

HACIA EL ORIGEN DE LOS VASCOS SECUENCIAS DE DNA MITOCONDRIAL ANTIGUO DEL PAÍS VASCO

*Eva Fernández**, *Jaime García-Bour**, *Isabel Arenal***,
*Alejandro Pérez-Pérez**, *Luís Valdés***, *Daniel Turbón**

RESUMEN. - En la tarea de la reconstrucción del pasado humano hay más conocimiento de los objetos que de sus fabricantes. Muchos de los avances tecnológicos, cambios sociales y estructurales de los periodos pre y protohistóricos han sido explicados mediante expansiones demográficas y movimientos migratorios. La Arqueología Molecular ha venido contribuyendo en los últimos años al estudio de la Prehistoria incorporando información nueva sobre la caracterización biológica de las poblaciones humanas antiguas. El estudio genético directo de nuestros antepasados mediante técnicas sofisticadas de análisis molecular nos aproxima a cada individuo en particular. Con el tiempo podrán elaborarse mapas genéticos de las poblaciones pretéritas y contrastarse así las teorías de poblamiento regionales y generales periodo a periodo. Entre los distintos tipos de análisis molecular, los de DNA Antiguo parecen los de mayor interés, a pesar de las limitaciones técnicas y de la degradación del DNA, por tratar directamente los restos humanos antiguos. Se publican aquí, por vez primera, secuencias de DNA mitocondrial obtenido en dientes de época neolítica de la Cueva de Atxuri, y medieval de San Juan de Momoitio, Garai (Vizcaya), que junto a las de la necrópolis del Alto de la Ermita de Amézaga (Álava) son, hasta el momento, las únicas publicadas de la Península Ibérica. Los resultados muestran claras diferencias mutacionales respecto a la secuencia más común de los europeos actuales. En ninguna de las 12 muestras analizadas se detecta el haplogrupo V, objeto de debate en la literatura científica actual sobre el origen de los vascos. La aportación de estas secuencias supone un salto cualitativo en los estudios de prehistoria. A causa del aún bajo efectivo de individuos disponible no pueden extraerse conclusiones de carácter general.

Toward the origin of the basques. Ancient mitochondrial DNA sequences of the Basque country.

ABSTRACT. - The task of reconstructing the human past has generated more knowledge of the objects than of their manufacturers. Many of the technological advances, social and structural changes of the pre- and proto-history periods have been explained by demographic expansions and migratory movements. In recent years, Molecular Archaeology has been contributing to the study of Prehistory by adding new information about the biological characteristics of ancient human populations. The direct genetic study of our ancestors with sophisticated molecular analysis techniques brings us closer to each particular individual. In time, it will be possible to draw up genetic maps of past populations and, thus, contrast the theories of regional and general population period by period. Among the different types of molecular analysis, those of ancient DNA seem to be the most interesting in spite of the technical limitations and the degradation of the DNA, since they deal directly with ancient human remains. This is the first publication of mitochondrial DNA sequences obtained from teeth of the Neolithic epoch in the Cave of Atxuri, and of the medieval period in San Juan de Momoitio, Garai (Biscay), which, together with those of the necropolis of the Alto de la Ermita of Amézaga (Álava) are, so far, the only ones published from the Iberian Peninsula. The results show clear mutational differences with respect to the more common sequence of current Europeans. In none of the 12 samples does the analysis detect haplogroup V, which is much debated in the current scientific literature about the origin of the Basques. The contribution of these sequences is a qualitative leap in the study of prehistory. Due to the small number of individuals available to date, general conclusions cannot be drawn.

PALABRAS CLAVE: Antropología molecular, ADN, Neolítico, Edad del Bronce, Euskadi.

KEY WORDS: Molecular Anthropology, DNA, Neolithic, Bronze Age, Basque country.

* Secc. Antropología. Dpto. Biología Animal. Universidad de Barcelona. Av. Diagonal, 645. 08028 Barcelona.

** Gastiburu S.L. Apd. 6003. 48080 Bilbao. gastiburu@jet.es

1. INTRODUCCIÓN

Nuestra investigación sobre los orígenes de la población del País Vasco mediante el estudio de DNA, tanto mitocondrial¹ (mtDNA) como genómico, en muestras arqueológicas se remonta a 1991. Un equipo de médicos, antropólogos y arqueólogos intentó entonces la amplificación y secuenciación de DNA en muestras vascas antiguas a fin de verificar la hipótesis de si la alta frecuencia de Fibrosis Quística² en el País Vasco podía atribuirse a un pasado remoto o bien era de origen relativamente reciente. Estudios previos habían propuesto inicialmente un origen paleolítico³ (Casals *et al.* 1992), aplicando el cálculo estadístico a la tasa de mutación del gen causante de la enfermedad.

La variabilidad molecular del DNA permite caracterizar procesos de dinámica de poblaciones humanas. La diferencia genética en regiones no codificantes del DNA —como la región de Control del DNA mitocondrial, o los microsatélites en los intrones de algunos genes nucleares—, depende del tiempo transcurrido desde la divergencia de las poblaciones. Así, la presencia de un alto número de mutaciones diferenciales entre grupos distintos orienta sobre el tiempo que ha transcurrido desde su separación. Las distancias genéticas obtenidas pueden ser utilizadas opcionalmente como reloj molecular, aplicando las tasas de mutación a las diferencias genéticas, lo que, desde luego, se basa en determinados supuestos y, por tanto, especulativa y sujeta a revisiones drásticas.

Al primer objetivo sobre la presencia de Fibrosis Quística en muestras antiguas vascas se unió el de la obtención de DNA mitocondrial que pudiera ser de utilidad para la verificación de otras hipótesis sobre el poblamiento antiguo de la zona. El empeño, a partir de ese momento, fue reunir un número suficiente de muestras extraídas directamente por el equipo, sin duplicar individuos, y atendiendo a pautas cronológicas. Estas debían asegurar que se separasen tramos de la evolución cultural por los puntos donde pudiera haberse dado una incidencia de población reproductora alóctona sobre la población autóctona. En esta parcelación se obtendrían franjas temporales dentro de las cuales es posible estudiar la caracterización genética de la población. De esa forma podrían compararse las secuencias de DNA de las diversas franjas temporales del País Vasco —incluyendo vascos actuales, determinado su autoctonismo mediante los apellidos—, y éstas con otras poblaciones alejadas geográficamente (antiguas y modernas).

Los primeros resultados de la investigación se dieron a conocer en 1993 (Arenal *et al.* 1993; Lalueza *et al.* 1992-93) con la publicación de las dos primeras secuencias de mtDNA obtenidas de los restos antropológicos del cementerio medieval de la er-

mita del Alto de Amezaga (Álava), donde la degradación del DNA no parece haber sido excesiva. A estos se sumaron los de DNA genómico obtenidos en microsatélites del gen de la Fibrosis Quística (Ramos *et al.* 1995). Ninguno de los 20 vascos antiguos analizados con éxito, entre las que se encuentran los restos prehistóricos de Atxuri (Vizcaya), Urbiola (Navarra) y los medievales de Amézaga (Álava), confirmó la hipótesis de que la Fibrosis Quística estuviera presente entonces en la población vasca. El lector interesado podrá encontrar un panorama crítico y razonablemente completo sobre los estudios del origen biológico de los vascos, en la revisión actualizada publicada por D. Turbón (1997).

En los años siguientes la Arqueología Molecular ha progresado significativamente en los aspectos técnicos y se han producido, también, interesantes resultados sobre el origen de los primeros habitantes de la isla de Pascua (Hagelberg *et al.* 1994), por ejemplo, o sobre el origen del primer poblamiento americano mediante linajes mitocondriales (Lalueza *et al.* 1997; García-Bour *et al.* 1998). El panorama actual es muy esperanzador, dentro de las grandes dificultades inherentes (técnicas, conservación, coste y especialización). Las técnicas de extracción y análisis de DNA a partir de muestras antiguas son hoy de aplicación habitual en los laboratorios de Biología Molecular especializados en material arqueológico y paleontológico, así como en los laboratorios forenses. En lo concerniente a la preservación del DNA en esqueletos de gran antigüedad, se ha demostrado que no depende tanto de los factores temporales como de las condiciones de preservación del yacimiento (temperatura, acidez, humedad, etc.). Un ejemplo ilustrativo son las secuencias obtenidas de mtDNA de dos Neandertales, uno de Alemania (Krings *et al.* 1997), y otro del norte del Cáucaso (Ovchinnikov *et al.* 2000).

Un paso crítico en los avances mencionados, y nada fácil, ha sido superar la fase de la simple amplificación del DNA antiguo, en la que la se podía llegar a obtener información mediante la digestión del DNA amplificado con enzimas de restricción. En la fase siguiente, la secuenciación del DNA, puede leerse ya el mensaje genético íntegro en las dos cadenas complementarias del fragmento de DNA estudiado. Las secuencias son mucho más informativas que el análisis de restricción comentado, y, además, permiten comprobar si ha habido contaminación del DNA durante la investigación.

Nuestro equipo se encuentra hoy en disposición de secuenciar con garantía el DNA antiguo de las muestras que así lo permitan —esto es, dependiendo de las condiciones de preservación del DNA—, fruto de la labor continuada desde 1991. En el presente artículo se dan a conocer, por vez primera, 10 secuencias de DNA de vascos antiguos con las garantías mencionadas.

Individuo	Procedencia	Datos	Datación
AT15	Atxuri	M3 inferior izquierdo	Neolítico
AT16	Atxuri	M3 inferior izquierdo	Neolítico
AT18	Atxuri	I2 superior	Neolítico
AT19	Atxuri	Raíz molar?	Neolítico
AT25	Atxuri	Molar (?)	Neolítico
AT27	Atxuri	Molar inferior izquierdo	Neolítico
GA15	Garai	M2 inferior izquierdo. Hombre 20-40 años	Medieval
GA22	Garai	M2 inferior izquierdo. Hombre 20-40 años	Medieval
GA24	Garai	M2 inferior derecho. Hombre 20-40 años	Medieval
GA50	Garai	M2 inferior izquierdo. Hombre 15-22 años	Medieval

Tabla 1.- Procedencia de las muestras.

2. MATERIAL Y MÉTODO

Se seleccionaron dientes neolíticos de Atxuri⁴ (Vizcaya) y de época medieval de Garai⁵ (Vizcaya) (Tabla 1) que se limpiaron minuciosamente en su exterior mediante óxido de aluminio a presión con una arenadora Sand-blaster Dentralfarm, modelo Base 1 Plus, con el fin de eliminar la capa más externa, fuente común de contaminación y suciedad. Posteriormente se trituraron en un molino refrigerado con nitrógeno líquido, cuyo producto se lavó con solución de EDTA 0.5 M, y fue digerido con proteinasa K.

El DNA total fue extraído mediante un protocolo estándar Fenol/Cloroformo y concentrado con microconcentradores Centriplus-30000. Por último se amplificaron y secuenciaron fragmentos correspondientes a la Región Hipervariable I (HVS I) del mtDNA con cebadores específicos. Los individuos AT15, AT16, AT18, AT25, GA22 y GA5 fueron amplificados con cebadores que proporcionaban un producto de PCR de 268 pares de bases (16142-16410), mientras que AT19, AT27, GA15 y GA24 lo fueron con cebadores distintos, dando lugar a un fragmento, de menor longitud, de 143bp (16267-16410) ya que no fue posible la amplificación con los cebadores de 268 pares de bases. Las secuencias finalmente obtenidas se compararon con la secuencia consenso de Anderson *et al.* (1981) y analizaron sus diferencias. El protocolo seguido es el descrito por nuestro equipo en Lalueza *et al.* (1997), con algunas modificaciones en la duración y ajuste de temperaturas en los ciclos de PCR.

Durante todo el proceso de manipulación de la muestra se extremaron las precauciones para tratar de evitar la contaminación con DNA exógeno. La contaminación es el principal problema en los estudios de DNA de restos fósiles, ya que al ser éste poco abundante en la muestra de partida, o bien por estar interferido por inhibidores producto de la descomposición del organismo, cualquier molécula externa de DNA será susceptible de ser amplificada y secuenciada enmascarando el resultado final. El caso más común de contaminación suele darse en las fases tanto de extrac-

ción y como de amplificación del DNA, generalmente procedente de quien manipula las muestras en el laboratorio, así como por el DNA que en forma de aerosoles flota en todo ambiente. Cuando se analizan en el laboratorio muestras actuales, de sangre por ejemplo, la abundancia del DNA es tanta que la contaminación puede excluirse estadísticamente por quedar el DNA de contaminación en minoría respecto al endógeno. En la manipulación del DNA antiguo se da, en cambio, el caso contrario y al quedar interferido el DNA exógeno por los inhibidores de la muestra puede incluso presentar apariencia de DNA antiguo, en forma de banda débil de amplificación. Consiguientemente, además de la posibilidad de *contaminación completa* del DNA del investigador, o del existente en el ambiente del laboratorio, hay que contar también con la posibilidad de *contaminación parcial*, cuando el DNA de la muestra se mezcla con el exógeno durante su amplificación, formándose así una molécula quimérica. En la fase de amplificación puede llegarse a un relativo grado de certidumbre de no haber habido contaminación cuando los controles de agua, que se explican más adelante, aparecen limpios de banda de DNA. Sin embargo nuestro equipo ha constatado en años anteriores casos, ciertamente minoritarios, de contaminación parcial tan sólo descubiertos al analizar las secuencias, lo que no puede verificarse en la etapa previa de amplificación y digestión enzimática.

Con esta finalidad se manipularon las muestras con guantes de laboratorio en todo momento. Tanto la extracción como la amplificación se realizaron dentro de una campana de flujo laminar usando para ello material estéril. Adicionalmente, y para detectar la posible contaminación en estas dos fases, se procesaron, junto con el resto de muestras, controles de agua sin DNA que tan solo contenían los reactivos necesarios para el proceso. Ambos controles resultaron negativos, lo que avala en buena medida la autenticidad de los resultados. Las secuencias posteriores se compararon con las de los investigadores directamente involucrados en la manipulación de las muestras, excluyéndose finalmente la existencia de secuencias quiméricas.

Cluster (Macaulay <i>et al.</i> 1999)	Subcluster ^a (Macaulay <i>et al.</i> 1999)	Motivo RFLP ^b	Cluster (Richards <i>et al.</i> 1996)	Motivo HVS ^c I	Status 00073	Motivo adicional HVSII ^c	Motivo adicional de región codificadora ^c
H		-7025AluI -14766MseI	1 (CRS y derivados)		A		
V		-4577NlaIII -14766MseI		16298	A	00072	15094
U	K	+12308HinfI	4		G		
		-9052HaeII/- 9053HhaI		16224 16311		12372 11467	
		+10394DdeI					
		-4990AluI		16189 16249			
		-					
		13103HinfI/+1 3104MboI					
		+14068TaqI					
		+15907RsaI		16051 16129C			
				16343			
				16356			
	U1	+4643RsaI +11329AluI	~ 5	16270			3197 11467
	U2			16172 16219			
	U3			16069	G	00295	11251 12612
J	U4			16126			
	U5			16126 16294	G		10403 11251 14905
T	U6			16163 16186 16189			
			16129	G	00199 00204 00250	4529T 10238 12705 15043 15924 12705	
I		-4529HaeII +8249AvaII/- 8250HaeIII	3A				16223 16391
		+10032AluI					
W		+8249AvaII/- 8250HaeIII	3	16223 16292	G	00189 00204 00207	12705
		-8994HaeIII					
X		+14465AccI	3	16223 16278	G		12705
				16223			
M		+10394DdeI +10397AluI		16223	G		12705
C		+10394DdeI +10397AluI		16223 16298	G		12705
		-		16327			
		13259HincII/+ 13262AluI					

Tabla 2.- Integración de datos de Macaulay *et al.* 1999, y Richards *et al.* 1996. Motivos que caracterizan los principales clusters de mtDNA del Oeste de Eurasia.

^aLos subclusters presentan los motivos del cluster en el que se incluyen.

^bSitios ganados y perdidos respecto a la secuencia consenso (Anderson *et al.* 1981).

^cTransiciones respecto a la secuencia consenso, a menos que la base que cambia esté especificada.

3. RESULTADOS

Con la metodología descrita se obtuvieron un total de 21 secuencias correspondientes a 10 individuos (Tabla 3). Para los individuos AT15, AT16, AT18, AT25, GA15 y GA22 se pudieron secuenciar ambas cadenas, mientras que para AT19, AT27, GA24 y GA50 sólo se pudo obtener una de ellas. Los individuos AT15 y AT25 se replicaron también en un laboratorio independiente (Institut de Biologia Molecular del Barcelona, CSIC) obteniéndose el mismo resultado que en el nuestro, control adicional de ausencia de contaminación mediante DNA actual en las secuencias mencionadas. Por otra parte, las cadenas de DNA de las muestras GA15 y AT27 se repitieron en nuestro laboratorio en dos experimentos independientes, al menos en una de las cadenas con resultados idénticos.

En la Tabla 3 figuran los resultados actuales, junto a la secuencia consenso de Anderson *et al.* (1981), considerada la de referencia ordinaria y que es la más común entre los Europeos, y junto a las dos secuencias antiguas de individuos vascos obtenidas por nuestro grupo en 1991, las primeras publicadas por nuestro equipo en la revista *Kobie* (Lalueza *et al.* 1992-93). Se ha adoptado un criterio muy restrictivo en cuanto a la inclusión de diferencias de mutaciones de las secuencias que figuran en la Tabla 3. Se han excluido las mutaciones ambiguas o dudosas ya que pueden ser originadas por la *Taq* polimerasa durante el proceso de replicación y copia del DNA. Aquellas finalmente confirmadas mediante la doble cadena de DNA se representan en **negrita**, correspondiendo las restantes a las de tan sólo una cadena, por ser la complementaria dudosa o imposible de obtener.

En las secuencias obtenidas aparece con una frecuencia del 50% la mutación C→T 16294 (AT15, AT16, AT25, GA15, GA24). De la misma manera encontramos otros dos cambios que se repiten en dos de las muestras: C→T 16296 y en tres de ellas T→C 16304. Las mutaciones C→T 16294 y C→T 16296 aparecían ya en una de las secuencias (individuo 94003a) de Alto de la Ermita de Amézaga (Álava), sugiriendo un patrón común en las muestras antiguas vascas. La mutación T→C en la posición 16126 define el haplogrupo europeo 2 (Richards *et al.* 1996) y cuando va acompañada de la C→T en 16294 define el subgrupo 2B (T según Torroni *et al.* 1996). No podemos confirmar, por el momento, de forma definitiva la pertenencia de estas muestras a dicho haplogrupo ya que la posición 16126 no está incluida en nuestros primeros análisis debido al diseño de los cebadores. En cambio, sí puede confirmarse la ausencia del haplogrupo V en las muestras aquí analizadas.

4. LAS SECUENCIAS DE DNA EN SU CONTEXTO BIOLÓGICO

Debido al criterio altamente restrictivo mencionado, el reducido número de muestras del presente estudio que han proporcionado resultados fiables, incompletos en parte, no hacen aconsejable el análisis filogenético. Con todo las secuencias son orientativas y de gran utilidad en la verificación de los estudios de reconstrucción de la variabilidad poblacional atribuida a las poblaciones antiguas con datos de DNA de poblaciones actuales. Lógicamente el panorama que emerge de un análisis de restos antiguos no tiene por qué coincidir con el de la población actual en la misma zona geográfica, ya que puede haber cambiado la composición poblacional por descensos demográficos a lo largo de siglos (guerras, epidemias, hambrunas, desaparición de pueblos) y el efecto de la deriva genética y de las migraciones. Procede, en primer lugar, situar en su contexto biológico los resultados, lo que se inicia con una breve exposición de las conclusiones de los estudios de mtDNA más recientes en poblaciones europeas y las hipótesis propuestas.

En el espacio de tiempo transcurrido entre el inicio de nuestras investigaciones y los resultados motivo de este artículo, se han podido caracterizar los haplogrupos⁶ de la actual población europea, un panorama actualizado de los cuales se encuentra en Torroni *et al.* (1996) y, también, en Richards *et al.* (1996). Los haplogrupos han sido determinados por dos vías distintas: mediante polimorfismos de restricción enzimática (Torroni *et al.* 1994, 1996) —esto es, cambios en una posición del DNA mitocondrial que se traduce en la aparición o desaparición de una diana de corte o restricción—, o bien mediante el análisis de secuencias de la región Hipervariable I (HVS I) (Richards *et al.* 1996), y la Hipervariable II (Wilkinson-Herbots *et al.* 1996). El resultado de la integración de los datos de ambas metodologías ha sido publicado recientemente (Macaulay *et al.* 1999) y se resume aquí en la Tabla 2.

Siguiendo la nomenclatura de los enzimas de restricción, existen 10 *clusters* o haplogrupos principales, identificados con letras, que engloban toda la variabilidad de la Europa actual (H, V, U, J, T, I, W, X, M, C), subdivididos en algunos casos en subclusters menores (U se subdivide en K, U1, U2, U3, U4, U5, U6 y dentro de T se distingue T1). La mayoría de ellos tienen una correspondencia o se aproximan a aquéllos definidos mediante secuenciación de la región HVS I, definidos por otros autores e identificados, esta vez, con números. Así, H se correspondería con 1; U con 4; J con 2a; T con 2B; I con 3a; mientras que U5 se aproximaría a 5; y 3 englobaría conjuntamente a I, W y X. Cada uno de estos haplogrupos presenta una distribución geográfica diferencial en Europa. El haplogrupo 1 (H), que incluye a la secuencia consenso y

aquellas derivadas, es el más frecuente en Europa (40-60%) y está ampliamente distribuido por el continente. Richards *et al.* en 1996 encuentran, sin embargo, que el haplogrupo 2 (T→C 16126) aparece confinado en Oriente Medio. De sus dos subgrupos, el 2B se distribuye en Europa de manera homogénea con una frecuencia del 8%, mientras que el 2A presenta un gradiente de frecuencias que oscilan del 2 al 22%. El resto de haplogrupos están presentes con menor frecuencia en Europa.

A partir de estos datos ciertos autores proponen que la variabilidad mitocondrial actual europea proviene de las poblaciones del Paleolítico Superior⁷. Según Richards *et al.* (1996) los haplogrupos 2B, 3A y 5 se originaron hace aproximadamente 35000 años, llegando a Europa durante la colonización de *Homo sapiens sapiens*, mientras que el 1 y el 4, más frecuentes en la actualidad, tendrían un origen también paleolítico aunque más reciente (25000 años), fecha que coincide con la propuesta por Torroni *et al.* (1998). Sin embargo el haplogrupo 2A habría llegado a Europa, según estos autores, desde Oriente Medio coincidiendo con la expansión Neolítica hace entre 12500-6000 años.

Esta interpretación se basa principalmente en las estimaciones de divergencia de los diferentes haplogrupos —reloj molecular— que parte del supuesto que la tasa de mutación —ritmo al que se producen los cambios en una secuencia de DNA—, es constante a lo largo del tiempo. Si se conoce dicha tasa, puede estimarse el tiempo de separación entre dos linajes determinados a partir de las diferencias en las secuencias analizadas. Sin embargo existe gran controversia a la hora de determinar la tasa de mutación, de manera que unos mismos datos pueden proporcionar tiempos de divergencia muy dispares dependiendo de la tasa que se use. Ya en 1996 se anunció (Howell *et al.* 1996) que la tasa de mutación del mtDNA era considerablemente más alta de las utilizadas por Richards *et al.* (1996) lo que motivó que estos autores consideraran la posibilidad de que sus dataciones paleolíticas de los linajes mitocondriales europeos quedaran acortadas hasta época neolítica (Richards *et al.* 1996: 197; véase, también, Pääbo 1996 a este respecto). Datos recientes (Sigurdardóttir *et al.* 2000) insisten de nuevo en la alta tasa de mutación en la región HVI mitocondrial, que rebajaría considerablemente las supuestas fechas paleolíticas mencionadas, hasta un límite aproximado no superior a los 10.000 años A.P.

Según Richards *et al.* (1996: 194) la mayor parte de los vascos pertenecen al haplogrupo H, el más común entre los europeos de hoy. En las secuencias aquí estudiadas —escasas, desde luego, para cualquier especulación razonable de tipo filogenético— tan solo podemos confirmar la presencia de la mutación en 16294 tanto en el yacimiento neolítico de Atxuri co-

mo en las dos muestras medievales de Garai y Amézagaga. Queda pendiente la confirmación de la mutación en 16126 para poder determinar la presencia o ausencia del linaje 2B, o bien de su equivalente T, en muestras antiguas vascas. Según Richards *et al.* (1996: 194) el haplogrupo 2B aparece hoy con una distribución geográfica amplia y consistente en los europeos, y con una frecuencia de en torno al 8%. La cuestión no es tan sencilla como parece ya que, como se ha visto en el párrafo anterior, las nuevas estimaciones de la tasa de mutación podrían reducir en un cero esas fechas. A ello contribuirá esencialmente, sin duda, la inclusión de los datos más reales de la población antigua, que poseen un criterio independiente de mayor exactitud en la cronología, dataciones por C¹⁴ y relativas, frente a estas estimaciones de los relojes moleculares.

Recientemente el haplogrupo V, —la letra v—, definido principalmente por el cambio 16298 T→C, ha merecido una atención especial en la bibliografía al estar presente en frecuencias muy altas en ciertos grupos aislados. Así, es muy común entre los bereberes norteafricanos, presenta frecuencias de hasta un 20% en la población vasca y llega hasta el 40.9% en los Saami de Laponia, según datos de Torroni *et al.* (1998) mientras que está ausente en poblaciones del sudeste de Europa y Oriente Medio. Cálculos de divergencia poblacional sugieren una antigüedad de entre 12000 y 13000 años, aproximadamente, para este haplogrupo. Basándose en las frecuencias encontradas en la población actual, Torroni *et al.* (1998) sugieren que dicho haplogrupo se originó en el Norte de la Península Ibérica/Sur de Francia, desde donde se habría expandido al norte y centro de Europa durante el Segundo Peniglaciario, hace entre 12200 y 13000 años.

Sin embargo, este panorama queda empañado por la heterogeneidad de las tres muestras estudiadas hasta ahora en la población vasca actual, cuyas frecuencias son respectivamente 20.0%, 11.1% y 3.3% (véase las referencias en Izaguirre y De la Rúa 1999: 203). ¿Cuál de ellas representa a los vascos? En un trabajo reciente (Izaguirre y De la Rúa 1999), en una elevada muestra de dientes y huesos prehistóricos vascos, mediante digestión enzimática, no se identificó ningún caso del haplogrupo V en muestras vascas de la Edad del Bronce, lo que se opone frontalmente a la propuesta de Torroni *et al.* (1998). De acuerdo con lo comentado en el apartado de Material y Método del presente trabajo, no puede descartarse la posibilidad de contaminación con DNA exógeno en el estudio de restricción enzimática de las muestras vascas antiguas, por no haberse comprobado mediante secuenciación.

De las secuencias aquí publicadas se deduce, en cambio, que ninguna de las muestras analizadas pertenece al haplogrupo V, definido por el cambio T→C en posición 298 (Tabla 3).

5. IMPLICACIONES PARA LOS ESTUDIOS DE PREHISTORIA VASCA

Desde la arqueología los resultados de estas investigaciones se siguen con gran atención. La ampliación de los registros de secuencias de DNA en lugares concretos como el Próximo Oriente, ambas orillas del Mediterráneo y la Península Ibérica son objetivos básicos para clarificar aspectos muy controvertidos sobre la expansión neolítica en Europa. Pero este no es el único interrogante histórico, otros de no menor interés son propuestos para su investigación. El constante vaivén de las teorías interpretativas, “movimientos de población” o “la difusión de las ideas” no han logrado la explicación final en ninguno de los casos. El factor humano vuelve siempre a ser el eje que falta en la explicación.

Dentro de este panorama general, el origen de los Vascos es una de las incógnitas que han generado más discusión desde diferentes áreas del saber (Cromañones, paleolíticos, neolíticos). En las jornadas “El origen de los Vascos. Un problema biológico o arqueológico”⁸ celebrado en Bilbao en 1997, se debatió el estado de la cuestión a esa fecha, con la difusión de las novedades que desde la investigación molecular se estaban produciendo.

La investigación de cada uno de los particularismos poblacionales y culturales de Europa, es interesante en sí mismo y en el contexto general, por lo que no podemos obtener información del origen de los Vascos sin proceder a la comparación con el resto de Europa, ni en la actualidad ni en la prehistoria. Desde un punto de vista cultural, la historia de los pueblos anteriores al registro escrito está plagada de interpretaciones en la que los flujos de gentes, en desplazamientos a media y larga distancia, han servido para ordenar y comprender la presencia-ausencia o desaparición de determinadas técnicas, formas materiales o hábitos culturales. Esas mismas teorías han influenciado la interpretación del registro arqueológico y antropológico vasco.

Desde el punto de vista de la evolución de las poblaciones, hay que tener en cuenta varios aspectos. Por una parte, las poblaciones aisladas asentadas en una región y por otra, poblaciones en contacto o en desplazamiento. En el primer caso, un marcado aislamiento genético junto con efectivos poblacionales reducidos favorece la acción de la deriva genética y, por tanto, contribuyen a la diferenciación de las poblaciones a nivel molecular. En cambio, el flujo génico y la migración tienden a introducir variabilidad molecular externa al grupo, aumentando la diversidad intrapoblacional en la medida que se aporten nuevos linajes al grupo receptor, pero reduciendo en general las diferencias genéticas entre las poblaciones que se mezclan.

Los movimientos de poblaciones reproductoras generan algo más y, por tanto, hay que considerar otros aspectos derivados del movimiento real o por el contrario de la inexistencia de un desplazamiento demográfico. Si consideramos el ámbito biológico de los movimientos de población, sabemos que a través de ellos pueden introducirse en las poblaciones autóctonas nuevos linajes maternos, lo que puede permitir su detección y justificar la aparición de cambios culturales y sociales. Pero no debemos fijar este hecho de forma unívoca, “llegada de gentes” sobre las poblaciones en las que esperamos el impacto; igualmente hay que contemplar el flujo inverso “salida de gentes”, hacia otras zonas con el aporte génico potencial que conlleva, p. e. la exogamia de mujeres o la trashumancia desde distintos orígenes geográficos hacia un punto de interés común y el retorno (discusión en Valdés 1990, 1994, 1998). Esto nos lleva a considerar que se origina un movimiento pendular de poblaciones reproductoras que llegan a coincidir en un área y que, en función de las relaciones sociales entre los grupos, puede posibilitar la existencia de “hot points” de intercambio humano y cultural. Del éxito de estos intercambios y de su continuidad se derivan aportes génicos de difícil control por su bajo impacto numérico y por su no menos difícil interpretación. Pero en los casos en los que el factor “éxito reproductor” y/o “las mejores condiciones de adaptación-supervivencia” es mayor que en la población autóctona, los aportes génicos pueden llegar a reflejarse en un porcentaje significativo en la población estudiada en pocas generaciones sin que se detecten cambios culturales o tecnológicos e incluso, si predomina el mayor éxito reproductor de una frente a la otra, llegar a parecer como “la población local”.

De forma muy sencilla y escueta, dada la dimensión del problema, se intenta aquí dar idea de la complejidad inherente al proceso de flujo de poblaciones. La cuestión es averiguar cómo era el mapa de distribución de linajes mitocondriales en la antigüedad y qué relación se establece con las fases culturales a través del cual será posible la aproximación a la distribución más probable de los linajes genéticos antiguos. Desde la perspectiva de los análisis actuales de mtDNA, a muchas generaciones de las poblaciones, p.e. neolíticas, Europa presenta un panorama de gran uniformidad. La caracterización molecular del DNA moderno en Europa, a excepción de algunos grupos aislados como Sardos y Lapones, se muestra difícil y poco clarificada. Pero la cuestión a investigar es cuándo y como se inició ese efecto. Por ello, el estudio molecular de la variabilidad genética de poblaciones actuales debe ser considerado con cautela, al tratar con poblaciones antiguas, ya que tan solo permite plantear hipótesis sobre el poblamiento antiguo. Hipótesis que deben ser contrastadas con el fin de refutarlas o confirmarlas. De forma igualmente escueta, hay que considerar

como principales tres momentos de la prehistoria del País Vasco para detectar presencia alóctona importante. El primero el Mesolítico del que los restos humanos son muy escasos. El segundo el Neolítico, diferenciando en su estudio la zona costera de la zona alavesa y, tercero, de forma especial la aparición de los campos de urnas. Estos no son los únicos momentos que deben rastrearse. La tardo antigüedad o la romanización son especialmente importantes, aunque su significación tarde en descubrirse dada la similitud de los resultados obtenidos hasta ahora en nuestra investigación, separados los datos entorno a 3000 años. Una mayor amplitud de exposición sobre estos problemas, será el tema de otro artículo que iniciamos en la fase de elaboración del que ahora nos ocupa.

En esta vía de investigación es necesario mantener clara la idea de “proceso de movimiento permanente de grupos reproductores de 2 a “n” personas a lo largo de la toda historia”. Entre otros casos podría ser el caso de la Cueva de Urbiola (Navarra) y de Gobaederra (Álava), cuyo impacto sobre el *pool* genético de una población local en estudio dependerá de muchos factores que podemos enmarcar entre dos extremos “el éxito reproductor de los nuevos” por un lado y por otro “el número real de los reproductores alóctonos con relación a la población reproductora que los recibe”, pero es sobre todo muy importante considerar que en este flujo constante de gentes están incluidas las mujeres; si no fuese así, no habría llegada de linajes maternos diferentes. Por tanto, será la presencia de linajes nuevos lo que nos permitirá considerar impactos poblacionales sobre la población autóctona, aunque puede suceder que aún habiéndose dado la absorción de gentes alóctonas éstas no se puedan diferenciar todavía por pertenecer a los mismos linajes maternos ancestrales. Sin embargo, las otras mutaciones adicionales a las del haplogrupo significarían la separación antigua del linaje y aportarían luz a la caracterización. Esa primera falta de expresión nos llevaría a aceptar que “la difusión de las ideas por contactos culturales” sea la causa más probable de la transmisión de cambios tecnológicos, sociales, etc. frente a movimientos de grupos o población real, aunque hay que esperar a nuevos datos ya por el momento no es interpretable. Por otro lado, la falta de detección puede ser debida a un aislamiento geográfico en cuyo caso las variaciones deberían ser causadas por la deriva genética.

Por todo lo expuesto, es evidente la utilidad y necesidad de los estudios de DNA antiguo cuando se analizan las hipótesis formuladas sobre el contexto

poblacional antiguo establecido previamente a partir de las poblaciones actuales. El DNA antiguo, el de las poblaciones que vivieron antes o después de la divergencia poblacional que queremos estudiar, aunque difícil de caracterizar, permite contrastar dichas hipótesis directamente, al analizar el propio DNA de los individuos que vivieron en el pasado, por lo que no es necesario hacer inferencias sobre cómo habría sido ni qué mutaciones le habrían caracterizado.

En esa línea y desde que iniciamos la investigación sobre la población del País Vasco, nuestro objetivo siempre ha sido aportar información relevante y contrastable sobre el origen del poblamiento inicial de las poblaciones actuales circunscritas a ese territorio. Se seleccionó el periodo neolítico por ser el primero abundante en restos humanos, reservando para el momento en que la técnica se encontrase depurada los restos más antiguos, muy escasos (Lezetxiki y Amalda, Guipúzcoa y Axlor, Vizcaya). Los estudios más recientes de la variabilidad molecular del DNA mitocondrial en población vasca autóctona actual sugieren que la variabilidad de las regiones no codificantes no se diferencia de la variabilidad observada para la mayor parte de las poblaciones europeas analizadas. Otra vez debemos preguntarnos cuándo se produce esa atenuación y con qué antigüedad aparece. Los datos aportados hasta ahora sobre la población antigua del País Vasco son sugerentes pero deberán ser contrastados con una muestra mayor. Es importante esta cuestión dado que la investigación arqueológica ha generado hipótesis de un aislamiento del País Vasco durante largos periodos, o cuando menos, de una situación marginal frente a las corrientes culturales alóctonas.

AGRADECIMIENTOS

Damos las gracias a Tomás Uribetxeberria de la Diputación Foral de Vizcaya, así como a M^a Luisa Palanques quien proporcionó el material estudiado del yacimiento del Alto de la Ermita (Amézaga) a través del museo de la Diputación de Álava, y a Iñaki García Camino por su contribución al estudio con los restos de la necrópolis de S. Juan de Momoitio, Garai. Expresamos particular agradecimiento a Eva Prats del Institut de Biología Molecular, del CSIC de Barcelona por su contribución a la verificación de algunas de las secuencias. Los resultados obtenidos mediante el proyecto DGES PB/97-0925 del MEC español (DT). Se agradece así mismo a la Sociedad de Estudios Vascos–Eusko Ikaskuntza por la beca Agustín Zumalabe de 1994 a Isabel Arenal.

NOTAS

¹ El DNA mitocondrial es una molécula circular de DNA de doble cadena que se encuentra en el interior de las mitocondrias de la célula, siendo su actividad principal la codificación de la síntesis de proteínas y de funciones de la respiración celular. Su transmisión en el citoplasma del óvulo y la ausencia de recombinación permiten reconstruir linajes ancestrales maternos.

² Enfermedad grave autosómica de carácter recesivo, casi desconocida en los asiáticos y relativamente rara en melanoafricanos, muy común, sin embargo, en europeos en los que la padece 1 niño de cada 2000, y de la que son portadores 1 de cada 22 europeos actuales. Su origen parece asociado a la tuberculosis y su expansión se remonta probablemente a época neolítica. Es de incidencia muy alta en diversas regiones europeas y, en particular, en el actual País Vasco.

³ Para conocer este valor temporal véase la discusión sobre los relojes moleculares.

⁴ Cueva con enterramientos entre el neolítico y la Edad del Bronce. No se ha hecho estudio antropológico pero realizamos un inventario de los restos. Sigla AT.

⁵ Necrópolis de S. Juan de Momoitio, Garai. Cronología s. XI al XIV. Se ha realizado el estudio antropométrico. De él se infería que la población enterrada "no difiere sustancialmente de los (Biotipos) de las poblaciones medievales alavesas (...), ni de la serie de la Ca-

taluña del medioevo, aunque se observen algunos rasgos particulares en cada serie".

⁶ Un haplotipo o linaje es un conjunto específico de mutaciones en la secuencia de DNA. El haplogrupo es un haplotipo que aparece en un **subgrupo** poblacional. En cada **grupo** o muestra poblacional estudiadas se encuentran de ordinario haplotipos diversos. Desde el punto de vista de la dinámica de poblaciones, cada haplogrupo tiene un origen común por reproducción diferencial o por migración y es generalmente ancestral. El parentesco mediante linaje mitocondrial no debe confundirse con el de los genes nucleares.

⁷ Esta denominación al igual que la de "neolíticos", adoptada por los biólogos moleculares, en los estudios de los linajes mitocondriales de las poblaciones actuales sirve para designar los de mayor antigüedad estimada. Esta se calcula mediante la tasa de mutación, lo que resulta poco preciso en su equivalencia respecto a las dataciones tradicionales en arqueología o antropología. Por tanto, tales clasificaciones temporales no son necesariamente reales o paralelas a las que son usadas en arqueología. Por consiguiente, no se aludirá a ellas en el presente artículo a partir de este momento, salvo en citas de autores, sustituyéndolas, cuando sea el caso, por términos como "el más antiguo" y el "2º en antigüedad", etc.

⁸ Organizada por la Asociación Denboraren Argia y financiada por el Departamento de Cultura de la Diputación Foral de Bizkaia a quien deseamos agradecer la ayuda prestada.

BIBLIOGRAFÍA

- ARENAL, I.; PERÉZ-PÉREZ, A.; LALUEZA, C.; TURBÓN, D. (1993): Primeros datos de DNA-mt en población vasca antigua. *Revista de Arqueología*, 144: 46-51.
- ANDERSON, S.; BANKIER, B.; BARREL, B.; BRUIJN, M.; COULSON, A.; DROUIN, J.; EPERON, I.; NIERLICH, D.; ROE, A.; SANGER, F.; SCHREIER, P.; SMITH, A.; STADEN, R.; YOUNG, I. (1981): Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290: 457-465.
- CASALS, T.; VÁZQUEZ, C.; LÁZARO, C.; GIRBAU, E.; GIMÉNEZ, F.; ESTIVILL, X. (1992): Cystic Fibrosis in the Basque Country: High Frequency of Mutation DF508 in Patients of Basque Origin. *American Journal of Human Genetics*, 50: 404-410.
- GARCÍA-BOUR, J.; PÉREZ-PÉREZ, A.; PRATS, E.; TURBÓN, D. (1998): Secuencias de mtDNA de Aborígenes de Tierra del Fuego-Patagonia y el origen de los Fueguinos. *Anales de Instituto de la Patagonia*, Serie de Ciencias Históricas, Punta Arenas, Chile, 26: 69-75.
- HAGELBERG, E.; QUEVEDO, S.; TURBÓN, D.; CLEGG, J.B. (1994): DNA from Ancient Easter Islanders. *Nature*, 369: 25-26.
- HOWELL, N.; KUBACKA, I.; MACKAY, D. (1996): How rapidly does the human mitochondrial genome evolve? *American Journal of Human Genetics*, 59: 501-509.
- IZAGUIRRE, 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. *American Journal of Human Genetics*, 65: 199-207.
- KRINGS, M.; STONE, A.; SCHMITZ, R.; KRAINITZKI, H.; STONEKING, M.; PÄÄBO, S. (1997): Neandertal DNA sequences and the origin of the modern humans. *Cell*, 90: 19-30.
- LALUEZA, C.; PÉREZ-PÉREZ, A.; PRATS, E.; CORNUDELLA, L.; TURBÓN, D. (1997): Lack of founding Amerindian mitochondrial DNA lineages in extinct aborigines from Tierra del Fuego-Patagonia. *Human Molecular Genetics*, 6(1), Oxford: 41-46.
- MACAULAY, V.; RICHARDS, V.; HICKEY, E.; VEGA, E.; CRUCIANI, F.; GUIDA, V.; SCOZZARI, R.; BONNÉ-TAMIR, B.; SYKES, B.; TORRONI, A. (1999): The Emerging Tree of West Eurasian mtDNAs: A Synthesis of Control-Region Sequences and RFLPs. *American Journal of Human Genetics*, 64: 232-249.
- PÄÄBO, S. (1996): Mutational hot spots in the mitochondrial microcosm. *American Journal of Human Genetics*, 59: 493-6.
- RAMOS, M.; LALUEZA, C.; GIRBAU, E.; PÉREZ-PÉREZ, A.; TURBÓN, D.; ESTIVILL, X. (1995): Amplifying dinucleotide microsatellite loci from bone and tooth samples of up to 5000 years of age: more inconsistency than usefulness. *Human Genetics*, 96: 205-212.
- OVCHEVNIKOV, L.; GÖTHERSTRÖM, A.; ROMANOVA, P.; KHARITONOV, V.; LIDEN, K.; GOODWIN, W. (2000): Molecular analysis of the neandertal DNA from the northern Caucasus. *Nature*, 404: 490-493.

- RICHARDS, M.; CÔRTE-REAL, H.; FORSTER, P.; MACAULAY, V.; WILKINSON-HERBOTS, H.; DEMAINE, A.; PAPIHA, S.; HEDGES, R.; BANDELT, H.-J.; SYKES, B. (1996): Paleolithic and Neolithic Lineages in the European Mitochondrial Gene Pool. *American Journal of Human Genetics*, 59: 185-203.
- SIGUROARDÓTTIR, S.; HELGASON, A.; GULCGER, J.; STEFANSSON, K.; DONNELLY, P. (2000): The mutation rate in the human Control Region. *American Journal of Human Genetics*, 66: 1599-1609.
- TORRONI, A.; LOTT, M.; CABELL, M.; CHEN, Y.; LAVERGNE, L.; WALLACE, D. (1994): MtDNA and the origin of Caucasians: Identification of Ancient Caucasian-specific Haplogroups, One of Which is Prone to a Recurrent Somatic Duplication in the D-Loop Region. *American Journal of Human Genetics*, 55: 760-776.
- TORRONI, A.; HUOPONEN, K.; FRANCALACCI, P.; PETROZZI, M.; MORELLI, L.; SCOZZARI, R.; OBINU, D.; SAVONTAUS, M.-J.; WALLACE, D. (1996): Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations. *Genetics*, 144: 1835-1850.
- TORRONI, A.; BANDELT, H.; D'URBANO, L.; LAHERMO, P.; MORAL, P.; SELITO, D.; RENGO, C.; FORSTER, P.; SAVONTAUS, M.; BONNÉ-TAMIR, B.; SCOZZARI, R. (1998): MtDNA analysis reveals a major late paleolithic population expansion from Southwestern to Northeastern Europe. *American Journal of Human Genetics*, 62: 1137-1152.
- TURBÓN, D. (1997): DNA antiguo y el origen de los vascos. *Senderos de la Evolución Humana* (Cela-Conde *et al.*, eds.), Coloquio Internacional en Homenaje a Phillip V. Tobias, *Ludus Vitalis*, núm. esp. 1, México.
- VALDÉS, L. (1990): Los primeros objetos de cobre del País Vasco. Consideraciones a la introducción de la metalurgia en el País Vasco. *Kobie*, XVIII: 65-86.
- VALDÉS, L. (1994): *La metalurgia del Cobre y de sus aleados en el Cantábrico y Alto Ebro. IIº y Iº Milenio A.J.C.* Tesis Doctoral nº 2.249. Publicación en Edición Microfotográfica del Servicio de Publicaciones la Universidad de Barcelona.
- VALDÉS, L. (e.p.): El metal alóctono, el metal autóctono. Panorama e interpretación de un avance tecnológico en la prehistoria del país vasco. Academia de las Bellas Letras Catalanas. Barcelona, 1998.
- WILKINSON-HERBOTS, H.; RICHARDS, M.; FORSTER, P.; SYKES, B. (1991): Site 73 in hypervariable region II of the human mitochondrial genome and the origin of European populations. *American Journal of Human Genetics*, 60: 499-508.

ARQUEOBOTÁNICA*

