posible una estrategia de selección de muestras basada en el conocimiento histórico o temporal, sino solamente en la disponibilidad de material (piezas dentarias alojadas en sus respectivos maxilares) y en su estado de conservación, la muestra podría estar sesgada. Se ha tratado en lo posible de no analizar más de 1 individuo de una misma tumba en **SR** y **CR** evitando así las posibles relaciones familiares (Hernández Gasch, 1998). En el caso de **IP** todos los individuos provienen de 3 grandes

tumbas construidas (Malgosa, 1992) y no se tiene información de agrupaciones que pudieran ser interpretadas como grupos con una relación singular.

Además, los índices de diversidad relativamente altos presentados por estas series antiguas, y en especial de **IP** (valores relacionados con el hecho de que presentan un elevado número de haplotipos únicos), sugieren que en todo caso, no se realizó un muestreo sesgado.

5.4.2 NECRÓPOLIS TARDORROMANA DE CAN REINERS.

En relación a la serie alto-medieval de Can Reiners, ésta representa uno de los yacimientos arqueológicos más importantes de la isla de Mallorca de época romana y dista de la cultura talayótica aproximadamente unos 600 años, lo cual hace suponer que los cambios históricos que transformaron de forma importante la vida en la isla de Mallorca, pudieran reflejarse en ella.

Se analizaron un total de 40 individuos, 28 de los cuales (70%) pudieron ser caracterizados genéticamente. De las tres series antiguas mallorquinas analizadas en este estudio, **CR** fue la que presentó un mayor número de haplogrupos distintos, siendo los haplogrupos H (-7025 *Alu I*) y U (+12308 *Hinf I*) los que registraron las frecuencias más altas.

La serie antigua de **CR** presenta una frecuencia elevada del haplogrupo H y la diversidad genética mitocondrial la sitúa entre otras series antiguas y modernas del contexto europeo (Richards *et al.*, 2000; Morelli *et al.*, 2000; Achilli *et al.*, 2004; Picornell *et al.*, 2005). Por otra parte, de las tres series analizadas, Can Reiners es la que registra distancias genéticas menores e inclusive nulas en relación a las series analizadas en esta tesis y a las poblaciones de referencia.

Cabe destacar que en la serie tardorromana de **CR**, se ha encontrado una secuencia que posiblemente pertenezca al haplogrupo L3, que muestra la mutación 16223T considerada por algunos autores como un *hotspot* mutacional (Gilbert *et al.*, 2003). Es la única secuencia de linaje africano presente en este estudio, lo que podría considerarse como una aportación

genética africana que, aunque pueda parecer mínima, no deja de tener importancia dentro del contexto cultural de esta población antigua.

Esta contribución puede muy bien ser factible debido a la proximidad de la costa norte africana al archipiélago Balear y en parte a una posible mezcla con poblaciones del Norte de África como lo refrendan las similitudes morfológicas señaladas en el estudio antropológico (Malgosa, 1992) o incluso, puede ser una consecuencia de las aportaciones genéticas de la población romana que se estableció en Mallorca incluyendo sus huéspedes y esclavos o a los contactos comerciales con otros pueblos del mediterráneo. Picornell y colaboradores (2005) consideran que puede darse una influencia africana en poblaciones europeas, aunque esporádica.

Así mismo, dentro de esta serie se encontró un individuo caracterizado como I, presentando en su secuencia el mismo cambio nucleotídico en la posición 16223T. Esta secuencia también la reporta Richards y colaboradores (2000), pero en nuestro fragmento no es posible observar la mutación fundadora de este haplogrupo (16129).

5.4.3 LAS NECRÓPOLIS ANTIGUAS MALLORQUINAS Y LAS POBLACIONES DE COMPARACIÓN DEL ARCO MEDITERRÁNEO.

A través de las distintas fuentes bibliográficas, es posible apreciar el papel determinante que ha jugado el Mar Mediterráneo actuando como elemento integrador de poblaciones asentadas en sus riberas. Desde la antigüedad, fenicios, griegos y cartaginenses, llevados por sus propios intereses, insertaron un cruce biológico y cultural, que han hecho de este espacio una encrucijada genética desde tiempos muy remotos, lo cual puede constatarse analizando el acervo genético matrilineal encontrado entre las series antiguas analizadas en este estudio.

5.4.3.1 REGIÓN CODIFICANTE DEL MTDNA

Todos los haplogrupos del mtDNA considerados europeos (H, I, J, K, T, U2e, U3, U4, X, y W) con la excepción de U5 y V (que probablemente surgieron *in situ*), se originaron en el Oriente Medio (Achilli *et al.*, 2004), y debieron dispersarse en Europa durante los periodos de colonización del continente hace unos 40.000 años (Paleolítico Superior) (Comas, 2007) o también debido a contactos más recientes (Torroni *et al.*, 1998; Richards *et al.*, 2000).

En base a ello, se puede decir que el sustrato genético determinado en las tres series analizadas en este estudio es mayoritariamente (91,6 %) de linajes considerados europeos (H, J, K, U, T, V y X), siendo los más representados aquellos cuya genealogía es más antigua, lo que indica el origen común de las series analizadas.

Por otro lado, se obtuvo un porcentaje minoritario de haplogrupos no europeos (8,4%) que incluye linajes asiáticos, específicamente del Cercano Oriente (6,8%) representado básicamente por el haplogrupo W. Igualmente, de África (2,2%), a través del haplogrupo L3. Estos datos están de acuerdo con los datos morfológicos de los estudios antropológicos previos sobre las necrópolis talayóticas pues reflejan un sustrato europeo (Malgosa, 1992; Jordana, 2007), con alguna influencia de poblaciones más orientales (Cerdeña, Próximo Oriente, entre otras [Font, 1974]). Así mismo, los datos arqueológicos referidos tanto a los aspectos constructivos como ajuares, avalan estrechos contactos con otros pueblos.

En este estudio, los haplogrupos H, U y W tuvieron representación en las tres poblaciones estudiadas y su frecuencia es consistente con las encontradas en las poblaciones desde las primeras expansiones humanas en la Península Ibérica (Maca-Meyer *et al.*, 2001), por lo tanto, no debe sorprender la representatividad de estos haplogrupos en las poblaciones objeto de este estudio.

El análisis comparativo de haplogrupos (componentes principales, prueba exacta de diferenciación poblacional y la distancia genética) entre las tres

series antiguas mallorquinas y las poblaciones de referencia (tabla V) muestra diferentes comportamientos, lo cual refleja ciertas diferencias poblacionales.

En los resultados del análisis de la región codificante entre las series antiguas mallorquinas (apartado 4.2.1. de resultados), se observó que las series de **IP** y **CR**, exhiben una relación cercana, separándose ambas series de la población antigua de **SR**, reflejándose esta misma situación en el análisis interpoblacional a nivel Mediterráneo, donde **IP** y **CR** se agrupan con otras series antiguas y con poblaciones contemporáneas de Europa mientras que la población talayótica de **SR**, se relaciona con poblaciones del Este mediterráneo y Norte de África.

La proximidad que presentan las series de **IP** y **CR** con poblaciones europeas y específicamente con las de la Península Ibérica, se debe posiblemente a la presencia de haplogrupos tales como H, lo que puede observarse en el gráfico de correlaciones de haplogrupos del análisis de componentes principales, que muestra el peso relativo de cada haplogrupo. Incluso, de las tres series mallorquinas analizadas en este estudio, **CR** es la única que no manifiesta diferencias con Cataluña, indicando que esta serie antigua presenta una composición genética más homogénea en relación a la distribución de haplogrupos. Esto resulta interesante ya que reafirma la hipótesis de que la isla de Mallorca recibió el principal flujo genético de Europa, lo que también puede sustentarse con los datos craneométricos y morfológicos aportados por Jordana (2007), que muestran una estrecha relación de la isla de Mallorca con poblaciones del litoral peninsular catalán.

La presencia de los haplogrupos PHV en la serie antigua de **SR** y del haplogrupo W en esta misma serie y en **CR**, sugieren un posible flujo migratorio desde el Este mediterráneo hacia las Islas Baleares, específicamente hacia Mallorca, debido tal vez al desplazamiento que realizaron pueblos como los fenicios, cartaginenses y romanos por el Mediterráneo y que incluso ocuparon sus riberas (Bosch, 2002). Este flujo génico, en sentido este-oeste, era común ya en tiempos pretéritos debido a contactos principalmente de tipo comercial y de intercambio entre las poblaciones mediterráneas.

En el árbol filogenético de Neighbor-Joining construido a partir de la distancia genética de Reynolds y colaboradores (1983) de las series antiguas (apartado 4.4.1.6 de resultados), se observa que **SR** se sitúa en un punto intermedio entre el grupo conformado por las series de la península Ibérica (Pre Románico Ibérico y Aldaieta) y de Mallorca (**IP** y **CR**), y la serie del Próximo Oriente antiguo, confirmando lo que se observa en otros análisis donde **SR** queda separada de **IP** y **CR**.

Las agrupaciones poblacionales observadas en el análisis de componentes principales elaborado a partir de los datos de la distribución de frecuencias de haplogrupos de las series antiguas y poblaciones contemporáneas del Archipiélago Balear (apartado 4.4.1.4, de resultados), sugieren que estas islas han recibido, a lo largo de los siglos, la influencia de diferentes pueblos que han dejado su huella genética, visto a través de la diversidad mitocondrial encontrada en este estudio.

Tal es el caso de la serie de **SR**, que exhibe una relación cercana con las poblaciones contemporáneas de Menorca y Chuetas. Esta proximidad también podría traducirse como el producto de la influencia que recibieron estas islas a lo largo de muchos años por parte de culturas antiguas como la fenicia, expresada por la presencia de los haplogrupos W y PHV. Asimismo, la relación cercana entre **IP** y **CR** con Mallorca e Ibiza sugiere una continuidad genética temporal por vía matrilineal.

Con los resultados descritos, se puede afirmar que las series antiguas mallorquinas comparten un sustrato genético compatible con las poblaciones baleáricas actuales y con las europeas en general, suponiendo una continuidad de los linajes matrilineales a través del tiempo.

5.4.3.2 REGIÓN HIPERVARIABLE I DEL MTDNA (HVS-I) .

Las secuencias obtenidas en las series de **SR**, **IP** y **CR** han sido comparadas con secuencias publicadas de 31 poblaciones del arco mediterráneo, tomando como base los fragmentos de la región HVS-I del mtDNA de 156 y 126 pb (descritos en el apartado 3.7.2 de Muestras y Metodología), por lo que los análisis estadísticos se realizaron tomando en consideración ambos fragmentos, los cuales según Montiel (2001), engloban parte de las mutaciones consideradas diagnósticas para definir algunos de los linajes europeos tales como H, U, K, V, entre otros.

En este análisis se presentaron casos donde se hizo evidente la necesidad de ampliar el fragmento de secuencia, para lograr una mejor interpretación dentro del contexto filogenético y resultados más fidedignos. Tales son los casos de los individuos SR/1-67-A (2) con la mutación 16278T y el individuo SR43.5 que exhibió el cambio 16242C, ambos caracterizados por RFLPs como J. Sin embargo, la limitación del fragmento analizado, no permitió ver si estaban presentes las substituciones fundadoras de este haplogrupo, 16069C y 16126C (Macaulay *et al.*, 1999; Richards *et al.*, 2000).

Los valores del índice de diversidad genética (apartado 4.4.2.1.1 de resultados), calculado a partir de las secuencias tanto de 126 pb como de 156 pb, que presentan las series de **SR**, **IP** y **CR** (Tabla XX), muestran que estas series cercanas geográficamente se relacionan de forma distinta con series antiguas y poblaciones contemporáneas de referencia, debido tal vez a los haplogrupos presentes en cada una de estas series antiguas mallorquinas.

En el caso de la serie de **IP**, ésta exhibe una proximidad con poblaciones europeas; específicamente de la Península ibérica quizás por la presencia de los haplogrupos H y U. La serie antigua de **SR** se haya próxima a la población contemporánea de Chuetas (posiblemente por la presencia del haplogrupo W) y **CR** muestra proximidad con Argelia, reflejando una posible influencia de esta población norteafricana a través del individuo caracterizado como posible L3.

Asimismo, a través del haplogrupo U5, las series de **SR** e **IP** exhiben una relación cercana con poblaciones actuales de las Islas Baleares y con la población sarda, relación poblacional que también fue reportada por Díaz (2004), quedando demostrada una relación filogeográfica con las islas mediterráneas.

Comparando los índices de diversidad genética derivados de las frecuencias de haplogrupos con el de las secuencias de la HVS-I, se observa que los valores considerados a partir de las frecuencias de haplogrupos fluctúan entre rangos menores a los obtenidos a partir de las secuencias tanto de 126 como de 156 pb, lo que indica que la información proporcionada por las frecuencias de haplogrupo es más restringida al evaluar este parámetro, lo que a su vez muestra que los haplogrupos son menos confiables a la hora de estimar la diversidad (Montiel, 2001). Esto es relevante, pues las diferencias en la evaluación de la diversidad no sólo son cuantitativas, sino también cualitativas, como lo muestra la marcada variación en cuanto a la ubicación de la mayoría de poblaciones de referencia del arco mediterráneo, en los rangos de diversidad estimados con las diferentes bases de datos (haplogrupos vs. secuencias).

El índice de diversidad obtenida a partir de secuencias de la serie talayótica de **IP** se aproxima al valor medio de diversidad obtenido entre todas las poblaciones. A pesar de que las series de **SR**, **IP** y **CR** ocupan diferentes posiciones, presentan una diversidad nucleotídica mayor a la exhibida por las poblaciones antiguas de la Península Ibérica (Plaça Vella, Pre Románica Ibérica y Aldaieta), esto se debe a que las series antiguas mallorquinas presentan un elevado número de haplotipos únicos en relación al grupo de series antiguas de la Península Ibérica.

El pool genético de estas series antiguas se caracteriza por la presencia de numerosos haplotipos únicos, situación que se evidencia al observarse una alta diversidad nucleotídica. Un total de 12 secuencias (25%) resultaron ser únicas en el análisis intrapoblacional (apartado 4.4.2.1 de resultados, manteniéndose como tales al realizar las redes medias construidas para cada uno de los haplogrupos europeos (asociados según su afinidad genética).

La serie de Son Real exhibió secuencias únicas que no fueron encontradas en ninguna de las poblaciones de referencia, lo que podría explicarse si se trata de haplotipos ancestrales que posiblemente hayan desaparecido como consecuencia de la deriva genética u otros procesos, tal es el caso del haplotipo SR15T, a pesar de que autores como Massanet y colaboradores (1997) y Picornell *et al.* (2005), que reportaron una alta frecuencia del haplogrupo T en las islas Baleares, tal como sucede en algunas áreas del mediterráneo (Tomàs *et al.*, 2006), lo que está en consonancia con una elevada diversidad, quizás incluso mayor en la antigüedad.

La serie de IP presenta una mayor diversidad mitocondrial con respecto a SR y CR, debido tal vez a la presencia de un mayor número de haplotipos únicos posiblemente relacionado con la especificidad (quizás una élite?) de la serie de IP. De las 11 secuencias encontradas, sólo el haplotipo CRS es compartido con un gran número de poblaciones del arco mediterráneo, pero ninguno de los 10 restantes presenta esta característica, como se constató al hacer la comparación a través de los *Median Joining Networks* construidos para cada uno de los haplogrupos fundadores presentes en esta serie.

Existen diversas posibilidades para explicar la presencia de estos haplotipos únicos encontrados en estas series mallorquinas:

- 1.- Podría tratarse de linajes exclusivos de estas tres series antiguas mallorquina que desaparecieron, dejando poca o ninguna descendencia].
- 2.- Puede tratarse de linajes que hace 2700 años estuvieron presentes en las poblaciones usadas en la comparación y que se han perdido con el transcurso del tiempo hasta la actualidad.
- 3.- Podría relacionarse con secuencias, que por motivos aleatorios, no han sido muestreada en las poblaciones analizadas.
- 4.- Podrían tratarse de daños moleculares *postmortem* debido a la antigüedad de estas muestras y la forma como han estado preservadas.

En base a lo anterior, al realizar el análisis comparativo de las secuencias únicas de las series mallorquinas de este estudio con los trabajos publicados por Excoffier y Yang (1999) y Gilbert y colaboradores (2003), (tabla XXXII), donde definen las posiciones nucleotídicas con mayor tasa mutacional *in vivo* y con mayor incidencia de daño molecular *postmortem*, se determina que las mutaciones exhibidas en la secuencia de los individuos SR/43.5, SR/47.3, IP BC-16, IP B-2 y IP C-56' no son consideradas por estos autores como posiciones mutacionales problemáticas, lo que permite sustentar la hipótesis de que se traten de linajes exclusivos de estas series, característicos de uno u otro segmento de la población. Ello supone una disociación entre ambas series, pero también respecto a las demás lo cual se sustenta en la singularidad de estos grupos humanos que enterraron en la bahía de Alcudia durante la etapa talayótica y que les convierte en necrópolis únicas en la isla; no puede descartarse, sin embargo, que se trate de secuencias antiguas que se han perdido con el paso del tiempo o bien, que no han sido muestreadas en las poblaciones contemporáneas.

Individuo	Motivos	Excoffier y Yang, 1999	Gilbert <i>et al.</i> , 2003
SR/22.D	16291T, 16293G	291-(4)	291-(1)
		293-(4)	293-(1)
		294-(4)	294-(2)
CR/E-89	16266T, 16294T, 16311C	311-(4)	311-(2)
		223-(4)	223-(4)
IP CN-14	16223T, 16262T, 16293G	293-(4)	293-(1)
SR/43.5	16242T	-	-
SR/47.3	16344T	-	-
CR/47.57	16260T, 16278T	278-(2)	278-(2)
IP BC-16	16325C	-	-
IP C-20	16325C, 16355T, 16356C	355-(3)	355-(2)
		290-(2)	290-(3)
SR/54.1	16290T, 16292T, 16294T	294-(4)	294-(2)
IP B-2	16257Y(A6T);	-	-
IP C-56'	16261C	-	-
SR/29.05	16327T	327-(0)	327-(3)

Tabla XXXII - Datos comparativos entre los sitios mutacionales de los haplotipos únicos de las series antiguas mallorquinas y los datos de Excoffier y Yang (1999) y Gilbert *et al.* (2003), quienes establecieron una escala de 1 al 4 para determinar los cambios nucleotídicos con tasa mutacional *in vivo* y con mayor incidencia de daño molecular *postmortem*.

Sin embargo, el resto de cambios observados en las secuencias únicas pertenecientes a los individuos SR/22.D, IP CN-14, CR/47.57, IP C-20, SR/54.1, SR/29.05 y CR/E-89, presentan cambios nucleotídicos con tasa mutacional *in*

vivo y con mayor daño molecular *postmortem*, que sugieren posibles daños moleculares debidos tal vez, a la antigüedad de las muestras.

Por otra parte, en la serie de **CR**, se detectaron dos individuos (CR/70.1 y CR/67.1) en cuya secuencia se observó la mutación 16223T y que fueron caracterizados como L3 e I al realizar el análisis de correspondencia HVS-I del mtDNA-RFLP's. Estos individuos comparten esta mutación con individuos de poblaciones contemporáneas de la Península Ibérica (Sur de Portugal, Cataluña y Pedroches), Cerdeña, Norte de África (Túnez, Marruecos y Egipto) y Asia (Turquía, Siria y Palestina). Así, considerando el contexto filogeográfico, la posibilidad de que estos cambios nucleotídicos representen daños moleculares *postmortem* se ve reducida.

Con respecto a la reconstrucción filogenética, a partir de la distancia genética de Reynolds *et al.* (1983) (apartado 4.4.3.1 de resultados) entre secuencias de la HVS-I con el fragmento de 156 pb de las poblaciones de referencia, se observa que entre las series de **SR** y **CR**, la distancia es nula y al analizar este mismo parámetro con las secuencias de 126 pb, se observa que la serie de **IP** resulta más distante. De forma general, el patrón que se observa en el análisis realizado por Jordana (2007) sobre las variables morfométricas (craneométricas y dentales) en relación al origen de estos individuos y el realizado por Rihuete (2000) basado en rasgos epigenéticos, también, corroboran los resultados moleculares obtenidos en este estudio.

De estas series, **CR** exhibe una menor distancia no sólo con las series antiguas analizadas, sino que muestra un comportamiento genético similar con el resto de poblaciones de referencia. En relación a este índice obtenido a partir de los dos fragmentos analizados, se observa que la población contemporánea de Argelia es la que presenta valores mayores con respecto a las tres series analizadas, apoyando lo expuesto por algunos autores (Ivanova *et al.*, 1999; Lefevre-Witier *et al.*, 2006; Tomàs *et al.*, 2006) quienes argumentan que esta población se mantiene genéticamente alejada de algunas poblaciones insulares mediterráneas como Mallorca y Sicilia.

El análisis filogeográfico realizado a través de redes medias (*Median Joining Networks*) muestra de manera general las relaciones poblacionales exhibidas en los distintos análisis, detectándose claramente la relación entre **SR** con poblaciones de Eurasia así como la relación entre **IP** y **CR** con poblaciones europeas.

Tal como se explicó en el apartado 3.7.2 de Muestras y metodología, las secuencias recuperadas de la serie talayótica de S'Illot des Porros tenían un menor número de pares de bases, por lo que esta serie fue analizada junto con las poblaciones de referencia, empleando el fragmento de 126 pb, situado entre las posiciones 16243-16365.

No obstante, con el fragmento de 126 pb, no se pudo evaluar la posición 16221T exhibida por un individuo de la serie de **SR** y representada por el haplotipo SR03H, quedando esta secuencia incluida en el nodo principal (CRS), lo que demuestra una vez más que fragmentos muy cortos exponen ciertas mutaciones diagnósticas, pero no se logra obtener un análisis comparativo poblacional completo.

Al analizar las secuencias a través de las redes medias (apartado 4.4.3.2 de resultados), se observa la afinidad genética de las series antiguas analizadas en este estudio con las poblaciones que conforman el arco mediterráneo tomadas como referencia para la comparación. Esto está determinado por la presencia de los haplogrupos H, U y J, que representan los clusters con mayor porcentaje entre las muestras, siendo el haplotipo CRS, considerado por Richards y colaboradores (2000) como haplotipo fundador del haplogrupo H y U el más representado y del cual derivan otros haplotipos que exhiben cambios nucleotídicos que reflejan la relación filogeográfica que puede existir entre las poblaciones del arco mediterráneo, pretéritas y/o contemporáneas.

En relación a las secuencias compartidas observadas entre las series analizadas, **SR**, a pesar de ser la serie más antigua, es la que comparte el mayor número de haplotipos. Esta serie desde el punto de vista filogeográfico,

se aproxima a las poblaciones de Eurasia, tal como se observa en los análisis de componentes principales (ver apartado 4.4.14 de resultados).

Es importante destacar que las islas que conforman el Archipiélago Balear jugaron un papel estratégico en las guerras púnicas, pudiendo ser la presencia de este linaje una consecuencia de ello. Es curioso constatar que en un estudio morfológico realizado por Malgosa (1992), se citaba una proximidad morfológica con poblaciones del norte de África (Túnez y Argelia) y que la influencia de estos pueblos en época protohistórica es innegable. A esto contribuye la presencia de un individuo caracterizado como un posible L3 en la serie de **CR**, sugiriendo así un flujo genético desde África a la isla de Mallorca debido a la proximidad de las riberas africanas con el Archipiélago Balear; o bien, podría tratarse de una traza (Fernández Domínguez, 2005), dejada por Cartaginenses, quienes iniciaron la exploración de Mallorca en el año 700 a.C, que se fue manteniendo con el paso del tiempo; o incluso más tardía.

Sin embargo, a través del análisis de componentes principales (apartado 4.4.1.4 de resultados), se evidencia la relación filogeográfica que presenta **CR** junto con **IP** con poblaciones de Europa más que con poblaciones de África tomadas como referencia para la comparación. Hay que tomar en cuenta que el análisis genético muestra linajes femeninos por lo que la información que ofrece es únicamente sobre la contribución femenina a estas poblaciones. Así pues, la influencia a nivel masculino en otras situaciones, por ejemplo de conquista o bélicas, no tiene porqué ver su reflejo en este estudio.

Los resultados del análisis de afinidades genéticas entre las series antiguas y las poblaciones contemporáneas del Archipiélago Balear, indican que el acervo genético es similar y comparable con el detectado en otras poblaciones europeas (no siendo excluyente, la influencia en mayor o en menor grado de otras poblaciones aledañas del Mediterráneo).

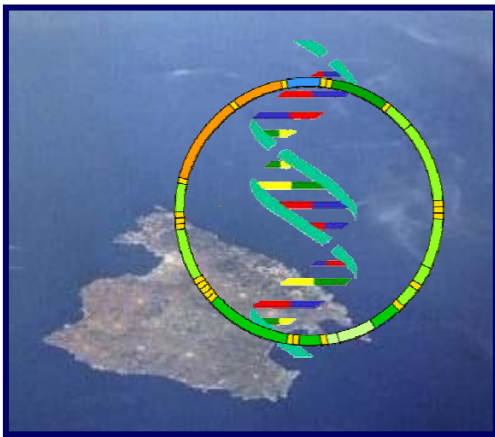
Los linajes de las tres series analizadas que han sido descritos en otras poblaciones, hace deducir que las series antiguas mallorquinas tienen una continuidad por vía materna dentro del contexto de poblaciones europeas y sobre todo con poblaciones del mismo contexto balear. Esta afirmación se hace evidente por medio de los haplotipos SR12K, SR13K y CR30K compartidos por individuos de **SR** y **CR** con al menos un individuo de cada población contemporánea de las Baleares, caso que ocurre de forma similar con los haplotipos caracterizados por la mutación 16270T (SR17U5, SR18U5, SR19U5 y IP46U5).

Por ser Mallorca una isla, pudiera considerarse una población aislada y cerrada. Sin embargo, a través de los análisis a nivel molecular (RFLPs y secuencias de la HVS-I del mtDNA), se puede deducir que las series de **SR**, **IP** y **CR**, presentan una diversidad genética mitocondrial que las lleva a ocupar una posición intermedia respecto a la diversidad que presentan las poblaciones contemporáneas del Archipiélago. Ello no impide que algún haplogrupo, como el subhaplogrupo U5, esté altamente representado hacia el norte de la Isla de Mallorca, abarcando las series de **SR** e **IP** y que su frecuencia sea superior a la que presentan las poblaciones próximas geográficamente; ni es conducente a plantear un caso de endogamia como podría ser el que presenta la serie Neolítica de Mas d'en Boixos, que exhibe una presencia exclusiva del haplogrupo H (García, 2002) (tabla X, de resultados).

Pero además, esta afinidad desde el punto de vista del DNA mitocondrial, entre las series antiguas y contemporáneas del Archipiélago Balear y específicamente con Mallorca (Picornell *et al.*, 2005) puede verse a través de los haplotipos SR03H y IP45U5 por una parte y con Ibiza a través del haplotipo CR35U5a1a, lo que pone en evidencia que parte de estos linajes mitocondriales aproximan filogenéticamente a estas poblaciones y suponen que proceden de un acervo genético común (Massanet *et al.*, 1997; Picornell *et al.*, 2005).

No obstante, aunque sería interesante verificar si esta continuidad genética sucede con los linajes paternos, trabajos como el de Tomàs y colaboradores (2006), sugieren que existe una marcada diferencia entre los marcadores genéticos del mtDNA y del cromosoma Y, sobre todo entre Ibiza y las islas de Mallorca y Menorca.

Finalmente, las pequeñas diferencias observadas en la serie IP, bien podrían deberse al uso particular de la necrópolis, por ejemplo, si fue dedicado a una élite de la población, representando un subconjunto muy particular de la variabilidad poblacional de Mallorca durante la etapa talayótica. También la serie de **SR** muestra cierta singularidad frente a las poblaciones mediterráneas. Así pues, ambas series son únicas en su contexto. Si bien la población del resto de la isla inhumaba en grupos más reducidos en pequeñas cuevas, las dos necrópolis del centro de la bahía de Alcúdia, **SR** y **IP**, son completamente distintas tanto a nivel constructivo, como grupal. A la vez, estas dos necrópolis, cuyo uso se solapa en el tiempo, muestran también diferencias. No es extraño pues que las diferencias culturales entre la población que genera **SR** y **IP** y las otras del entorno puedan reflejarse en su composición genética y contribuir a la diferenciación entre ellas.



6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES .

6.1 CON RESPETO A LA METODOLOGÍA.

- Se ha optimizado el protocolo de extracción con la incorporación de diversos pasos en el proceso de preparación y obtención de la muestra. Concretamente la aplicación de la técnica de apiceptomía en dientes antiguos ha resultado útil no sólo para la obtención de muestra de polvo dentinario para la extracción de DNA en dientes que presentan un alto grado de desmineralización, sino que además permite la conservación del espécimen, dada la relevancia antropológica de este tipo de muestras.
- La adición al protocolo experimental de un proceso de purificación de los extractos con columnas de sílice, ha permitido disminuir los inhibidores de PCR, aumentando con ello, la eficiencia de amplificación. Además la puesta en marcha de un protocolo de reacción de secuenciación en nuestro laboratorio ha favorecido una mayor efectividad en cuanto al porcentaje de secuencias de la región HVS-I obtenidas. Todo ello ha permitido recuperar un número importante de secuencias de 156pb de la región HVS-I a pesar del estado de preservación y de la degradación del material genético.
- La aplicación de los criterios de autenticación permitió detectar un set de extracción contaminado (blancos de extracción), evitar la mayor parte de fuentes de contaminación reciente (espacios y materiales esterilizados, laboratorio con presión positiva, comparación con el DNA de los investigadores), y confirmar la autenticidad del origen de la muestra a través de la reproducibilidad de resultados, la diversidad de haplotipos, el cruzamiento de datos de marcadores distintos (consistencia de RFLPs, concordancia RFLPs/HVI) y sentido filogenético.

- La selección de la muestra según las condiciones de preservación (existencia de piezas dentales en condiciones favorables) y la eficiencia en la recuperación y amplificación del DNA redujeron el tamaño potencial de la muestra.

6.2 CON RESPECTO A LOS ANÁLISIS POBLACIONALES Y FILOGENÉTICOS.

- Se obtuvo un número representativo de extractos positivos (N=96) de las tres poblaciones (37 de SR, 31 de IP y 28 de CR) para realizar análisis estadísticos.
- La distribución y frecuencia de los haplogrupos en las series antiguas analizadas, como la presencia de al menos 7 haplogrupos europeos y la frecuencia elevada de H, U y U5, confirman el sustrato genético europeo de la población mallorquina antigua.
- Se han definido 13 haplotipos únicos distintos: 5 de Son Real, 6 de S'Illot des Porros y 2 de Can Reiners que no se han encontrado entre las poblaciones de referencia, lo que permite hipotetizar que se trata de linajes antiguos que han desaparecido y cuya presencia en **SR** e **IP** sería el reflejo de las características distintivas de cada grupo; teniendo en cuenta que ambas necrópolis comparten una misma cultura, un espacio geográfico muy próximo y dataciones que se solapan, los haplotipos únicos avalarían la hipótesis antropológica de una élite en IP en cuanto que mostraría rasgos genéticos propios del grupo y diferentes de los de **SR**, sin descartar la posibilidad de que el tamaño muestral y el número de poblaciones no hayan sido suficientes y que al aumentar dichos parámetros, estos linajes propios puedan dejar de serlo.
- Los análisis estadísticos (árbol de *Neighbor-Joining*, componentes principales, escalamiento multidimensional) muestran que **IP** y **SR** están

más separados que **IP** y **CR** o **SR** y **CR**. Así pues las series de Son Real y S'Illot des Porros presentan diferencias significativas en los linajes del mtDNA, debido a frecuencias distintas en haplogrupos, concretamente la mayor presencia de haplogrupos orientales en Son Real (haplogrupo W) y la presencia de linajes únicos, pudiendo ser consecuencia de la diferencia entre los segmentos de población, tal y como se ha expresado en la conclusión anterior, que usaron una y otra necrópolis, incluso en la época en la que simultanearon ambos cementerios.

- Dentro del contexto europeo, la serie de Can Reiners muestra pocas diferencias tanto a nivel de haplogrupos como de haplotipos con las dos series talayóticas, lo que indica la continuidad de un importante número de linajes mitocondriales en el seno de la población mallorquina. Así pues, los eventos poblacionales que cambiaron la faz de la isla con el paso de las culturas prehistóricas al mundo clásico y tardoromano, no tuvieron una influencia decisiva en cuanto a la estructura genética de la población en base al mtDNA. Ello significa una continuidad importante de linajes femeninos por lo que los pueblos que conquistaron, ocuparon o se relacionaron con la isla durante este período no realizaron una aportación significativa de población femenina, situación que debería contrastarse mediante el análisis de linajes masculinos (cromosoma Y).
- La presencia de al menos una de las variantes mitocondriales africanas (haplogrupo L3) en la muestra de Can Reiners analizada, es indicativo de los contactos con pueblos africanos, ya sea directamente como lo indican algunos análisis morfológicos, ya sea través de civilizaciones más cosmopolitas, como la romana que en su asentamiento pudieran aportar un pool genético muy diverso entre los familiares de sus huéspedes o esclavos.
- A partir del análisis molecular (RFLPs y las secuencias), se puede deducir que estas series antiguas poseían una diversidad genética mitocondrial

que les sitúa en una posición intermedia respecto a la diversidad de otras series antiguas y modernas. Asimismo puede que se trata de poblaciones poco endógamas, con una importante apertura a otros grupos, al menos parecida a la que presentan pueblos actuales. Teniendo en cuenta el tamaño inicial de las series (unos 250 enterramientos a lo largo de diversos siglos) y el tamaño final de las series (entre 37 y 28 Individuos caracterizados), la diversidad obtenida adquiere una dimensión notable.

- Los diversos análisis comparativos con series antiguas y poblaciones contemporáneas sitúan de forma coherente las series de **SR**, **IP** y **CR** en el contexto del Mediterráneo evidenciando el mantenimiento de un claro sustrato europeo parecido a las poblaciones más próximas de la vertiente mediterránea de la Península Ibérica. Estos datos están apoyados por análisis de antropología ósea y dental.
- Se observa una relación filogeográfica con poblaciones del Este Mediterráneo, en especial de la serie de Son Real – necrópolis que posee las dataciones más antiguas - a través de haplotipos singulares como 16223T-16292T. Ello permite hipotetizar la influencia de pueblos originarios del levante mediterráneo y la existencia de relaciones matrilineales en el origen de esta población prehistórica.
- Por lo antes expuesto se puede afirmar que la Bahía de Alcudia fue y es un crisol genético del Mediterráneo.



7.- BIBLIOGRAFIA.

7. - BIBLIOGRAFIA.

- ♦ Achilli A, Rengo C, Battaglia V, Pala M, Olivieri A, Fornarino S, Magri C, Scozzari R, Babudri N, Santachiara-Benerecetti AS, Bandelt HJ, Semino O, Torroni A. 2005. Saami and Berbers—an unexpected mitochondrial DNA link. *Am J Hum Genet.* 76(5):883-6.
- ♦ Achilli A, Rengo C, Magri C, Battaglia V, Olivieri A, Scozzari R, Cruciani F, Zeviani M, Briem E, Carelli V, Moral P, Dugoujon JM, Roostalu U, Loogvali EL, Kivisild T, Bandelt HJ, Richards M, Villems R, Santachiara-Benerecetti AS, Semino O, Torroni A. 2004. The molecular dissection of mtDNA haplogroup H confirms that the Franco-Cantabrian glacial refuge was a major source for the European gene pool. *Am J Hum Genet.* 75(5):910-8.
- ♦ Alesán A. (1990) Estudi d'una població subadulta de l'edat del ferro: demografia, antropometria i creixement. Memoria del Master de Especialización Profesional en Biología Humana de la Universidad Autónoma de Barcelona.
- ♦ Alesán A; Malgosa A.1996. Las series subadultas de las necrópolis de Son Real y S'illot des Porros (período talayótico, Mallorca). Nuevos datos. *Revista Española de Antropología Biológica* 17: 37-47.
- ♦ Alesán A; Malgosa A, Simó C. 1999. Looking into the demography of an Iron Age population in the Western Mediterranean. I. Mortality. *American Journal of Physical Anthropology.* 110 (3):pp. 285-301
- ♦ Alvarez L. 2006. Zona de contacto Ibérico-Magrebí: análisis de la variabilidad genética del Cromosoma Y. Treball de recerca. UAB
- ♦ Alzualde A; Izagirre N; Alonso S; Albarrán C; Azkarate A; de La Rúa C. 2006. Insight into the "Isolation" of the Basques: mtDNA lineages from the historical site of Aldaieta (6th-7th century AD).
- ♦ Al-Zahery,N.; O. Semino,a G. Benuzzi,a C. Magri,a G. Passarino,C. 2003. Y-chromosome and mtDNA polymorphisms in Iraq, a crossroad of the early human dispersal and of post-Neolithic migrations. *Molecular Phylogenetics and Evolution* (2003)
- ♦ Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature.* 290(5806):457-65.
- ♦ Andreu A., Gonzalo-Sanz R. 2004. Las enfermedades mitocondriales: una clasificación para el siglo XXI. *Neurología.* 19(1)15-22.

- ♦ Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. 1999. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet.* 23(2):147.
- ♦ Arnett T. Estructura y remodelado del hueso. En: *Manual práctico de Osteoporosis y enfermedades del metabolismo mineral.* Capítulo 1. 2003.
- ♦ Andreansen FM; Thomsen B., Andreansen p. 1987. Occurrence of Pulpa canal obliteration after luxation injuries in the permanent dentition. *Endod Dent Traumatol.* Vol 3: p.p 103-15.
- ♦ Ascunce M, Kitchen A, Schmidt P, Miyamoto M, Mulligan C. 2007. An unusual pattern of ancient mitochondrial DNA haplogroups in Northern African Cattle. *Zoological Studies* 46(1):123-125.
- ♦ Austin J., Smith A., Thomas R. 1997. Paleontology in a molecular world: the search for authentic ancient DNA. *Tree.* 12(8)303-306.
- ♦ Bada J., Wang X., Hamilton H. 1999. Preservation of key in the fossil record: current knowledge and future challenger. *Proceeding of the royal of London Biological Sciences.* 354:77-87.
- ♦ Bhaskar S. 1986. "Histología y embriología Bucal de Orban". Buenos Aires, Ed. El Ateneo, 9º ed. pp 49-115
- ♦ Baker L.; Mc Cormick W.; Matteson K. 2001. A silica-based mitochondrial DNA extraction method applied to forensic hair shafts and teeth. *Journal of Forensic Sciences,* 46, 126-130.
- ♦ Bandelt H. 2005. Mosaics of ancient mitochondrial DNA: positive indicators of nonauthenticity. *Eur J Hum Genet.* 13(10):1106-12.
- ♦ Bandelt HJ, Forster P, Röhl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol.* 16(1):37-48.
- ♦ Bandelt HJ, Forster P, Sykes B, Richards M. 1995. Mitochondrial portraits of human using median networks. *Genetics Society of America.*
- ♦ Bär W, Kratzer A, Mächler M, Schmid W. 1988. "Post-mortem stability of DNA". *Forensic Sci. Int.* 39 : 59-70.
- ♦ Battersby B., Loredó-Osti J., Shoubridge E. 2003. Nucleae genetic control of mitochondrial DNA segregation. *Nature Genetic.* Vol. 33:183-186.
- ♦ Béraud-Colomb E., Roubin R., Martin J., 1995. human β -globin gene polymorphisms characterized in DNA extracted from ancient bones 12000 years old. *Am J Hum Gen,* 57:1267-1274.

- ♦ Bosch E; Calafell F; Gonzalez A; Flaiz C; mateu E; Schmidt H; Comas D; 2006. Paternal and maternal lineages in the Balkans show a homogeneous landscape over linguistic barriers, except for the isolate Aromuns. *Ann of Hum Genet.* 70:459-87.
- ♦ Bosch E; Calafell F; Plaza S; Pérez-Lezaun A; Comas D; Bertranpetit J. 2003. *Genética e Historia de las poblaciones del Norte de África y la Península ibérica.* Investigación y Ciencia.
- ♦ Boskey A. 2007. Mineralization of bone and teeth. *Mineralogical Society of America.* Vol. 3(6) ;pp.385-391.
- ♦ Bouwman A., Chilvers E., Brown K., Brown T. 2006. Brief communication: Identification of the authentic ancient DNA sequence in a human bone contaminated with modern DNA. *Am J Phys Anthropol.* 131:428-431.
- ♦ Brakez Z; Bosch E; Izaabel H; Comas D; Bertranpetit J; Calafell F. 2001. Human mitochondrial DNA sequence variation in the Moroccan population of the Souss area. *Annal of Human Boilogy.* 28 (3): 295-307.
- ♦ Bromhamn L., Eyre-Walker aA., Smith N., Smith J. 2003 Mitochondrial Steve: paternal inheritance of mitochondrial in human. *Trends Ecol Evol.* 18(1):2-4.
- ♦ Brown MD, Hosseini SH, Torroni A, Bandelt HJ, Allen JC, Schurr TG, Scozzari R, Cruciani F, Wallace DC. 1998. mtDNA haplogroup X: An ancient link between Europe/Western Asia and North America? *Am J Hum Genet.* 63(6):1852-61.
- ♦ Calvo L, Keyser C, Grimoud A, Ludes B, Pajot B, Lodter J. 2002. Schèmas d'incision et de fracture des différents morphotypes de dents adaptés au recueil de pulpes dentaires et à l'analysis d'ADN. *Bull. Et Mém. De la Société d'Anthropologie de Paris.* 13, 121-128.
- ♦ Cann RL, Stoneking M, Wilson AC. 1987. Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature.* 325(6099):31-6
- ♦ Cano RJ, Poinar HN, Pieniazek NJ, Acra A, Poinar GO Jr. 1993. Amplification and sequencing of DNA from a 120-135-million-year-old weevil. *Nature.* 363(6429):536-8.
- ♦ Caramelli D.; Vernesi C.; Sanna S; Sampietro L.; Lari M.; Castri L.; Vona G.; Floris R.; Francalacci P.; Tykot R.; Casoli A.; Bertranpetit J.; Lalueza-Fox C.; Bertorelle G.; Barbujani G. 2007 . Genetic variation in prehistoric Sardinia. *Hum Genet* (2007) 122:327–336.
- ♦ Carlyle SW, Parr RL, Hayes MG, O'Rourke DH. 2000. Context of maternal lineages in the Greater Southwest. *Am J Phys Anthropol.* 113(1):85-101.
- ♦ Caramelli D.; Lalueza-Fox C.; Vernesi C; Lari M; Casoli A; Mallegni F; Chiarelli B; Dupanloup I; Bertranpetit J; Barbujani G. 2003. Evidence for a genetic

discontinuity between neandertals and 24.000-year-old anatomically modern Europeans. PNAS. Vol 100 (11); 6593-6597

- ♦ Carrasco T y Malgosa A. 1990. Paleopatología oral y dieta. Interpretación de la patología dental de 112 individuos procedentes de una necrópolis talayótica mallorquina (siglo VI al II a.C). *dynamis* 10:17-37. Granada.
- ♦ Casas MJ. 2005 El estudio de ADN humano de época almohade y actual revela la influencia migratoria norteafricana en priego de Córdoba. *Antiquitas* Nº 17 (pp. 139-141).
- ♦ Castellana C., Malgosa A., Campillo D. 1992. Un caso de piezas supernumerarias ectópicas en un individuo de la Edad de Hierro. *Munibe, Supl.* 8: 245-248
- ♦ Castellana C., Carrasco T., Súbira ME, Malgosa A. 1989. Estudio de la Necrópolis de S'Illot des Porros. *Archivo Español de Arqueología*. Vol. 62, Nº 159-160, pags. 193-198.
- ♦ Castellana C., Malgosa A., Súbira ME, Carrasco T. 1988. Estudio osteométrico de los astrágalos de "S'Illot des Porros", Mallorca, VI-III a.C. *Boletín de la Sociedad de Antropología Biológica*. Vol 9: 43-53.
- ♦ Cau MA y Chávez ME. 2003. El fenómeno urbano en Mallorca en época romana: los ejemplos de Pollentia y Palma. *Mayurqa*. 29: 27-49.
- ♦ Cavalli-Sforza, L.L.1998. The DNA revolution in population genetics. *Trends in Genetics*.14(2):60-65
- ♦ Cavalli-Sforza, L. L., Minch, E., 1997, Paleolithic and Neolithic lineages in the European mitochondrial gene pool, *Am. J. Hum. Genet*, 61, 247-251.
- ♦ Cavalli-Sforza, L.; Menozzi P; Piazza A. The history and geography of human genes. Princeton. Princenton University Press. 1994.
- ♦ Chen, Y.; Torroni, A.; Excoffier, L. et al. 1995. Analysis of mtDNA variation in African population reveals the most ancient of all human continent-specific haplogroups. *Am. J. Hum. Genet*. 57: 133-149.
- ♦ Cipollaro M, Galderisi U, Di Bernardo G. 2005. Ancient DNA as a multidisciplinary experience. *J Cell Physiol*. 202(2):315-22. Review.
- ♦ Cobb J.C. 2002 Ancient DNA Recovered by a Non-destructive Method. *Ancient Biomolecules*, Volume 4, Number 4, 1 pp. 169-172(4).
- ♦ Cohen S., Burns R. The pathways of the pulp. /ma ed. Missouri. Editorial Mosby, 1998: 386-424.

- ♦ Comas D; Calafell F; Bendukidze N; fananas L; Bertranpetit J. 2000. Georgian and Kurd sequence analysis shows a lack of correlation between languages and femake genetic lineages. *Am. J. Phys Anthropol* 112: 5-16.

- ♦ Comas D, Calafell F, Mateu E, Pérez-Lezaun A, Bosch E, Martíñez-Arias R, Clarimon J, Facchini F, Fiori G, Luiselli D, Pettener D, Bertranpetit J. 1998 Trading Genes along the Silk Road: mtDNA Sequences and the Origin of Central Asian Populations. *Am. J. Hum. Genet.* 65: 1824-1838.

- ♦ Cooper A, Poinar HN. 2000. Ancient DNA: do it right or not at all. *Science.* 289(5482):1139.

- ♦ Cooper A., Mourer-Chauviré C., Chambers G., Von Haeseler A., Wilsonm A Pääbo S. 1992. Independent origins of New Zelanda moas and kiwis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89:8741-8744.

- ♦ Cordaux R; Saha N; Bentley G; Aunger S Sirajuddin S; Stoneking M . 2003. Mitochondrial DNA analysis reveals diverse histories of tribal ppopulations from India. *Eur J. Human Genet.* 11: 253-264

- ♦ Côte-Real HB, Macaulay VA, Richards MB, Hariti G, Issad MS, Cambon-Thomsen A, Papiha S, Bertranpetit J, y Sykes BC. (1996):"Genetic diversity in the Iberian Peninsula determined from mitochondrial sequence analysis". *Ann Hum Genet* 60:331–350.

- ♦ Dayton L. 2003. Tracing the road down under. *Science.* Vol. 302 n°5645, p 555.

- ♦ Di Benedetto G, Nasidze IS, Stenico M, Nigro L, Krings M, Lanziger M, Vigilant L, Stoneking M, Pääbo S, Barbujani G. 2000. Mitochondrial DNA sequences in prehistoric human remains from the Alps. *Eur J Hum Genet* 8:669-77

- ♦ DeGusta D, Cook CH, Sensabaugh G. 1994. Dentin as a source of ancient DNA. *Ancient DNA newsletter.* 2(1):13.

- ♦ Dennis H; O'Rourke, M. Geoffrey Hayes, Shawn W. Carlyle. 2000 Ancient DNA Studies in Physical Anthropology. *Annual Review of Anthropology*, Vol. 29: pp 217-242

- ♦ Díaz, N. 2004. Caracterización genética de la serie talayótica de S'illot des porros-Son real, Mallorca. *Treball de recerca.* UAB. (inédito)

- ♦ Díaz N, Solórzano E, Montiel R, García C, Yañez C, Malgosa A. 2004. Determinación génétique de l'individu Néolithique de Segudet (Ordino), les restes humans les plus anciens d'Andorre. *Antropo.* 7:39-44. Disponible en: www.didac.ehu.es/antropo

- ♦ Díaz N.; Montiel, R.; García, C.; Malgosa, A. 2002. Mitochondrial DNA Variability in Talayotic Population (Iron Age) From Majorca, Spain. *Abstracts.* 13 th Congress of the European Anthropological Association. Zagreb-Croatia

- ♦ Di Rienzo and Wilson AC. 1991. Branching pattern in the evolutionary tree for the human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88(5): 1597-601.
- ♦ Drancourt M, Aboudharam G, Signoli M, Dutour O, Raoult D. 1998. Detection of 400-year-old *Yersinia pestis* DNA in human dental pulp: an approach to the diagnosis of ancient septicemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95(21):12637-40.
- ♦ Dissing J; Kristinsdottir M; Friis C. 2007. On The elimination of extraneous DNA in fossil human teeth with hypochlorite. *Journal of Archaeological Science*. Vol 35 Issue 6, pp. 1445-1452.
- ♦ Dubut V., Chollet L., Murail P., Cartault F., Beraud-Colomb E., Serre M., Mogentale-Profizi N. 2004. mtDNA polymorphisms in five French groups: importance of regional sampling. *European Journal of Human genetic*. 12, 293-300.
- ♦ Dupanloup I., Bertorelle G., Chikhi L., Barbujani G. 2004. Estimating the Impact of Prehistoric Admixture on the Genome of Europeans. *Molecular Biology and Evolution* Vol 21(7):1361-1372
- ♦ Durán L, N. Izagirre, De la Rúa C. 1998. Genética y Arqueología: análisis molecular de ADN procedente de restos esqueléticos. *Antropología y arqueología*, ISSN 1132-2217, Nº 50, pags. 3-14.
- ♦ Durso G., Abal A. Variabilidad de la morfología de los prismas del esmalte dental humano. 2008. *Acta Microscópica*. Vol. 17 Nº 1: pp1-8.
- ♦ Elson, J.; Andrews, R.; Chinnery, P.; Lightowers, R.; Turnbull, D y Howell, N. 2001. Analysis of European mtDNAs for Recombination. *Am. J. Hum. Genet.* 68: 145-153.
- ♦ Escaráte J., Gagliaedi A., Mejía J., Cortes C., More J., Carmona A., Pousa S., Guevara I., Salas V. 2008. Determinación de la concentración de PO₄, proteínas totales y estudio de los patrones electroforéticos de proteínas salivales en pacientes infantiles venezolanos con y sin caries. *Memorias del Instituto de Biología Experimental*. Vol 5:17-20.
- ♦ Excoffier L, Yang Z. 1999. Substitution rate variation among sites in mitochondrial hypervariable region I of humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol*. 16(10):1357-68.
- ♦ Fadhlaoui-Zid K, Plaza S, Calafell F, Ben Amor M, Comas D y Bennamar El gaaied A. (2004): "Mitochondrial DNA heterogeneity in Tunisian Berbers". *Ann Hum Genet* 68:222–233.
- ♦ Felsenstein J. 1995. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) ver 3.57c. Department of Genetics. University of Washington, Seattle.

- ♦ Fernández Dominguez Eva. 2005 Polimorfismos de DNA mitocondrial en poblaciones antiguas de la cuenca del Mediterráneo. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona.
- ♦ Fernández E; Arroyo-Pardo E; Turbón D. 2005. Aplicacions de l'ADN antic en arqueologia: la nova "arqueologia molecular" Cota zero, ISSN 0213-4640, N° 20, pags. 123-128.
- ♦ Fernández E; García J., Arenal A., Pérez-Pérez A., Valdéz L., Turbón D. 2000. Hacia el origen de los Vascos. Secuencias de ADN mitocondrial antiguo del País Vasco. *Complutum* 11:101-111.
- ♦ Fernández Rosas Elisabet. 2005 Valle de Los Pedroches: Determinación de la gherencia genética a través de los haplogrupos del mtDNA. Treball de recerca. UAB.
- ♦ Finnilä, S.; Lehtonen, M. y Majamaa, K. 2001. Phylogenetic network for European mtDNA. *Am. J. Hum. Genet.* 68: 1475-1484.
- ♦ Finnilä, S.; Hassinen IE, Kokko A, Majamaa, K. 2000. Phylogenetic network on the mtDNA haplogroups U in norther finland based on sequence analysis of the complete coding region by conformation-sensitive gel electrophoresis . *Am. J. Hum. Genet.* 66: 1017-1026.
- ♦ Font A. 1974. Estudio de los restos humanos procedentes de la necrópolis de Son Real. Alcudia. Mallorca. Tesis Doctoral. Barcelona.
- ♦ Francalacci P; Morelli L.; Underhill L; Lillie A.; Passarino G, Useli A; Madeddu R; Paoli G; Tofanelli, Calò C; Ghiani M; Varesi L; Memmi M; Vona G; Oefner P; Shen P; Cavalli-Sforza L. (2003) The peopling of three Mediterranean islands (Corsica, Sardinia and Sicily) inferred by Y-chromosome biallelic variability. *American Journal of Physical*
- ♦ Francalacci P. 1995. DNA recovery from ancient tissue: problems and perspectives. *Human Evol.* 10(1):81-91.
- ♦ Felsenstein J. 1995. *PHYLIP (Phylogeny Inference Package) ver 3.57c*. Department of Genetics. University of Washington, Seattle.
- ♦ Freifelder D. 1982. Apllications to biochemistry and Molecular Biology. *Physical Biochemistry*.
- ♦ Gao S, Yang Y, Xu Y, Zhang Q, Zhu H, Zhou H. 2007. Tracing the genetic history of the chinese people: Mitochondrial DNA analysis of aneolithic population from the Lajia site. *Am. J. of Phys. Anthrop* 133(49):1128-1136
- ♦ García, C. 2002. Análisis de los haplogrupos del DNAm^t en restos dentales del Neolítico y Bronce Catalán. Memoria del trabajo de investigación. Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, (Inédito).

- ♦ García, C; Montiel R; Malgosa A. 2005. Análisis de los haplogrupos del DNAMt en restos dentales del Neolítico y Bronce Catalán. *Revista de la Sociedad de Antropología Física. España.*
- ♦ García E y Súbira ME. 2001. Dieta y sociedad en Can Reiners (análisis de elementos traza en una necrópolis del 600 d.C). *Rev Esp. Antrop Biol.* 22: 107-114.
- ♦ Gil I; García R; Reyes J. 2008. Comportamiento estructural de la unión esmalte-dentina em dientes humanos: um modelo mecânico-funcional. *Acta Microscópica.* 17(1),p.p 34-37.
- ♦ Giles R., Blanc H., Cann H., Wallace D. 1980 Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 77:6715-9
- ♦ Gill P, Ivanov PL, Kimpton C, Piercy R, Benson N, Tully G, Evett I, Hagelberg E, Sullivan K. 1994. Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. *Nat Genet.* 6(2):130-5.
- ♦ Gilbert MT, Bandelt H; Hofreiter M; Barnes I. 2005. Assessing ancient DNA studies. *Trends in ecology and Evolution.* Vol 20(19)541-544.
- ♦ Gilbert MT, Willerslev E, Hansen AJ, Barnes I, Rudbeck L, Lynnerup N, Cooper A. 2003. Distribution patterns of postmortem damage in human mitochondrial DNA. *Am J Hum Genet.* 72(1):32-47.
- ♦ Gomez de Ferraris M., Campos A. 2002. *Histología y Embriología Bucodental.* Madrid. Ed. Médica panamericana, 2º ed. Pp 271-315.
- ♦ González, A.; Brehm, A., Perez, J.; Maca-Meyer, N.; Flores, C.; Cabrera, V. 2003. Mitochondrial DNA affinities at the Atlantic Fringe of Europa. *Am J of Physical Anthropology.* p. 391-404.
- ♦ González M., Hernández A., Sanchez J., Rodriguez C., Cuellas J. 2002. Resultados preliminares análisis AND mitocondrial a partir de restos humanos del siglo XVII Convento de San Sebastián (Los Silos)Eres. *Arqueología/Biantropología* N° 10: 136-149.
- ♦ González, H. 2009. La antropología molecular en la secuenciación del genoma del Neandertal. *Revista de Investigación Médica Sur, México.* Vol 16(1) 35-38.
- ♦ González M. Atlas de Histología. Trabajo de Investigación como Credencial de Mérito para optar a la categoría de profesor titular. 1997. Facultad de Odontología. Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela.

- ♦ Golenberg EM, Giannasi DE, Clegg MT, Smiley CJ, Durbin M, Henderson D, Zurawski G. 1990. Chloroplast DNA sequence from a miocene Magnolia species. *Nature*. 344(6267):656-8.
- ♦ Goodwin, W; Ovchinnikov, I.V.; Götherström, A.; Romanova, G.P.; Kharttonov, V.M. and Lidén, K. (2000): "Molecular analysis of DNA. *Nature* 444, 330-336.
- ♦ Graven, L., Passarino, G., Semino, O., Boursif, P., Santachiara-Benerecetti, A.S., Langaney, A., Excoffier, L. (1995). Evolutionary correlation between control region sequence and restriction polymorphisms in the mitochondrial genome of a large Senegalese Mandenka sample. *Mol. Biol. Evol.* 12: 334-345.
- ♦ Green R; Malaspinas A., Krause J; Briggs A., Jhonson P., Uhler C., Meyer m., Good J., Maricic T., Stenzel U., Prüfer K Siebauer M., Burbano H., Ronan M., Rothberg J., Egholm M., Rudan P., Brajković D., Kucan Z., Gusic I., Wikström M., Laakkonen L., Kelso J., Slatkin M., Paabo S. 2009 A complete Neandental mitochondrial genome sequence determined by higt-throughput sequencing." *Cell*. Aug 8; 134(3):416-26.
- ♦ Green R; Krause J; Ptak S, Briggs A; Ronan M; Simons J; Du L; Egholm M; Rothberg J Paunovic M; Paabo S. 2006 Analysis of one million base pairs of Neandental DNA. *Nature* 444, 330-336.
- ♦ Grimoud A, Boulbet M, Lodter J. 2004. Critères de sélection d'échantillons dentaires pour l'étude de l'ADN ancien. *Antropo* 6, 43-51. En www.didac.ehu.es/antropo.
- ♦ Guerrero V; Calvo M; Gornés S. Mallorca y Menorca en la Edad del Hierro. La cultura Talayótica y Postalayótica. 2006. Ediciones de Turisme Cultural. ILLES Balears.
- ♦ Guevara E. Tejidos dentarios y sistemas adhesivos amelo-dentinarios actuales. En: www.serbi.ula.ve/serbiula/articulos/art2/tejidos_dentarios.pdf
- ♦ Guhl F. 2005. ADN fosil: Arqueoparasitología en América. *Rev. Acad. Coloma. Cienc.* Vol. XXIX, N° 111. pp: 229-238.
- ♦ Haak W; Forster P., Bramanti B., Matsumura S., Brandt G., Tañzer M., Villems R., Renfrew C., Gronenborn D., Werner Alt K., Burger J. Ancient DNA from First European Farmers in 7500-Year-Old Neolithic Sites. *Science*. 11 November 2005 Vol 310: pp 1016-1018. www.sciencemag.org
- ♦ Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- ♦ Hagelberg E. Recombination or mutation rate heterogeneity? Implication for Mitochondrial Eve. 2003. *Trends in genetics* 19(2):84-90

- ♦ Hagelberg E, Thomas MG, Cook CE, Sher AV, Baryshnikov GF, Lister AM. 1994a. DNA from ancient Mammoth bones. *Nature*. 370(6488): 333-4.
- ♦ Hagelberg E, Quevedo S, Turbón D, Clegg JB. 1994b. DNA from ancient Easter Islanders. *Nature*. 369(6475):25-6
- ♦ Hagelberg E. and Clegg J. 1993. Genetic polymorphisms in prehistoric Pacific islanders determined by analysis of ancient bone DNA. *Proc R. Soc Lond Biol Sci* 252: 163-170
- ♦ Hagelberg E, Bell L; Allen T; Boyde A; Jones S and Clegg J. 1991. Analysis of ancient bone DNA: Techniques and applications. *Phil. Trns. R soc. Lond. B* 333, pp. 399-407.
- ♦ Hagelberg E, Sykes B, Hedges R. 1989. Ancient bone DNA amplified. *Nature*. 342(6249):485.
- ♦ Handt O, Krings M, Ward RH, Pääbo S. 1996. The retrieval of ancient human DNA sequences. *Am J Hum Genet*. 59(2):368-76.
- ♦ Handt, O., M. Höss, M. Krings y S. Pääbo. 1994. Ancient DNA methodological challenges. *Experientia*. 50: 524-529.
- ♦ Hernández J; Sanmartin J; Malgosa M; Alesán A.1998. La Necrópolis talaiotica de S'Illo des Porros. *Pyrenae*,29: 69-95.
- ♦ Higuchi R. 1992. Dr. Russ' problem corner. *Ancient DNA Newsletter*. 1(1):6-8.
- ♦ Higuchi R., Bowman B., Freiburger M., Ryder O., Wilson A. 1984. DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature*. 312(5991):282-4.
- ♦ Hofreiter M, Jaenicke V, Serre D, Haeseler Av A, Pääbo S. 2001a. DNA sequences from multiple amplifications reveal artefacts induced by cytosine deamination in ancient DNA. *Nucleic Acids Res*. 29(23):4793-9.
- ♦ Hofreiter M, Serre D, Poinar HN, Kuch M, Pääbo S. 2001b. Ancient DNA. *Nat Rev Genet*. 2(5):353-9. Review.
- ♦ Horai S, Kondo R, Murayama K, Hayashi S, Koike H, Nakai N. 1991. Phylogenetic affiliation of ancient and contemporary humans inferred from mitochondrial DNA. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 333(1268):409-16; discussion 416-7.
- ♦ Horai S, Hayasaka K, Murayama K, Wate N, Koike H, Nakai N. 1989. DNA amplification from ancient human skeletal remains and their sequence analysis. *Proc Japan Acad*. 65, Ser B. 10:229-33.

- ♦ Hochmeister MN, Budowle B, Borer UV, Eggman U, Comey T, Dirnhofer R. (1991). "Identification of unknown human remains: amplification and typing of DNA extracted from compact bone tissue". *J. Forensic Sci.* 36 : 1649-1661
- ♦ Höss, M. y Pääbo S. 1993 DNA extraction from pleistocene bones by a silica-based purification method. *Nucleic Acids Research* 16: 3913-3914.
- ♦ Höss, M., Jaruga P, Zastawny T, Dizdaroghu M, Pääbo S. 1996. DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. *Nucleic Acids Reserch.* 24(7):1304-1307.
- ♦ Hummel, S. y 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(6813):708-13.
- ♦ Ingman M, Gyllensten U. 2001. Analysis of the complete human mtDNA genome: Methodology and inferences for human evolution. *J Hered.* 92: 454-61.
- ♦ Ivanova R, Astridinis A, Djoulah S, Lepage V, Wijneb E, Hors J, Charron D. 1999. Mitochondrial DNA polymorphisms of a west Algerian population (Oran region). *Biomedecine&Pharmacotherapy.* 53(8):386-392.
- ♦ Ivanova T; Kamenetskaya F; Koltsov A; Ugolkov V. 2001. Cristal structure of calcium-deficient carbonated hydroxyapatite. Thermal descomposition. *Journal of Solid State Chemistry.* 160:pp.340-349.
- ♦ Iwamura E, Soares J, Romero D. 2004. Human identification and analysis of DNA in bones. *Rev. Hosp.. Clin Fac. med. S. Paulo* 59(6):383-388.
- ♦ 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., Santos A., De la Rúa C. 2005. Descifrando los mensajes del pasado: análisis de ADN antiguo. *Munibe (Antropología-Arkeologia* 57:327-335.
- ♦ Izagirre N. & De la Rúa C. 2000. Aplicación de la Biología Molecular en el Estudio Antropológico de las poblaciones del Pasado: Análisis del ADN Mitocondrial *Euskonews & Media* 71.zbk (2000 / 3 / 17-24).
- ♦ Izagirre N, De la Rúa C. 1999. An mtDNA analysis in ancient Basque populations: implications for haplogroup V as a marker for a major paleolithic expansion from southwestern Europe. *Am J Hum Genet.* 65(1):199-207.

- ♦ Jobling MA, Gill P. 2004. Encoded evidence: DNA in forensic analysis. *Nat Rev Genet.* 5(10):739-51.
- ♦ Jobling MA, Pandya A, Tyler-Smith C. 1997. The Y chromosome in forensic analysis and paternity testing. *Int J Legal Med.* 110(3):118-24. Review.
- ♦ Jobling MA, Tyler-Smith C. 1995. Fathers and sons: the Y chromosome and human evolution. *Trends Genet.* 11(11):449-56.
- ♦ Jordana X. 2007. Caracterització i evolució duna comunitat medieval catalana. Estudi bioantropològic de les inhumacions de les esglésies de Sant Pere. Tesis Doctoral-UAB.
- ♦ Kalmár T., Bachrati C., Marcsik A Raskó I. 2000. A simple and efficient method for PCR amplifiable DNA extraction from ancient bone. *Nucleic Acids Res.* 28:e67.
- ♦ Karafet T., Mendez F., Meilerman M., Underhill P., Zegura S., Hammer M. New binary polymorphisms reshape and increase resolution of the human Y chromosomal haplogroup tree. *Genome Res.* published online Apr 2, 2008.
- ♦ Kayser M, Brauer S, Schädlich H, Prinz M, Batzer M, Zimmerman P, Boatín BA, Stoneking M. 2003. Y Chromosome STR haplotypes and the genetic structure of U.S. populations of African, European, and Hispanic ancestry. *Genome Research.* 13:624-34. Disponible en: www.genome.org.
- ♦ Kemp B., Smith D. 2005. Use of bleach to eliminate contaminating DNA from the surface of bone and teeth. *Forensic Science International* 154: 61-63.
- ♦ Keyser-Tracqui C, Crubezy E, Pamzav H; Vargas T Ludes B. 2006. Population original in Mongolia: genetic structure analysis of ancient and modern DNA. *Am J Phys Anthropol.* 131(2):272-81.
- ♦ Keyser-Tracqui C, Crubezy E, Ludes B. 2003. Nuclear and mitochondrial DNA analysis of a 2,000-year-old necropolis in the Egyin Gol Valley of Mongolia. *Am J Hum Genet.* 73(2):247-60.
- ♦ Keyser-Tracqui, C.; Ricaut, F.; Crubézy, E. y Ludes B. 2002. Populations anciennes et ADN ancien : état actuel de la question. *Antropo.2* :1-8.
- ♦ Kim S. Color atlas of microsurgery in endodontics. W.B. Saunders Company. 2001:85.
- ♦ Kivisild T, Shen P, Wall DP, Do B, Sung R, Davis K, Passarino G, Underhill PA, Scharfe C, Torroni A, Scozzari R, Modiano D, Coppa A, de Knijff P, Feldman M, Cavalli-Sforza LL, Oefner PJ. 2006. The role of selection in the evolution of human mitochondrial genomes. *Genetics.* 172(1):373-87.

- ♦ Kivisild T, Reidla M, Metspalu E, Rosa A, Brehm A, Pennarun E, Parik J, Geberhiwo T, Usanga E, Villems R. 2004. Ethiopian mitochondrial DNA heritage: tracking gene flow across and around the gate of tears. *Am J Hum Genet.* 75(5):752-70.
- ♦ Kohn M., Knauer F., Stoffella A., Schröder W., Pääbo S. 1995. Conservation genetics of the European brown bear: study using excremental PCR of nuclear and mitochondrial sequence. *Mol. Ecol.* 4,95-103.
- ♦ Kolman CJ and Tuross. 2000 Ancient DNA analysis of human populations. *American Journal of Physical Anthropology.* 111:5-23
- ♦ Kolman CJ, Centurion-Lara A, Lukehart SA, Owsley DW, Tuross N. 1999. Identification of *Treponema pallidum* subspecies *pallidum* in a 200-year-old skeletal specimen. *J Infect Dis.* 180(6):2060-3.
- ♦ Kurosaki K., Matsushita T., Ueda S., 1993. Individual DNA identification from ancient human remains. *Am J Hum Gen.* 53:638-643.
- ♦ Krings M, Capelli C, Tschentscher F, Geisert H, Meyer S, von Haeseler A, Grossschmidt K, Possnert G, Paunovic M, Pääbo S. 2000. A view of Neandertal genetic diversity. *Nat Genet.* 26(2):144-6.
- ♦ Krings M, Stone A, Schmitz RW, Krainitzki H, Stoneking M, Pääbo S. 1997. Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell.* 90(1):19-30.
- ♦ Lalueza-Fox, C; Condemi S; Bertranpetit J; Caramelli D ; Catalano G ; De la Rasilla M ; Fontea F ; Hofreiter M ; Hughes D ; Longo L ; Pill E ; Rohland N; Rosas A; Römpler H; Schöneberg T; Stoneking M Stäubert C. 2007. A melanocortin 1 receptor allele suggests varying pigmentation among Neanderthals. *Science.* 318 (5855): 1453-1455.
- ♦ Lalueza-Fox, C. *Genes de Neandertal.* Ed. Síntesis, Madrid, 2006, 205 pp
- ♦ Lalueza-Fox C, Sampietro ML, Caramelli D, Puder Y, Lari M, Calafell F, Martínez-Maza C, Bastir M, Fontea J, de la Rasilla M, Bertranpetit J, Rosas A. 2005a. Neandertal evolutionary genetics: mitochondrial DNA data from the Iberian Peninsula. *Mol Biol Evol.* 22(4):1077-81.
- ♦ Lalueza-Fox C, Castresana J, Sampietro L, Marques-Bonet T, Alcover JA, Bertranpetit J. 2005b. Molecular dating of caprines using ancient DNA sequences of *Myotragus balearicus*, an extinct endemic Balearic mammal. *BMC Evol Biol.* 5:70.
- ♦ Lalueza-Fox C. 1997. Ancient DNA studies and new bioethical problems. *Human Evolution.* Vol 12(4):287-290.

- ♦ Lefevre-Witier P. ; Aireche H. ; Benabadji M. ; Darlu P. ; Melvin K. ; Sevin A.; Crawford M. 2006. Genetic structure of Algerian populations. *American journal of Human Biology*. 18: 492-501.
- ♦ Lima, G., Peña J.A., Alfonso M.A., Pontesa M.L., Abrantesa D., Pereira M.J., Fernández I., Castro A., Pinheiro M.F., Martínez de Pancorbo M. 2004. Analysis of the HVI and HVII regions of mitochondrial DNA in 100 individuals from North of Portugal. *International Congress Series 1261 (2004)* 366–368
- ♦ Lindahl T. 1993a. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*. 362(6422):709-15.
- ♦ Lindahl T. 1993b. Recovery of antediluvian DNA. *Nature*. 365(6448):700.
- ♦ Lindahl T., Nyberg B. 1972. Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. *Biochemistry*. 11(19):3610-8.
- ♦ Londoño M; Echevarria A; De la calle F. 2006 Características cristaloquímicas de la hidroxiapatita sintética tratada a diferentes temperaturas. *Revista EIA. Escuela de Ingeniería de Antioquia, Medellín, Colombia* . ISSN 1794-1237. Número 5. pp.109-118.
- ♦ Luque J y Herraéz A. *Texto Ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética. Conceptos, técnicas y aplicaciones en Ciencias de la Salud.* MMI Elsevier España. Reimpresión 2006.
- ♦ Maca-Meyer, N. 2002. Composición genética de poblaciones históricas y prehistóricas humanas de las Islas canarias. Tesis doctoral. Universidad de la Laguna.
- ♦ Maca-Meyer, N; Sánchez P.; Flores C.; Larruga J.; González A.; Oterino A.; Leyva F. 2003. Y Chromosome and Mitochondrial DNA Characterization of Pasiegos, a Human isolate from Cantabria. *Annals of Human Genetic*. 67:329-339.
- ♦ Maca-Meyer, N.; González, A.; Larruga, J.; Flores, C. y 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.; Bonn -Tamir, B.; Sykes, B.; y 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.
- ♦ Macaulay, V. 2000. Haplogroup motifs. Retrieved October 8, 2001 from the World Wide Web:
<http://www.stats.ox.ac.uk/~macaulay/founder2000/motif.html>

- ♦ Malgosa A, Montiel R, Díaz N, Solórzano E, Smerling A, Isidro A, García C, Simón M. 2005. Ancient DNA: A modern look at the infections of the past. Reserch Signopost Eds. Recent Res Devel Microbiology. 9:213-36. Kerala, India.
- ♦ Malgosa, A. 1992. La Població Talaiòtica de Mallorca. Les restes humanes de l'illot des Porros (s VI-II aC.) Institut d'Estudis Catalans. Barcelona. España.
- ♦ Malgosa A y Campillo D. 1991. Visión general de las patologías halladas en los individuos de la necrópolis talayótica de S'illot des Porros (Mallorca). Actas del IX Congreso Nacional de Historia de la Medicina, 1900:1409-1421.
- ♦ Malgosa, A. 1988. Etude des crânes de la nécropole de S'illot des Porros, Majorque. Bulletin et Mémoires de la Société d'Anthropologie de Paris, t.5, seire XIV, 3 :179-198.
- ♦ Malgosa, A. 1985. La Població Talaiòtica de Mallorca. Les restes humanes de l'illot des Porros (s VI-II aC.) Tesis Doctoral. UAB. Barcelona. España.
- ♦ Massanet, M. F.; Castro, J. A.; Picornell, A.; Ramon, M. M., "Study of the populations of the Balearic islands (Spain) using mtDNA RFLPs", "Human Biology", Volum 69, Número 4, Pàg. 483-498. Estats Units d'Amèrica, 1997. Article.
- ♦ Martinez-Arias R., Comas D., Calafell F., Pérez-Lezaun A., Mateu E., Bosch E., Bertranpetit J. 2000. Aproximación a la genesis de las poblaciones europeas a través del estudio del DNA mitochondrial. Tendencias actuales de investigación en la Antropología Física Española, pp:391-396.
- ♦ Mergen H., Öner R. and Öner C. 2004 Mitochondrial DNA sequence variation in the Anatolian Peninsula (Turkey). J. Genet. 83,. 39-47].
- ♦ Merriwether DA, Hodgson JA, Friedlaender FR, Allaby R, Cerchio S, Koki G, Friedlaender JS. 2005. Ancient mitochondrial M haplogroups identified in the Southwest Pacific. Proc Natl Acad Sci U S A. 102(37):13034-9.
- ♦ Meyer E, Wiese M, Bruchhaus H, Claussen M, Klein A. 2000. Extraction and amplification of authentic DNA from ancient human remains. Forensic Sci Int 113:87-90.
- ♦ Meyer S, Weiss G, von Haeseler A. 1999. Pattern of nucleotide substitution and rate heterogeneity in the hypervariable regions I and II of human mtDNA. Genetics. 152:1103-10.
- ♦ Mishmar D. 2003. Natural selection shaped regional mtDNA variation in humans. PNAS 100:171-6.
- ♦ Montiel R. 2001. Estudio diacrónico de la variabilidad del DNA mitocondrial en población Catalana. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona. Disponible en: <http://www.tdcat.cesca.es/TDCat-0726101-095837>

- ♦ Montiel, R., Francalacci P.; Malgosa, A. 2007. Ancient DNA and Biological Anthropology: Believers vs Skeptics. *Recent Advances in molecular biology and evolution* 37.
- ♦ Montiel R, Bettencourt C, Silva C, Santos C, Prata MJ, Lima M. 2005. Analysis of Y-chromosome variability and its comparison with mtDNA variability reveals different demographic histories between islands in the Azores Archipelago (Portugal). *Ann Hum Genet.* 69(Pt 2):135-44.
- ♦ Montiel, R. y Malgosa, A. 2003a. Caracterización de la variabilidad del DNA mitocondrial en poblaciones talayóticas de Mallorca, España. *Actas del XII Congreso de la Sociedad Española de Antropología Biológica.* Ed. Bellaterra. Barcelona.
- ♦ Montiel R, García C, Cañadas MP, Isidro A, Guijo JM, Malgosa A. 2003b. DNA sequences of *Mycobacterium leprae* recovered from ancient bones. *FEMS Microbiol Lett.* 226(2):413-4.
- ♦ Montiel, R.; Díaz N.; Solórzano, E. y Malgosa, A. 2003c. *Manual de Laboratorio de aDNA.* Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona. (Inédito).
- ♦ Montiel R, Malgosa A, Francalacci P. 2001. Authenticating ancient human mitochondrial DNA. *Hum Biol.* 73(5):689-713.
- ♦ Montiel R, Malgosa A, Subirà E. 1997. Overcomming PCR inhibitors in ancient DNA extracts from teeth. *J Ancient Biomol.* 1:221-225.
- ♦ Morelli L, Grosso MG, Vona G, Varesi L, Torroni A, Francalacci P. 200. Frequency distribution of mitochondrial DNA haplogroups in Corsica and Sardinia. *Human Biology,* 72(4):585-95
- ♦ Mullis KB, Faloona FA. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155:335-50.
- ♦ Neckelmann N., Li K., Wade R., Shuster R., Wallace D. 1987. cDNA sequence of a human skeletal muscle ADP/ATP traslocator: lack of a leader peptide divergence from a fibroblast translocator cDNA, and coevolution with mitochondrial DNA genes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 84(21):7580-4.
- ♦ Nei M. 1987. *Molecular evolutionary genetics.* Columbia University Press. New York.
- ♦ Nielsen H, Enberg J, Thuesen I. 1994. DNA from artic human burials. In *Ancient DNA.* Herrmann B, Hummel. Eds. Springer Verlag. pp: 122-40. New York.
- ♦ Olson LE, Hassanin A. 2003. Contamination and chimerism are perpetuating the legend of the snake-eating cow with twisted horns (*Pseudonovibos spiralis*). A case study of the pitfalls of ancient DNA. *Mol Phylogenet Evol.* 27(3):545-8.

- ◆ Oota H, Saitou N, Matsushita T, Ueda S. (1995): "A genetic study of 2,000-year-old human remains from Japan using mitochondrial DNA sequences". *Am J Phys Anthropol* 98: 133-145.
- ◆ Orfila M. (2000) *El Fòrum de Pollentia. Memòria de les campanyes d'excavacions realitzades entre els anys 1996 i 1999*. Ajuntament d'Alcúdia. Alcúdia (Mallorca).
- ◆ Orfila M; Arriba A; Doenges NA. 1999a. El Fòrum de la ciutat romana de *Pollentia*: estat actual de les investigacions. En: *I Jornades d'estudis locals d'Alcúdia*, 85-100. Ajuntament d'Alcúdia. Alcúdia (Mallorca).
- ◆ Orfila M; Arriba A., Cau MA. 1999b. El Foro romano de *Pollentia*. [Archivo Español de Arqueología LXXII](#), CSIC, Madrid, 1999. pp. 99-118.
- ◆ Ortega B. 2005 Evolución de la salud oral en la población de Mallorca, desde la prehistoria al medioevo: Estudio de la Necrópolis de Can Reiners. Tesis Doctoral.
- ◆ O'Rourke DH, Carlyle SW, Parr RL. 1996. Ancient DNA: Methods, progress and perspectives. *Am J Hum Biol.* 8:557-71.
- ◆ Otero Jorge. Geriatria y Gerontología
www.portalmedicos.com/publicaciones/500/3/Envejecimiento-y-cambios-en-los-tejidos-dentarios.
- ◆ Ovchinnikov IV, Gotherstrom A, Romanova GP, Kharitonov VM, Liden K, Goodwin W. 2000. Molecular analysis of Neanderthal DNA from the northern Caucasus. *Nature.* 404(6777):490-3.
- ◆ Ozawa T. (1995). Mechanism of somatic mitochondrial DNA mutations associated with age and diseases. *Biochim Biophys Acta* 1271: 177-189.
- ◆ Pääbo S, Poinar H, Serre D, Jaenicke-Despres V, Hebler J, Rohland N, Kuch M, Krause J, Vigilant L, Hofreiter M. 2004. Genetic analyses from ancient DNA. *Annu Rev Genet.* 38:645-79. Review.
- ◆ Pääbo S, Wilson AC. 1991. Miocene DNA sequences - a dream come true? *Curr Biol.* 1(1):45-6.
- ◆ Pääbo S, Irwin DM, Wilson AC (1990) "DNA damage promotes jumping between templates during enzymatic amplification". *J Biol. Chem.* 265: 4718-4721.
- ◆ Pääbo S. 1989. Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86(6):1939-43.
- ◆ Pääbo S, Wilson AC. 1988. Polymerase chain reaction reveals cloning artefacts. *Nature.* 334(6181):387-8.

- ♦ Pääbo S. 1986. Molecular Genetic Investigations of Ancient Human Remains. In *Molecular Biology of Homo sapiens*. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. 51. pp: 441-6.
- ♦ Pääbo S. 1985a. Preservation of DNA in ancient Egyptian mummies. *J Arch Sci* 12:411-7.
- ♦ Pääbo S. 1985b. Molecular cloning of Ancient Egyptian mummy DNA. *Nature*. 314(6012):644-5.
- ♦ Page RD. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12:357-8.
- ♦ Pakendorf B, Stoneking M. 2005. Mitochondrial DNA and human evolution. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 6:165-83. Review.
- ♦ Passarino G, Semino O, Quintana-Murci L, Excoffier L, Hammer M & Santachiara-Benerecetti AS (1998) Different genetic components in the Ethiopian population, identified by mtDNA and Y-chromosome polymorphisms. *Am J Hum Genet* 62: 420-434.
- ♦ Pardo RA., Castillo S., Vieira A. 2006 Estudio genético de una familia chilena con tres fenotipos dentales diferentes. *Rev. Med. Chile* Vol 134: 1541-1548.
- ♦ Pereira, L.; Prata, M. y Amorim, A. 2000. Diversity of mtDNA lineages in Portugal: not a genetic edge of European variation. *Ann. Hum. Genet*. 64: 491-506.
- ♦ Perfectti F.; Picó F.; Gómez J. 2009 La huella genética de la selección natural. *Ecosistemas* 18(1):10-16.
- ♦ Pericot L. 1975. Las Islas Baleares en tiempos prehistóricos. Destinos. Barcelona
- ♦ Perry W; Bass M; Riggsby W; y Sirotkin K. 1988. "The auto degradation of deoxyribonucleic acids (DNA) in human rib bone and its relationship to the time interval since death". *Journal of Forensic Sciences, JFSCA*, Vol. 33, No. 1, pp.: 144-153.
- ♦ Picornell A; Gomez-Barbeito C; Castro T; Ramon M. 2005. Mitochondrial DNA HVRI variation in Balearic population. *Am. J. of Phys. Anthropol*. 128(1):pp.119-130.
- ♦ Plaza S. 2004. Anàlisi de la diversitat del genoma mitocondrial en poblacions humanes. Memoria del trabajo tesis Doctoral). Universitat Pompeu Frabra, Barcelona (inédito).

- ♦ Plaza S, Calafell F, Helal A, Bouzerna N, Lefranc G, Bertranpetit J y Comas D. (2003): "Joining the pillars of Hercules: mtDNA sequences show multidirectional gene flow in the western Mediterranean". *Ann Hum Genet* 67:312–328.
- ♦ Poinar HN, Hofreiter M, Spaulding WG, Martin PS, Stankiewicz BA, Bland H, Evershed RP, Possnert G, Pääbo S. 1998. Molecular coproscopy: dung and diet of the extinct ground sloth *Nothrotheriops shastensis*. *Science*. 281(5375):319-20.
- ♦ Poinar HN, Kuch M, McDonald G, Martin P, Pääbo S. 2003. Nuclear gene sequences from a late pleistocene sloth coprolite. *Curr Biol*. 13:1150–1152.
- ♦ Pult I; Sajantila A; Simanainen J; Georgiev O; Schaffner W; Pääbo S. 1994. Mitochondrial DNA sequences from Switzerland reveal striking homogeneity of European population. *Biol Chem Hoppe Seyler* 375:837-840.
- ♦ Rafi A, Spigelman M, Stanford J, Lemma E, Donoghue H, Zias J. 1994. Mycobacterium leprae DNA from ancient bone detected by PCR. *Lancet*. 343(8909):1360-1.
- ♦ Rajkumar R, Banerjee J, Gunturi HB, Trivedi R, Kashyap VK. 2004. Phylogeny of the M superhaplogroup inferred from complete mitochondrial genome sequence of Indian specific lineages. *G Biology*. 6:P3. Disponible en: <http://genomebiology.com/2004/6/2/P3>.
- ♦ Rando, J.; Pinto, F.; González, A. et al. 1998. Mitochondrial DNA analysis of Northwest African populations reveals genetic exchanges with European, Near-Eastern, and sub-Saharan populations. *Ann. Hum. Genet*. 62: 531-550.
- ♦ Ranly D., Garcia F. 2000. Current and potencial pulp therapies for primary and young permanent teeth. *J Dent* 28(3)153-61. Review.
- ♦ Raymond M. y Rousset F. 2001. ver 3.3 *GENEPOP population genetics software for exact tests and ecumenicism*. Institut des Sciences de l'Evolution. Université de Montpellier II, France.
- ♦ Reidla M, Kivisild T, Metspalu E, Kaldma K, Tambets K, Tolk HV, Parik J, Loogvali EL, Derenko M, Malyarchuk B, Bermisheva M, Zhadanov S, Pennarun E, Gubina M, Golubenko M, Damba L, Fedorova S, Gusar V, Grechanina E, Mikerezi I, Moisan JP, Chaventre A, Khusnutdinova E, Osipova L, Stepanov V, Voevoda M, Achilli A, Rengo C, Rickards O, De Stefano GF, Papiha S, Beckman L, Janicijevic B, Rudan P, Anagnou N, Michalodimitrakis E, Koziel S, Usanga E, Geberhiwot T, Herrstadt C, Howell N, Torroni A, Villems R. 2003. Origin and diffusion of mtDNA haplogroup X. *Am J Hum Genet*. 73(5):1178-90.
- ♦ Reich D., Price A., Patterson N. 2008. Principal component analysis of genetic data. *Nature Genetic* 40, 491-492.
- ♦ Relethford JH. 2001. Ancient DNA and the origin of modern humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98(2):390-1.

- ♦ Reynolds JB, Weir BS, Cockerham CC. 1983. Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics*. 105:767-79.
- ♦ Riancho J. & Gutierrez G. 2003. Factores reguladores de la reabsorción ósea. *Rev. Metab. Oseo Min.* 1(2):51- 66.
- ♦ Richards M, Macaulay V, Hickey E, Vega E, Sykes B, Guida V, Rengo C, Sellitto D, Cruciani F, Kivisild T, Villems R, Thomas M, Rychkov S, Rychkov O, Rychkov Y, Golge M, Dimitrov D, Hill E, Bradley D, Romano V, Cali F, Vona G, Demaine A, Papiha S, Triantaphyllidis C, Stefanescu G, Hatina J, Belledi M, Di Rienzo A, Novelletto A, Oppenheim A, Norby S, Al-Zaheri N, Santachiara-Benerecetti S, Scozari R, Torroni A, Bandelt HJ. 2000. Tracing European founder lineages in the Near Eastern mtDNA pool. *Am J Hum Genet*. 67(5):1251-76.
- ♦ Richards MB, Macaulay VA, Bandelt HJ, Sykes BC. 1998. Phylogeography of mitochondrial DNA in Western Europe. *Ann Hum Genet*. 62(Pt 3):241-60.
- ♦ Richards M, Sykes B, Hedges R. 1995. Authenticating DNA extracted from ancient skeletal remains. *J Archaeol Sci* 22:291-9.
- ♦ Ricaut FX, Fedoseeva A, Keyser-Tracqui C, Crubezy E, Ludes B. 2005. Ancient DNA analysis of human neolithic remains found in northeastern Siberia. *Am J Phys Anthropol* 126:458-62.
- ♦ Ricaut FX, Keyser-Tracqui C, Bourgeois J; Crubezy E, Ludes B. 2004. Genetic analysis of a Scytho-siberian skeleton and its implication for ancient Central Asian migration. *Hum Biol*. 76(1):109-25.
- ♦ Rigoli, L. 2000. <http://www.siicsalud.com/dato/dat021/0111000/.html>
- ♦ Rihuete C. 2000. Dimensiones bioarqueológicas de los contextos funerarios. Estudio de los restos humanos de la necrópolis prehistórica de la cova des Càrritx (Ciudadella, Menorca). Tesis Doctoral. UAB.
- ♦ Rodríguez I., Barrera H. 2004. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL*. México. Vol. VII N°003:pp:323-335.
- ♦ Rogan P; Salvo J 1991. Study of nucleic acids isolated from ancient remains. *Year book of Physical Anthropology*. 33 : 195-214.
- ♦ Rozas, J. y R. Rozas. 1995. DnaSP, DNA sequence polymorphism: an interactive program for estimating population genetics parameters from DNA sequence data. *Comput. Appl. Biosci*. 11:621-625.
- ♦ Ruiz de la Peña J.I. *Introducción al estudio de la Edad Media*, Madrid, 1984.

- ♦ Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 230(4732):1350-4.
- ♦ Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*. 4(4):406-25.
- ♦ Salamon M; Tuross n; Arensburg B; Weiner S. 2007. Relatively well preserved DNA is present in the crystal aggregate of fossil bones. *PNAS*. 102(39), pp. 13783-13788.
- ♦ Salas A, Richards M, De la Fe T, Lareu MV, Sobrino B, Sánchez-Diz P, Macaulay V, Carracedo A. 2002. The making of the African mtDNA landscape. *Am J Hum Genet*. 71(5):1082-111.
- ♦ Sampietro ML, Caramelli D, Lao O, Calafell F, Comas D, Lari M, Agusti B, Bertranpetit J, Lalueza-Fox C. 2005. The genetics of the pre-Roman Iberian Peninsula: a mtDNA study of ancient Iberians. *Ann Hum Genet*. 69:535–548.
- ♦ Sampietro ML, Gilbert MTP, Lao O, Caramelli D, Lari M, Bertranpetit J, Lalueza-Fox C. 2006. Tracking down human contamination in ancient human teeth. *Mol Biol Evol*. 23:1801–1807.
- ♦ Sambrook J; Fritsch E; Maniatis T. 1989. *Molecular cloning a laboratory manual*. Sec. Ed Cold Spring Harbor Laboratory press, USA. Pp. 6-60.
- ♦ 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).
- ♦ Santos C., Montiel R., Sierra B., Bettencourt C., Fernandez E., Alvarez L., Lima M., Abade A., Aluja MP. 2005. Understanding differences between phylogenetic and pedigree-derived mtDNA mutation rate: a model using families from the Azores Islands (Portugal). *Mol.Biol Evol*. 22(6):1490-505
- ♦ Santos C, Montiel R, Angles N, Lima M, Francalacci P, Malgosa A, Abade A, Aluja MP. 2004. Determination of human caucasian mitochondrial DNA haplogroups by means of a hierarchical approach. *Hum Biol*. 76(3):431-53.
- ♦ Sarmiento Galan 2001 <http://www.jornada.unam.mx/2001/09/24/cien-galan.html>
- ♦ Schmitz RW, Serre D, Bonani G, Feine S, Hillgruber F, Krainitzki H, Pääbo S, Smith FH. 2002. The Neandertal type site revisited: interdisciplinary investigations of skeletal remains from the Neander Valley, Germany. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(20):13342-7.

- ♦ Schneider S, Roessli D, Excoffier L. 2000. Arlequin ver 2.000: Software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Lab. Dept. Of Anthropology and Ecology. University of Geneva. Switzerland.
- ♦ Scholz, M; Trelliso L; Pusch, C. 2000. The examination of ancient DNA: Guidelines on precaution, control and samples processing. *Trabajos de prehistoria* Vol 57(1), pp. 115-120.
- ♦ Scholz, M.; Giddings, Y.; Pusch, C. (1998): A polymerase chain reaction inhibitor of ancient hard and soft tissue DNA extracts is determined as human collagen type I. *Analytical Biochemistry* 259: 283-28.
- ♦ Schultes T, Hummel S, Herrmann B. 1999. Amplification of Y-chromosomal STRs from ancient skeletal material. *Hum Genet.* 104(2):164-6.
- ♦ Schwartz M, Vissing J. 2003. New patterns of inheritance in mitochondrial disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 310(2):247-51.
- ♦ Shen P., Lavi T., Kivisild T., Chou V., Sengun D., Gefel D., Shpirer I., Wolf E., Hillel J., Feldman M., Oefner P. 2004. Reconstruction of Patrilineages and Matrilineages of Samaritans and Other Israeli Populations from Y-Chromosome and Mitochondrial DNA Sequence Variation. *Human Mutation*, 24:248-260.
- ♦ Sigurgardottir S, Helgason A, Gulcher JR, Stefansson K, Donnelly P. 2000. The mutation rate in the human mtDNA control region. *Am J Hum Genet.* 66(5):1599-609.
- ♦ Smerling A. 2004. Análisis de ADN de *Streptococcus mutans* recuperado en restos antiguos. DEA. Universidad de Barcelona, Barcelona.
- ♦ 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.
- ♦ Spigelman M, Lemma E. 1993. The use of the polymerase chain reaction (PCR) to detect *Mycobacterium tuberculosis* in ancient skeletons. *Int J Osteoarchaeol.* 3:137-43.
- ♦ Solheim T. 1992. Amount of secondary dentin as an indicator of age. *Scandinavian Journal of Dental Reserch.* 100 (4): 193-199.
- ♦ Solórzano E. 2006. De la mesoamérica Prehispánica a la colonial: La Huella del DNA antiguo. . Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona.
- ♦ Solórzano E, Díaz N, Montiel R, Cañadas MP, Malgosa A. 2004. Análisis molecular de casos de treponematosi congénita en individuos neonatales del siglo XVI (Huelva-España). En Egocheaga JE. *Biología de las poblaciones*

humanas: Diversidad, tiempo, espacio Eds. XIII Congreso de la Sociedad Española de Antropología Biológica. pp: 247-53. Oviedo.

- ♦ Spigelman M, Lemma E. 1993. The use of the polymerase chain reaction (PCR) to detect *Mycobacterium tuberculosis* in ancient skeletons. *Int J Osteoarchaeol.* 3:137-43.
- ♦ Stevanovitch A; Gilles A; Bouzaid E; Kefi R; Paris F; Gayraud R; Spadoni J; Elchenawi F; Beraud-Colomb E. 2003. Mitochondrial DNA sequence diversity in a sedentary population from Egypt. *Ann Hum genet.* 68:23-39.
- ♦ Stone AC., Stoneking M. 1999. Analysis of ancient DNA from a prehistoric Amerindian cemetery. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 354(1379):153-9.
- ♦ Stone, A. y 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., Pakenford B. 2005 Mitochondrial DNA and human Evolution. *Annual Review Genomics Human Genetics*; Vol. 6, pp. 165-183.
- ♦ Stoneking, M. 2000. Hypervariable sites in the mtDNA control region are mutational hotspots. *Am J Hum Genet*, 67:1029-1032.
- ♦ Stoneking M. (1995): "Ancient DNA: how do you know when you have it and what can you do with it?" *Am J Hum Genet* 57:1259-1262.
- ♦ Stumpf M.P.H. and Goldstein D.B. (2001) Genealogical and Evolutionary Inference with the Human Y Chromosome. *Science* 291: 1738-1742.
- ♦ Subirá ME (1993) Elementos traza en restos humanos talayóticos. Estudio de la necrópolis de S'Illo des Porros, Santa Margarida. Mallorca. Libros Pórtico. Zaragoza
- ♦ Subirá ME. 1989. Estudi d'elements traça en la població talaiòtica de S'Illo des Porros (Mallorca). Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona.
- ♦ Subirá ME; Malgosa A. 1990. Aportación del análisis de elementos traza al estudio de los restos humanos. *Boletín de la Sociedad Española de Antropología Biológica* 11: 33-48.
- ♦ Subirá ME; Malgosa A. 1991. Some alkaline earth metal content of human bones at the site of S'Illo des Porros (Iron Age, Mallorca, Spain). *Int. J. of Anthropol.* 8: 225-231. Firenze.
- ♦ Subirá ME; Malgosa A. 1992a. Multi-element analysis for dietary reconstruction at a Balearic Iron Age Site. *International Journal of Osteoarchaeology* 2: 199-204. London.

- ♦ Subirá ME; Malgosa A. 1992b. Trace element contents in the bone as an age and sex indicator. A case of the necropolis of S'Illot des Porros (Spain). *International Journal Anthropol.* 7: 65-70. Firenze.

- ♦ Swarkar S; Anjana S Ekta R; Audesh B; Ramesh B. 2005. Human mtDNA hypervariable regions, HVR I and II, hint at deep common maternal founder and subsequent maternal gene flow in Indian population groups. *J Hum Genet* (2005) 50: 497–506.

- ♦ Tamura K, Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol.* 10(3):512-26.

- ♦ Tarradell M. 1964. *La necropolis de Son Real y la Illa dels Porros: Mallorca. Excavaciones Arqueológicas en España, 24, Madrid.*

- ♦ Tarradell M; Woods D.E. The cemetery of Son Real, Mallorca. *Archaeology* 12 (1959) 194-202, Abb.

- ♦ Templeton, A. 1982. *Adaptation and integration of evolutionary forces. En Perspectives on Evolution, editado por Milkman, Sinauer, Sunderland.*

- ♦ Tolk H, Barac L, Pericia M, Klaric I, Janicijevic B, Campbell H Rudan I; Kivisild T; Villems R and Rudan P. 2001. The evidence of mtDNA haplogroup F in a European population and its ethnohistoric implication. *Eup. J of Hum Genet.* 9:717-723.

- ♦ Tomàs, C.; Jiménez, G.; Picornell, A.; Castro, J.A.; Ramon, M. 2006. "Differential Maternal and Paternal Contributions to the Genetic Pool of Ibiza Island, Balearic Archipelago." *American Journal of Physical Anthropology. Estats Units d'Amèrica.* 129: 268-278.

- ♦ Torroni A., Bandelt H., Macaulay V., Martin Richards M., Cruciani F., Rengo Ch., Martinez-Cabrera V., Villems R., Kivisild T., Metspalu E., Parik J., Tolk H., Tambets K., Forster P., Karger B., Francalacci P., Rudan P., Janicijevic B., Rickards O., Savontaus M., Huoponen K., Laitinen V., Koivumäki S., Sykes B., Hickey E., Novelletto A., Moral P., Sellitto D., Coppa A., Al-Zaheri N., Santachiara-Benerecetti A., Semino O., and Scozzari R. 2001. A Signal, from Human mtDNA, of Postglacial Recolonization in Europe. *Am. J. Hum. Genet.* 69:844–852, 2001.

- ♦ Torroni A, Rengo C, Guida V, Cruciani F, Sellitto D, Coppa A, Calderon FL, Simionati B, Valle G, Richards M, Macaulay V, Scozzari R. 2001. Do the four clades of the mtDNA haplogroup L2 evolve at different rates? *Am J Hum Genet.* 69(6):1348-56.

- ♦ Torroni A, Bandelt HJ, D'Urbano L, Lahermo P, Moral P, Sellitto D, Rengo C, Forster P, Savontaus ML, Bonne-Tamir B, Scozzari R. 1998. mtDNA analysis reveals

a major late Paleolithic population expansion from southwestern to northeastern Europe. *Am J Hum Genet.* 62(5):1137-52.

♦ Torroni A, Huoponen K, Francalacci P, Petrozzi M, Morelli L, Scozzari R, Obinu D, Savontaus ML, Wallace DC. 1996. Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations. *Genetics.* 144(4):1835-50.

♦ Torroni A, Chen YS, Semino O, Santachiara-Beneceretti AS, Scott CR, Lott MT, Winter M, Wallace DC. 1994. mtDNA and Y-chromosome polymorphisms in four Native American populations from southern Mexico. *Am J Hum Genet.* 54(2):303-18.

♦ Torroni A, Schurr TG, Yang CC, Szathmary EJ, Williams RC, Schanfield MS, Troup GA, Knowler WC, Lawrence DN, Weiss KM, Wallace DC. 1992. Native American mitochondrial DNA analysis indicates that the Amerind and the Nadene populations were founded by two independent migrations. *Genetics.* 130(1):153-62.

♦ Trancho G., Robledo B. 2000. Hipoplasia del esmalte: un indicador patológico. *Gaceta Dental.* Vol:107:56-64.

♦ Turros N.1994. The biochemistry of ancient DNA in bone. *Experientia* 5, 530-535.

♦ Ubelake DH. 1978 Human skeletal remains. Excavations, analysis, interpretations. Aldine Publishing Co., Chicago, Illionis.

♦ Underhill P.A., Shen P., Lin A.A., Jin L., Passaion G., Yang W.H., Kauffmann E., Bonne-Tamir, B., Bertranpetit J., Francalacci P., Ibrahim M., Jenkins T., Kidd J.R., Medí S.Q., Seielstad M.T., Wells R.S., Piazza A., Davis R.W., Feldman M.W., Cavalli-Sforza L.L. and Oefner P.J. (2000)Y chromosome sequence variation and the history of human populations. *Nat. Genet* 26:358-361.

♦ Vigilant L, Stoneking M, Harpending H, Hawkes K, Wilson AC. 1991. African populations and the evolution of human mitochondrial DNA. *Science.* 253(5027):1503-7.

♦ Vona G; Ghiani M; Calò C; Vacca L; Memmi M; Varesi L. 2001. Mitochondrial DNA sequence analysis in Sicilia. *Am J Hum Biology.* 13(5):576-589.

♦ Wallace, D. 1997. Mitochondrial DNA in Aging and Disease. *Scientific American.* 228: 22-29.

♦ Wakeley, J. 1993. Substitution rate variation among sites in hypervariable region I of human mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* 37: 613-623

♦ Watson E, Forster P, Richards M, Bandelt HJ. 1997. Mitochondrial footprints of human expansions in Africa. *Am J Hum Genet.* 61(3):691-704.

- ♦ Willerslev E, Cooper A. 2005. Ancient DNA. *Proc Biol Sci.* 272(1558):3-16. Review.
- ♦ Willerslev E, Hansen AJ, Binladen J, Brandt TB, Gilbert MTP, Shapiro B, Bunce M, Wiuf C, Gilichinsky DA, Cooper A. 2003. Diverse plant and animal genetic records from Holocene and Pleistocene sediments. *Science.* 300:791-795.
- ♦ Wrischnik LA, Higuchi RG, Stoneking M, Erlich HA, Arnheim N, Wilson AC. 1987. Length mutations in human mitochondrial DNA: direct sequencing of enzymatically amplified DNA. *Nucleic Acids Res.* 15(2):529-42.
- ♦ Xu Z, Zhang F, Xu B, Tan J, Li S, Li Ch, Zhou H, Zhu H, Zhang J, Duan Q, Jin L. 2008. Mitochondrial DNA evidence for a Diversified origin of workers building Mausoleum for first Emperor of China. *Plos ONE* 3(10):e3275.doi:10.1371/journal.pone.0003275
- ♦ Yang DY, Watt K. 2005. Contamination controls when preparing archaeological remains for ancient DNA analysis. *J Archaeol Sci.* 32:331-6.
- ♦ Yang DY, Eng B, Wayne JS, Dudar JC, Saunders SR. 1998. Technical note: improved DNA extraction from ancient bones using silica-based spin columns. *Am J Phys Anthropol.* 105:539-543.
- ♦ Yao YG, Nie L, Harpending H, Fu YX, Yuan ZG, Zhang YP. 2002. Genetic relationship of Chinese ethnic populations revealed by mtDNA sequence diversity. *Am J Phys Anthropol.* 118(1):63-76.
- ♦ Zink A., Grabner W., Nerlich A. 2005. Molecular identification of human tuberculosis in recent and historic bone tissue samples: The role of molecular techniques for the study of historic tuberculosis. *Am J Phys Anthropol.* 126(1):32-47.
- ♦ Zierdt, H., Hummel, S., and Herrmann, B. 1996. Analysis of ancient DNA from a prehistoryc Ameridian cementery *Hum. Biol.*, 68, 185-199.