

El ADN mitocondrial de los cazadores-recolectores de la región cantábrica: nueva evidencia de la cueva de El Mirón (Ramales de la Victoria, Cantabria, España)

HERVELLA M.¹, IZAGIRRE N.¹, GONZÁLEZ-MORALES M.², STRAUS L.G.^{2,3}, FREGEL R.I.⁴ Y DE LA RÚA C.¹

1 Universidad del País Vasco (UPV/EHU), Facultad de Ciencia y Tecnología.
Departamento de Genética, Antropología Física y Fisiología Animal.

2 Instituto Internacional de Investigaciones Prehistóricas de Cantabria.
Universidad de Cantabria, Avda. de los Castros, s/n. 39005 Santander.

3 University of New Mexico, Dept. of Anthropology.
MSC01 1040, Albuquerque, NM 87131-0001 USA.

4 Departamento de Genética; Universidad de La Laguna.
Avda. Astrofísico Francisco Sánchez, 38271. La Laguna, Santa Cruz de Tenerife.

Palabras clave:

ADN antiguo
ADN mitocondrial
Cazadores-recolectores
magdalenienses
Agro-pastoralistas
Región cantábrica

RESUMEN

Se ha analizado la variabilidad del ADN mitocondrial de los restos humanos recuperados de la cueva de El Mirón (Ramales de la Victoria, Cantabria). Aunque se trata de una muestra pequeña, tiene gran importancia para ampliar nuestro conocimiento sobre los grupos de cazadores-recolectores de la región cantábrica. El linaje mitocondrial obtenido en El Mirón, corresponde al rCRS perteneciente al haplogrupo H. Hasta el momento, este linaje mitocondrial solo se ha detectado en otro cazador-recolector procedente de la cueva de la Pasiiega, también en Cantabria; sin embargo sí se ha encontrado en los agropastoralistas de la franja cantábrica y de otras regiones de Europa, lo que nos lleva a proponer que la diversidad del haplogrupo H aumentó a partir del Neolítico.

Recibido: 05-09-2013

Aceptado: 15-06-2014

ABSTRACT

Keywords:

Ancient DNA
Mitochondrial DNA
Magdalenian hunter-gatherers
Agro-pastoralists
Cantabrian region

We have analyzed the mitochondrial DNA variability of human remains recovered from the cave of El Mirón (Ramales de la Victoria, Cantabria). Although this is a small sample, is important to helping to increase our knowledge about hunter-gatherer groups from the Cantabrian region. The mitochondrial lineage of El Mirón, corresponds to rCRS belonging to haplogroup H. So far, only this mitochondrial lineage has been detected in other hunter-gatherer from cave of La Pasiiega, also in Cantabria; however, this lineage has been found in the agro-pastoralist groups from Cantabrian Fringe and other regions of Europe, suggesting an increase in haplogroup H diversity beginning in Neolithic times.

Corresponding author: Montserrat Hervella Afonso
Universidad del País Vasco (UPV/EHU), Facultad de Ciencia y Tecnología.
Departamento de Genética, Antropología Física y Fisiología Animal.
montse.hervella@ehu.es
Tel. 94 6015430
Fax 94 6013145

Introducción

Los estudios de paleogenética o ADN antiguo (ADNa) de muestras humanas prehistóricas permiten reconstruir la historia evolutiva de la especie humana. Los estudios paleogenéticos de las sociedades cazadoras-recolectoras son muy escasos, destacando los realizados en grupos de Escandinavia (Malmström et al. 2009; Skoglund et al. 2012, 2014), Europa Central (Bramanti et al. 2009) y la Península Ibérica (Hervella et al. 2012; Sánchez-Quinto et al. 2012). Estos estudios han puesto de manifiesto la existencia de una gran homogeneidad genética en los grupos pre-Neolíticos a lo largo de Europa, sugiriendo un origen común de todos ellos, al menos para el ADN mitocondrial (ADNmt) (Sánchez-Quinto et al. 2012).

La difusión del Neolítico a partir del Próximo Oriente hace unos 10.000 años, también llamada revolución neolítica, consistió en la transición de un modo de vida cazador-recolector al agro-pastoralista. Dos son las propuestas principales para explicar esta transición: la Difusión Cultural (DC) y la Difusión Démica (DD). Según el modelo de DC, la transición neolítica habría tenido lugar mediante la adopción del sistema agro-pastoralista por los grupos indígenas locales, sin recibir ningún aporte genético (Dennell 1985; Richards et al. 1996; Haak et al. 2005). El modelo de DD propone la existencia de una expansión poblacional desde el Próximo Oriente a Europa, cuya consecuencia fue la asimilación de la variabilidad genética de los grupos indígenas cazadores-recolectores por parte de la comunidad agrícola en expansión (Ammerman y Cavalli-Sforza 1984; Barbujani et al. 1995; Cavalli-Sforza y Minch et al. 1997; Chikhi et al. 1998, 2002).

En los últimos años, los análisis de ADNa de grupos agro-pastoralistas europeos, han constituido una aportación importante a este debate. Por un lado, algunos estudios apoyan la existencia de una ruta de dispersión del Neolítico en el centro y norte de Europa, siguiendo un modelo de DC. Este es el caso del análisis del ADNmt de restos antropológicos de los primeros agricultores neolíticos de Europa central (7.5 - 7 kya) (Haak et al. 2005, 2010), cuyos resultados apoyan esta idea al haberse detectado en este grupo neolítico una elevada frecuencia del linaje mitocondrial N1a (15%), ausente en los grupos de cazadores-recolecto-

res de esta misma región (Bramanti et al. 2010) y casi inexistente en la población europea actual (0.2%) (Haak et al. 2010). Posteriores estudios sobre otros yacimientos neolíticos europeos, apoyaron asimismo este planteamiento, al encontrar una elevada frecuencia del haplogrupo N, en un yacimiento del norte de Francia (Deguilloux et al. 2011), otro de Hungría (Guba et al. 2011) y en tres yacimientos neolíticos del nordeste de la Península Ibérica (Aragón y Cataluña) (Gamba et al. 2012).

Por otro lado, otros autores apoyan el modelo de DD para explicar la dispersión del Neolítico en la región mediterránea de Europa. El análisis del ADNmt del yacimiento neolítico de Camí de Can Grau de la región mediterránea de la Península Ibérica (Cataluña, 5.5 - 5 kya) (Sampietro et al. 2007), mostró unos resultados diferentes a los obtenidos en otras regiones europeas (Haak et al. 2005, 2010; Gamba et al. 2012; Guba et al. 2011). La ausencia del linaje N1a en el yacimiento neolítico de Camí de Can Grau y la presencia de linajes mitocondriales característicos de las poblaciones actuales de la Península Ibérica y de la zona mediterránea de Europa, llevó a proponer un modelo de DD para explicar el fenómeno de la neolitización en la Europa mediterránea (Sampietro et al. 2007).

De igual forma, el estudio de la variabilidad del ADNmt de 29 individuos de la Grotte I de Treilles (Aveyron) de la zona mediterránea de Francia (5 kya) (Lacan et al. 2011), apoyó el modelo de DD para esta región mediante argumentos semejantes a los expuestos en el caso de Camí de Can Grau, es decir, la semejanza genética de este grupo neolítico con las poblaciones actuales de la región mediterránea de Europa y la ausencia del linaje N1a.

En un reciente estudio se ha analizado 47 individuos agrupados según su modo de subsistencia en: cazadores-recolectores (n = 4) [La Chora (Cantabria), La Pasiiega (Cantabria), Erralla (Guipúzcoa) y Aizpea (Navarra)] y agro-pastoralistas (n = 43) [Los Cascajos (Navarra), Paternanbidea (Navarra), Marizulo (Guipúzcoa) y Fuente Hoz (Álava)]. Estos ocho yacimientos se localizan en el norte de la Península Ibérica (País Vasco, Navarra y Cantabria) y su cronología abarca desde el Paleolítico Superior (Magdalenense) al Calcolítico. El análisis de la variabilidad mitocondrial

obtenida y la ausencia del linaje N1a, permitieron sugerir un modelo de dispersión aleatoria de los agricultores neolíticos por Europa, no clinal, con diferente influencia en las distintas regiones geográficas; desestimándose por tanto, los modelos de reemplazamiento y DC, propuestos para explicar el fenómeno de la neolitización en Europa (Hervella et al. 2012).

En el presente estudio se ha llevado a cabo el análisis de los restos humanos recuperados de la cueva de El Mirón (Ramales de la Victoria, Cantabria). Aunque se trata de una muestra pequeña, tiene gran importancia para ampliar nuestro conocimiento sobre las poblaciones cazadoras-recolectoras de la región cantábrica y su implicación en el proceso de cambio del modo de subsistencia en esta región (Straus y González-Morales, 2012).

Material y Métodos

Material

La cueva de El Mirón se localiza al Este de Cantabria, en el Valle del río Asón, a 260 m de altitud y unos 20 km de la costa actual en Santoña, y viene siendo excavada desde 1996 por Straus y González Morales. El yacimiento ha proporcionado un registro arqueológico abundante, con una secuencia estratigráfica con niveles asignados al Musteriense, Paleolítico Superior Inicial, Solutrense, Magdaleniense, Aziliense, Mesolítico, Neolítico, Calcolítico y Edad de Bronce (Straus y González-Morales, 2012). Los restos humanos se encontraron en diversos niveles, cuya datación radiocarbónica ofreció un rango aproximado entre 15.500 y 11.950 B.P. Dichos vestigios estaban asociados a escasas evidencias culturales características del Magdaleniense y a restos de fauna dominados por el ciervo y la cabra montés.

Los materiales paleantropológicos recuperados en la cueva de El Mirón en las primeras campañas de los años 1990 corresponden a cinco restos dentarios, de los cuales solamente dos presentaban una conservación aceptable para su análisis genético, identificándose ambos casos como primeros premolares superiores, derecho e izquierdo (14 y 24). En concreto, los dientes

humanos incluidos en el presente estudio fueron recuperados en la campaña de 1996 en el nivel 104, correspondiente al Magdaleniense Medio. La datación directa por radiocarbono (AMS) de la pieza sometida a análisis de ADNmt, recogida en el cuadro V7, subcuadro A, tramo 4, con número de inventario V7-20.2, arroja una fecha de 14.120±35 BP (UGAMS-15261), con un δC^{13} de -18.8‰.

Métodos

El estudio realizado ha consistido en la extracción y análisis del ADN mitocondrial (ADNmt) teniendo en cuenta las precauciones habituales en los estudios de ADN para evitar la posible contaminación: 1) la extracción del ADN y la preparación de la amplificación, se han realizado en una cámara estéril con presión positiva, donde nunca se ha trabajado con ADN humano de muestras actuales, 2) se ha mantenido la esterilidad del material de investigación y las superficies de trabajo dedicadas exclusivamente al análisis con ADN, mediante el tratamiento de forma rutinaria con lejía e irradiación ultravioleta y 3) siempre se ha usado una vestimenta adecuada durante el proceso de análisis del ADN: gorro, guantes, bata y mascarilla de un solo uso.

Asimismo, con el fin de eliminar la contaminación superficial de las piezas dentarias, éstas se sometieron a un proceso de limpieza mediante ácidos e irradiación ultravioleta (Ginther et al. 1992; Izagirre y de la Rúa, 1999, Alzualde et al. 2005). Tras esta descontaminación, cada uno de los dientes fue serrado a nivel cervical y los dos fragmentos del diente resultantes se incubaron con agitación durante 2 horas a 56 °C en un tampón de lisis, con el fin de realizar una descalcificación e hidrólisis de los posibles restos proteicos y lipídicos. El ADN se aisló de los restos celulares mediante una extracción orgánica con fenol-cloroformo. El ADN aislado se concentró y purificó, mediante Centricon-30 (Amicon). En cada tanda de extracción se incluyeron al menos dos blancos de extracción, que consisten en tubos que son sometidos a todo el proceso de extracción pero en los que no se añade tejido dentario.

A partir de los extractos de ADN obtenidos, se llevó a cabo la secuenciación del Segmento Hiperva-

riable I (HVS-I) del ADNmt, mediante la amplificación de seis fragmentos solapantes de aproximadamente 100 pb de longitud cada uno, de modo que finalmente se obtiene la secuencia completa comprendida entre los nucleótidos 15.995 y 16.399 (Alonso et al. 2003). Asimismo, se determinó la posición nucleotídica 73 del HVS-II del ADNmt, mediante secuenciación.

Cada fragmento, se amplificó en PCRs independientes. Tras la purificación enzimática (ExoSap-IT, USB Corporation) de los productos amplificados, se llevó a cabo la reacción de secuenciación (kit BigDye 1.1 Terminator Cycle Ready Reaction, Applied Biosystems). Los productos de la reacción de secuenciación purificados (columnas AutoSeq™ G-50, GE Healthcare) y desnaturalizados (HI-DI Formamida, Applied Biosystem), se migraron en un secuenciador automático ABI PRISM 310. La edición de las secuencias se llevó a cabo mediante el programa BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>), comparándolas con la secuencia de referencia (*revised Cambridge Reference Sequence* rCRS, Andrews et al. 1999).

Por otro lado, se realizó la determinación de los polimorfismos de la región codificante del ADNmt mediante PCR-RFLPs, con el fin de clasificar la variabilidad del ADNmt en los 10 principales haplogrupos caucasoides (Torroni et al. 1996; Macaulay et al. 1999). Para ello, se amplificaron fragmentos de aproximadamente 120 pb de longitud que incluían la posición nucleotídica polimórfica y posteriormente se realizó la digestión enzimática de estos fragmento, con el fin de determinar el nucleótido polimórfico (Izagirre y de la Rúa, 1999; Izagirre et al. 2005; Alzualde et al. 2005).

Dada la escasez de restos antropológicos recuperados en la cueva de El Mirón, la autenticación de los resultados propuesta por la comunidad científica (Cooper y Poniar 2000; Gilbert y Willerslev 2006) se ha visto limitada a los siguientes criterios:

- *Cuantificación del número de moléculas amplificables del ADNmt en los extractos mediante PCR cuantitativa (qPCR)*, con el fin de valorar el estado de preservación del ADN y planificar la metodo-

logía más adecuada a la hora de autenticar los resultados (Alonso et al. 2004).

- Se ha confirmado *la correlación entre los polimorfismos de la región control y los de la región codificante del ADNmt*, que definen los haplogrupos mitocondriales de los individuos analizados en este estudio.

- En todas las PCRs, se han incluido al menos *dos blancos de extracción y varios controles negativos de la PCR*, con el fin de determinar la existencia de contaminación tanto en la fase de extracción como en la de amplificación del ADN.

- *Reproducibilidad del resultado*, se ha realizado la amplificación de forma repetida a partir de la misma y de diferentes alícuotas del extracto de ADN recuperado, siendo en todos los casos las secuencias obtenidas coincidentes.

- Los resultados obtenidos en este estudio han sido replicados en un laboratorio independiente (Universidad de La Laguna, Tenerife). La replicación ha consistido en el análisis de la secuencia del *HVS-I* y la clonación de la misma.

- *Se han clonado los productos de PCR correspondientes al HVS-I* de la muestra analizada, de los cuales se seleccionaron entre 15-20 clones por producto de PCR, que posteriormente fueron secuenciados. Con los resultados obtenidos se determinó el grado de coincidencia entre la secuencia consenso de los clones y la secuencia obtenida mediante la secuenciación directa. Se desestimó una media de 10.36 mutaciones por fragmento clonado (~100 pb), ya que estas mutaciones se encontraron de forma puntual en diferentes clones. Estas mutaciones se han interpretado como artefactos producidos por el daño post-mortem del ADN.

- *Se han determinado las secuencias del HVS-I y HVS-II del ADNmt de los investigadores que manipularon los restos* en el laboratorio de Antropología de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU) (Tabla 1).

Tabla 1: Haplotipo mitocondrial (HVS-I y HVS-II) de los investigadores que han manipulado las muestras antropológicas en el laboratorio de Antropología de la UPV/EHU

Investigador	Mutaciones del HVS-I	Mutaciones del HVS-II
Invest. #1	16189	263G-315.1C
Invest. #2	16092-16224-16311	73G-146C-263G-315.1C

Los resultados analíticos de las muestras recuperadas en la cueva de El Mirón, fueron evaluados en conjunto con el resto de cazadores-recolectores de la región cantábrica (Hervella et al. 2012; Sánchez-Quinto et al. 2012), con el fin de obtener información sobre la diversidad genética de este grupo humano (Nei, 1987).

Por último, se ha realizado la reconstrucción filogenética de los haplotipos mitocondriales pertenecientes al haplogrupo H (haplogrupo portado por el individuo del El Mirón) de los grupos cazadores-recolectores y neolíticos de la región cantábrica y de Europa (Hervella et al., 2012, Gamba et al., 2012; Guba et al. 2011; Deguilloux et al. 2011; Lacan et al. 2011; Bramanti et al. 2009; Malmström et al. 2009, Sampietro et al. 2007; Haak et al. 2005; 2010), utilizando el programa de libre distribución Network v 4.21, disponible en <http://www.fluxus-engineering.com>.

Resultados

El ADNmt de la cueva de El Mirón en el contexto de los grupos cazadores-recolectores europeos

Debido al deficitario estado de conservación de las piezas dentarias de El Mirón, solo ha sido posible obtener ADN en uno de los dientes, el primer premolar superior derecho (14), recuperado, como antes se señalaba, en un nivel atribuible al Magdaleniense medio. Los datos resultantes del ADNmt del individuo de El Mirón se describen en la Tabla 2, donde se indica el haplotipo y haplogrupo mitocondrial. La variabilidad del ADNmt resultante de la muestra de El Mirón se ha clasificado dentro del haplogrupo H, cuyo linaje corresponde al haplotipo rCRS, que en el presente estudio se ha denominado como ht2 (Tabla 2).

Los datos del ADNmt de los individuos cazadores-recolectores de la región cantábrica existentes has-

ta el momento (El Mirón, La Pasiega, La Chora, Erralla, Aizpea y La Braña) (Hervella et al. 2012; Sánchez-Quinto et al. 2012), constituyen una limitada muestra, en la que se observa una gran diversidad haplotípica [5 linajes mitocondriales diferentes obtenidos de 6 individuos (0.9833 ± 0.1217)], que no obstante se clasifica en solo dos haplogrupos diferentes: H y U5 (Figura 1, Tabla 2).

El haplotipo mitocondrial del individuo de El Mirón se ha encontrado asimismo en la cueva de La Pasiega (Puente Viesgo, Cantabria). Sin embargo, el resto de los individuos cazadores-recolectores de esta región, La Chora (Cantabria), Erralla (Gipuzkoa), Aizpea (Navarra) y La Braña (León), son portadores de otros haplotipos mitocondriales diferentes (Hervella et al. 2012; Sánchez-Quinto et al. 2012). La Chora presenta el haplotipo ht24 clasificado dentro del haplogrupo H6, Erralla el haplotipo ht21 que pertenece al haplogrupo U5, Aizpea presenta el haplotipo ht25 perteneciente al haplogrupo U5 y La Braña presenta el haplotipo ht26 clasificado dentro del haplogrupo U5 (Figura 1, Tabla 2).

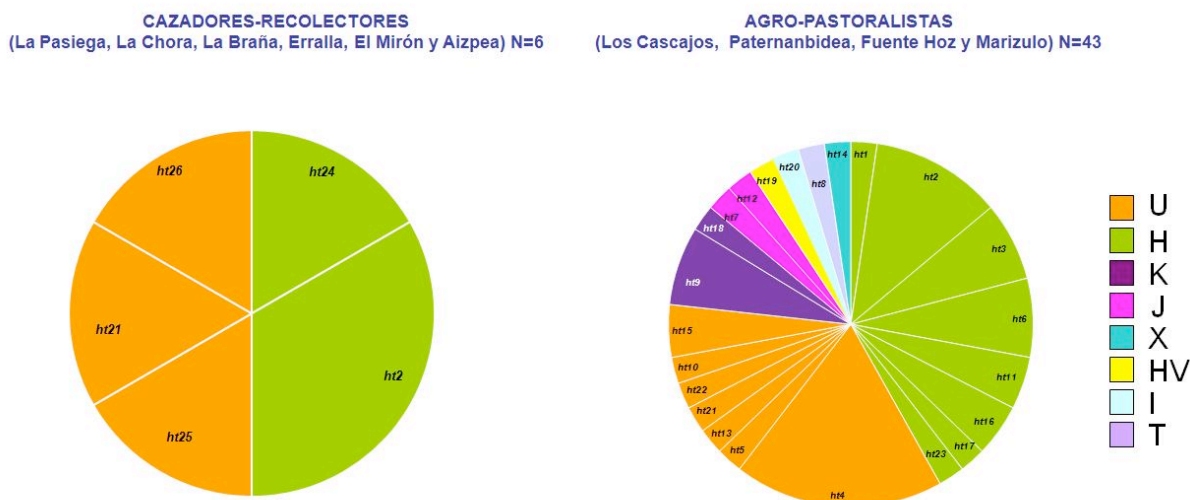
En los grupos cazadores-recolectores de finales del Paleolítico Superior de Centro Europa ($n = 22$) y Escandinavia ($n = 19$) (Bramanti et al. 2009; Malmström et al. 2009; Skoglund et al. 2012; 2014) no se ha encontrado ningún individuo que presente el haplotipo ht2 descrito en El Mirón (y en La Pasiega), ni tampoco se han encontrado los haplotipos obtenidos en La Chora, Aizpea y La Braña (pertenecientes a los haplogrupos H6 y U5) (Tabla 2). Sin embargo en los cazadores-recolectores europeos sí se ha hallado el haplotipo mitocondrial descrito en Erralla (ht21, haplogrupo U5) (Figura 1, Tabla 2).

En los cazadores-recolectores de la región cantábrica encontramos un 50% del haplogrupo H y un 50% del haplogrupo U (todos U5) (Tabla 2), si bien estas frecuencias hay que considerarlas como provisionales, dado el pequeño tamaño muestral ($n = 6$). En los cazadores-recolectores europeos, las frecuencias son de un 68% para el haplogrupo U (de ellos el 71% pertenece al subhaplogrupo U5), 4.8% para el haplogrupo H y un 27.2% del resto de haplogrupos, lo que pone de manifiesto la preponderancia del U5 entre todos los cazadores-recolectores. También cabe desta-

Tabla 2: Grupos cazadores-recolectores de la región cantábrica: Haplotipo y haplogrupo mitocondrial de la cueva de El Mirón basado en las mutaciones del HVS-I, HVS-II y de la región codificante del ADNmt, junto con los datos tomados de la bibliografía (Hervella et al. 2012; Sánchez-Quinto et al. 2012)

Yacimiento	Mutaciones de la región codificante	Mutaciones del HVS-I y HVS-II	Haplotipo	Haplogrupo
El Mirón (Cantabria)	-14766MseI;-7025AluI	rCRS	ht2	H
La Pasiega (Cantabria)	-14766MseI;-7025AluI	rCRS	ht2	H
La Chora (Cantabria)	-14766MseI;-7025AluI	16093-16362	ht24	H6
Erralla (Guipúzcoa)	+7025AluI;+9052HaeII; +12308HinfI	16270	ht21	U5
Aizpea (Navarra)	+7025AluI;+9052HaeII; +12308HinfI	16051-16093-16189- 16192-1270	ht25	U5b1
La Braña (León)	+7025AluI;+9052HaeII; +12308HinfI	16169-16126-16192- 16270	ht26	U5b2c1

Figura 1: Distribución de frecuencias de los haplotipos y haplogrupos mitocondriales en los individuos cazadores-recolectores y agro-pastoralistas de la región cantábrica



car la elevada diversidad existente entre los cazadores-recolectores analizados hasta el momento, ya que se han hallado 27 haplotipos mitocondriales diferentes en 47 individuos (0.9611 ± 0.0133).

El ADNmt de la cueva de El Mirón en el contexto de los grupos agro-pastoralistas europeos

Hasta el presente en la región cantábrica, se ha estudiado la variabilidad del ADNmt en cuatro yacimientos de grupos agro-pastoralistas, Los Cascajos

(Navarra), Paternanbidea (Navarra), Fuente Hoz (Álava) y Marizulo (Guipúzcoa), obteniéndose 23 haplotipos mitocondriales diferentes provenientes de 43 individuos (Figura 1, Tabla 3) (Hervella et al. 2012). En este conjunto de individuos agro-pastoralistas, el ht2 presenta una frecuencia de 11.6%, que es el linaje encontrado en el individuo de la cueva de El Mirón (y en La Pasiega).

Otro haplotipo descrito en cazadores-recolectores de la región cantábrica (Erralla) y que a su vez se encuentra en esta muestra de agro-pastoralistas, es el

linaje ht21 perteneciente al haplogrupo U5 (2.3%) (Figura 1, Tabla 3). El resto de linajes descritos en cazadores-recolectores de la región cantábrica (ht24 en La Chora, ht25 en Aizpea y ht26 en La Braña) no se ha encontrado en los individuos agro-pastoralistas de esta misma región (Figura 1, Tabla 3).

Dentro de la variabilidad mitocondrial presentada por los grupos agro-pastoralistas europeos publicados hasta el momento (N = 166), recuperados en yacimientos de Alemania, Escandinavia, Hungría, Alpes, Francia y Noreste de la Península Iberica (Haak et al. 2010; Malmstrom et al. 2009; Guba et al, 2011; Lacan et al. 2011; Deguilloux et al, 2011; Hervella et al. 2012; Gamba et al. 2012; Sampietro et al. 2007), el linaje ht2 del individuo analizado de El Mirón presenta

una frecuencia del 12.6%. Sin embargo, el resto de los haplotipos mitocondriales encontrados en los cazadores-recolectores de la región cantábrica no se han encontrado entre los grupos agro-pastoralistas europeos.

Diversidad del haplogrupo H en los grupos prehistóricos

El haplotipo mitocondrial de El Mirón (ht2) pertenece al haplogrupo H, por lo que hemos considerado interesante analizar la composición de haplotipos incluidos en el haplogrupo H de todos los grupos de cazadores recolectores y neolíticos tanto de la región cantábrica como de Europa, de las que se disponen datos hasta el momento (N = 213), mediante un net-

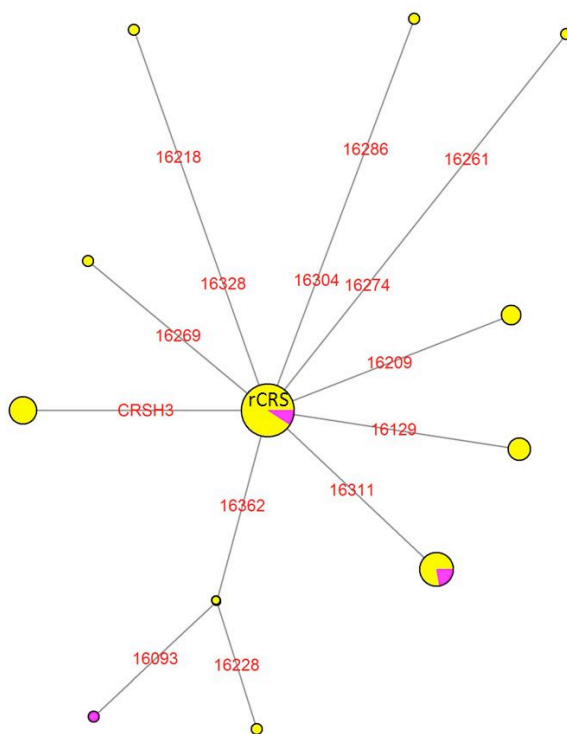
Tabla 3: Grupos agro-pastoralistas de la región cantábrica: Haplotipo y haplogrupo mitocondrial basado en las mutaciones del HVS-I, HVS-II y de la región codificante del ADNmt de los individuos recuperados de los yacimientos de Paternabidea (Navarra), Los Cascajos (Navarra), Fuente Hoz (Álava) y Marizulo (Guipúzcoa) (tomados de Hervella et al. 2012)

HT	HVS-I y HVS-II	N	Región codificante	HG	%
ht1	rCRS-73	1	-147 66MseI; -7025AluI	H	41.9
ht2	rCRS	5	-147 66MseI; -7025AluI	H	
ht3	73-146-263-285-309.1C-310.1T-312-313	3	-147 66MseI; -7025AluI	H	
ht6	16129	3	-147 66MseI; -7025AluI	H	
ht11	16311	2	-147 66MseI; -7025AluI	H	
ht16	16209	2	-14766MseI; -7025AluI; -6776Tsp509I	H3	
ht17	16092-16311	1	-14766MseI; - 7025AluI	H	
ht23	16093	1	-14766MseI; - 7025AluI	H	
ht4	73-146-263-285-309.1-310.1-312-313	8	+7025AluI; +9052HaeII; +12308Hinfl	U	
ht5	16278-16311	1	+7025AluI; +9052HaeII; +12308Hinfl	U	
ht13	16270-16311	1	+7025AluI; +9052HaeII; +12308Hinfl	U5	
ht21	16270	1	+7025AluI; +9052HaeII; +12308Hinfl	U5	
ht22	16192-16270	1	+7025AluI; +9052HaeII; +12308Hinfl	U5a	
ht10	16163	1	+7025AluI; +9052HaeII; +12308Hinfl	U	
ht15	16365	2	+7025AluI; +9052HaeII; +12308Hinfl	U	
ht9	16224-16311	3	+7025AluI; +9052HaeII; -12308Hinfl	KIa	9.3
ht18	16092-16224-16311	1	+7025AluI; +9052HaeII; -12308Hinfl	K	
ht7	16069-16126-16195	1	+7025AluI; +9052HaeII; +12308Hinfl	J	4.6
ht12	16069-16129	1	+7025AluI; +9052HaeII; +12308Hinfl	J	
ht19	16311	1	+7025AluI; -14766MseI; +4577NlaIII	HV	2.3
ht20	16129-16233	1	-1715DdeI; + 10032AluI	I	2.3
ht8	16126-16294-16296	1	-7025AluI; -14766MseI; +4216NlaIII	T2	2.3
ht14	16183-16189-16233-16278	1	-1715DdeI; +14465AccI	X	2.3

work. En el network generado, el ht2 (rCRS) se encuentra mayoritariamente en individuos neolíticos (12.6%) y solamente en dos individuos cazadores-recolectores (El Mirón y La Pasiega) (Figura 2).

Dentro del haplogrupo H encontramos otro linaje mitocondrial que, al igual que el linaje ht2, es portado por cazadores-recolectores y neolíticos europeos (Figura 2). Este linaje viene definido por la mutación 16311 y se ha encontrado en dos individuos cazadores-recolectores de Escandinavia y en diversos individuos neolíticos europeos (Figura 2). Sin embargo, el linaje ht24 encontrado en La Chora (definido por las mutaciones 16093-16362) que también pertenece al haplogrupo H, no se ha encontrado en ningún individuo prehistórico analizado hasta el momento, ni cazador-recolector, ni neolítico.

Figura 2: Median Joining Network realizado a partir de las secuencias del HVS-I (np 15999-16399) de todos los individuos cazadores recolectores y neolíticos tanto de la región cantábrica como europeos, pertenecientes al haplogrupo H. Secuencias correspondientes a individuos neolíticos en amarillo y a cazadores-recolectores en rosa (incluido el individuo de El Mirón)



El ADNmt de la cueva de El Mirón en el contexto de las poblaciones europeas actuales

Si analizamos el linaje mitocondrial ht2 obtenido de la cueva de El Mirón en el contexto de la población actual de la región cantábrica, observamos que este linaje presenta una frecuencia del 22% (García et al. 2011), por lo que permite suponer que la frecuencia de este linaje ha aumentado desde el Magdalenense hasta la actualidad. Sin embargo, no ocurre lo mismo en el caso del linaje ht24 (perteneciente al haplogrupo H6) presente en la cueva de La Chora, que es muy poco frecuente en la población actual de esta región y en Europa (0.8%) (Martínez-Cruz et al. 2012). En el caso de los haplotipos ht21, ht25 y ht26 (de Erralla, Aizpea y La Braña), pertenecientes al haplogrupo U5, solo se han encontrado el ht21 y el ht25 en la población europea actual aunque con unas frecuencias muy bajas de 0.19% y 0.5% respectivamente, siendo más frecuentes estos haplotipos en la región del norte de Europa (Van Oven y Kayser, 2009). Estos datos indican que los haplotipos mitocondriales encontrados entre los cazadores-recolectores de la región cantábrica persisten en las poblaciones actuales (excepto el ht26 de La Braña), aunque con unas frecuencias muy bajas.

Discusión

Los cazadores-recolectores de la región cantábrica y de otras regiones de Europa, presentan elevadas frecuencias del haplogrupo U5 (50% y 71%, respectivamente), sin embargo los haplotipos mitocondriales incluidos en este haplogrupo son diferentes en ambas regiones (Hervella et al. 2012; Sánchez-Quinto et al. 2012; Malmström et al. 2009; Skoglund et al. 2012, 2014; Bramanti et al. 2009). De esta forma, solo el haplotipo ht21 de Erralla es compartido por los cazadores-recolectores europeos (Escandinavia, Malmström et al. 2009; Skoglund et al. 2012, 2014), mientras que los haplotipos ht25 y ht26 de Aizpea y La Braña, no se han encontrado en ningún cazador-recolector europeo. Respecto al haplogrupo H, el otro haplogrupo más frecuente en los cazadores-recolectores de la región cantábrica, presenta una frecuencia en los cazadores-recolectores europeos de 4.8% (Hervella et al. 2012). El haplotipo ht2 encontrado en El Mirón (rCRS) no se ha hallado en ningún cazador-recolector

europeo (excepto en la cueva cántabra de La Pasiega). No obstante, estos datos hay que analizarlos con precaución, dado el pequeño tamaño muestral que se maneja para la región cantábrica.

Dada la frecuencia predominante del haplogrupo U5 en los grupos cazadores-recolectores analizados hasta el momento, podemos sugerir un origen común de todos ellos, que a tenor de la fecha de coalescencia de este haplogrupo, estaría en torno a ≈ 37.000 años (Soares et al. 2009, 2010). No obstante, son muy pocos los haplotipos mitocondriales compartidos entre la muestra de cazadores-recolectores de la región cantábrica y la de otras regiones de Europa, lo que parece indicar la existencia de una gran diversidad mitocondrial generada a lo largo del Paleolítico.

El hecho de encontrar el mismo haplotipo mitocondrial (ht2) en los sujetos de El Mirón y La Pasiega, permite sugerir que la frecuencia de este haplotipo en la región cantábrica durante el Paleolítico sería elevada, lo que marcaría una diferencia con respecto a otros cazadores-recolectores europeos (donde este haplotipo se encuentra ausente).

Por otro lado, el ht2 (rCRS) de El Mirón, presenta una frecuencia considerable entre los grupos agro-pastoralistas de la región cantábrica (11.6%) (Tabla 3), lo que permite sugerir la existencia de una continuidad de este linaje mitocondrial paleolítico en el Neolítico, al menos para la región cantábrica. En otras regiones europeas, la frecuencia del linaje ht2 en los grupos agro-pastoralistas es de 12.6%, lo que podría atribuirse al aporte genético de los grupos procedentes del Próximo Oriente que se dispersaron durante el Neolítico en Europa, dado que este linaje no se ha encontrado hasta el momento en ningún cazador-recolector de las mismas regiones europeas. Esta idea viene apoyada por el análisis de network realizado a partir de todos los haplotipos mitocondriales que forman el haplogrupo H, considerando los cazadores-recolectores y agro-pastoralistas, tanto de la región cantábrica como de otras regiones europeas (Figura 2). En este análisis se observa que la mayor parte de la diversidad del haplogrupo H se encuentra en individuos neolíticos, compartiendo con los cazadores-recolectores únicamente el haplotipo rCRS (de El Mirón y La Pasiega) y

el haplotipo definido por la mutación 16311 (presente en dos individuos cazadores-recolectores de Escandinavia). Este mismo análisis apoya la idea de la continuidad del linaje de El Mirón durante el Neolítico, dado que su haplotipo es compartido en el nodo central con otros individuos neolíticos (Figura 2).

El otro linaje mitocondrial del haplogrupo H encontrado en La Chora, definido por las mutaciones 16093-16362, aparece como un haplotipo único en el network (Figura 2), no compartido con ningún cazador-recolector ni agro-pastoralista. Sin embargo, este linaje se encuentra en las poblaciones actuales de la región cantábrica con un frecuencia del 0.8% (Martínez-Cruz et al. 2012), lo que indica su persistencia hasta la actualidad, aunque con frecuencias muy bajas.

El análisis del ADNmt de los cazadores-recolectores de la región cantábrica, ha permitido detectar la existencia de un linaje mitocondrial (rCRS) perteneciente al haplogrupo H (ht 2), lo que es congruente con la edad de coalescencia estimada para el haplogrupo H (≈ 27000 años) (Soares et al. 2009, 2010), aunque hasta ahora este haplotipo mitocondrial no se había descrito en otros grupos cazadores-recolectores de Europa. Sin embargo, este linaje aparece en los agro-pastoralistas de la región cantábrica y de otras regiones de Europa con una frecuencia semejante (11.6% y 12.6%, respectivamente), produciéndose un aumento de la diversidad del haplogrupo H a partir del Neolítico (Figura 2). En la actualidad, el linaje rCRS, que es el linaje mitocondrial encontrado en El Mirón, es el más frecuente en Europa.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido realizado gracias a la financiación recibida del Ministerio de Ciencia e Innovación (CGL-2011-29057), Grupos de Investigación del Sistema Universitario Vasco del Gobierno Vasco (IT542-10) y Unidades de Formación e Investigación de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU) (UF111/09). La datación del diente de El Mirón ha sido financiada por la *Stone Age Research Fund* (Jean y Ray Auel, donantes principales).

Bibliografía

- Alonso A., Martín P., Albarrán C., García P., García O., de Simón L.F., García-Hirschfeld J., Sancho M., de la Rúa C. y Fernández-Piqueras J. (2003) Multiplex-PCR of short amplicons for mtDNA sequencing from ancient DNA. *International Congress Series* 1239: 585-588.
- Alonso A., Albarrán C., Martín P., García P., García O., de la Rúa C., Alzualde A., Fernández de Simón L., Sancho M. y Fernández-Piqueras J. (2004): Real-time PCR designs to estimate nuclear and mitochondrial DNA copy number in forensic and ancient DNA studies. *Forensic. Sci. Int.* 139: 141-49.
- Alzualde A, Izagirre N, Alonso S, Alonso A y de la Rúa C (2005) Temporal mitochondrial DNA variation in the Basque Country: influence of post-Neolithic events. *Ann. Hum. Genet.* 69: 665-679.
- Ammerman A.J. y Cavalli-Sforza L. L. (1984) *The Neolithic Transition and the Genetics of Populations in Europe*, Princeton: Princeton University Press.
- Andrews R.M., Kubacka I., Chinnery P. F., Lightowlers R. N., Turnbull D. M. y Howell N. (1999) Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat. Genet.* 23: 147.
- Barbujani G., Sokal R.R. y Oden N.L. (1995) Indo-European origins: a computer-simulation test of five hypotheses. *Am. J. Phys. Anthropol.* 96: 109-132.
- Bramanti B., Thomas M.G., Haak W., Unterlaender M., Jores P., Tambets K., Antanaitis-Jacobs I., Haidle M.N., Jankauskas R., Kind C.J., Lueth F., Terberger T., Hiller J., Matsumura S., Forster P. y Burger J. (2009) Genetic discontinuity between local hunter-gatherers and Central Europe's first farmers. *Science* 326: 137-140.
- Cavalli-Sforza L.L. y Minch E. (1997) Paleolithic and Neolithic lineages in the European mitochondrial gene pool. *Am. J. Hum. Genet.* 61: 247-254.
- Chikhi L., Destro-Bisoli G., Bertorelle G., Pascali V. y Barbujani G. (1998) Clines of nuclear DNA markers suggest a largely neolithic ancestry of the European gene pool. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 95: 9053-9058.
- Chikhi L., Nichols R.A., Barbujani G. y Beaumont M.A. (2002) Y genetic data support the Neolithic demic diffusion model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99: 11008-11013.
- Cooper A. y Poinar H.N. (2000) Ancient DNA: do it right or not at all. *Science* 289: 1139.
- Deguiloux M.F., Soler L., Pemonge M.H., Scarre C., Jousaume R. y Laporte L. (2011) News from the west: ancient DNA from a French megalithic burial chamber. *Am. J. Phys. Anthropol.* 144: 108-118.
- Dennell R.W. (1985) Neolithic Advances: The Neolithic Transition and the Genetics of Populations in Europe. *Science* 227: 1331.
- Gamba C., Fernández E., Tirado M., Deguiloux M.F., Pemonge M. H., Utrilla P., Edo, M., Molist M., Rasteiro R., Chikhi L. y Arroyo-Pardo E. (2012) Ancient DNA from an Early Neolithic Iberian population supports a pioneer colonization by first farmers. *Molec. Ecol.* 21: 45-56.
- García O., Fregel R., Larruga J.M., Fregel R., Larruga J. M., Álvarez V., Yurrebaso I., Cabrera V. M. y González A. M. (2011) Using mitochondrial DNA to test the hypothesis of a European post-glacial human recolonization from the Franco-Cantabrian refuge. *Heredity* 106: 37-45.
- Gilbert M.T. y Willerslev E. (2006) Authenticity in ancient DNA studies. *Medicina nei secoli* 18: 701-723.
- Ginther C., Issel-Tarver L. y King M.C. (1992) Identifying individuals by sequencing mitochondrial DNA from teeth. *Nat. Genet.* 2: 135-38.
- Guba Z., Hadadi É., Major Á., Furka T., Juhász E., Koós J., Nagy K. y Zeke, T. (2011) HVS-I polymorphism screening of ancient human mitochondrial DNA provides evidence for N9a discontinuity and East Asian haplogroups in the Neolithic Hungary. *J. Hum. Genet.* 56: 784-789.
- Haak W., Forster P., Bramanti B., Matsumura S., Brandt G., Tanzer M., Vilems R., Renfrew C., Gronenborn D., Alt K.W. y Burger J. (2005) Ancient DNA from the first European farmers in 7500-year-old Neolithic sites. *Science* 310: 1016-1018.
- Haak W., Balanovsky O., Sánchez J.J., Koshel S., Zaporozhchenko V., Christina J., Adler C., Der Sarkissian S. I., Brandt G., Schwarz C., Nicklisch N., Dresely V., Fritsch B., Balanovska E., Vilems R., Meller H., Alt K., Cooper A. y Genographic Consortium. (2010) Ancient DNA from European early neolithic farmers reveals their near eastern affinities. *PLoS Biology* 8: e1000536.
- Hervella M., Izagirre N., Alonso S., Fregel R., Alonso A., Cabrera V.M. y de la Rúa C. (2012) Ancient DNA from hunter-gatherer and farmer groups from Northern Spain supports a random dispersion model for the Neolithic expansion into Europe. *Plos One* 7: e34417.
- Izagirre N. y 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: 199-207.
- Izagirre N., Alzualde A., Alonso S., Paz L., Alonso A. y de la Rúa C. (2005) Rare haplotypes in mtDNA: applications in the analysis of biosocial aspects of past human populations. *Hum. Biology* 77: 443-456.
- Lacan M., Keyser C., Ricaut F.X., Brucato N., Duranthon F., Duranthon F., Guilaine J., Eric Crubézy E. y Ludes B. (2011) Ancient DNA reveals male diffusion through the Neolithic Mediterranean route. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 108: 9788-9791.
- Macaulay V., Richards M., Hickey E., Vega E., Cruciani F., Guida V., Scozzari R., Bonnè-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: 232-49.
- Malmström H., Gilbert M. T., Thomas M.G., Brandstrom M., Stora J., Molnar P., Andersen P. K., Bendixen C., Holmlund G., Gotherstrom A. y Willerslev, E. (2009) Ancient DNA reveals lack of continuity between neolithic hunter-gatherers and contemporary Scandinavians. *Current Biology* 19: 1758-1762.
- Martínez-Cruz B., Harmant C., Platt D.E., Haak W., Manry J., Ramos-Luis E., Soria-Hernanz D.F., Bauduer F., Salaberria J., Oyharçabal B., Quintana-Murci L., Comas D. y Genographic

- Consortium (2012) Evidence of Pre-Roman Tribal Genetic Structure in Basques from Uniparentally Inherited Markers. *Mol. Biol. Evol.* 29: 2211–22.
- Nei N. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press: New York.
- Richards M., Corte-Real H., Forster P., Macaulay V., Wilkinson-Herbots H., Demaine A., Papiha S., Hedges R., Bandelt H. J. y Sykes, B. (1996) Paleolithic and neolithic lineages in the European mitochondrial gene pool. *Am. J. Hum. Genet.* 59: 185-203.
- 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., Scozzari, R., Torroni A. y Bandelt H. J. (2000) Tracing European founder lineages in the Near Eastern mtDNA pool. *Am. J. Hum. Genet.* 67: 1251-1276.
- Sampietro M. L., Lao O., Caramelli D. L., Pou R., Marti M., Bertranpetit J. y Lalueza-Fox C. (2007) Palaeogenetic evidence supports a dual model of Neolithic spreading into Europe. *Philos. Trans. R. Soc. London. Biol.* 274: 2161-2167.
- Sánchez-Quinto F., Schroeder H., Ramírez O., Avila-Arcos M. C., Pybus M., Olalde I., Velazquez A. M., Marcos M. E., Encinas J.M., Bertranpetit J., Orlando L., Gilbert M.T., Lalueza-Fox C. (2012) Genomic affinities of two 7,000-year-old Iberian hunter-gatherers. *Curr. Biol.* 22: 1494-9.
- Soares P., Achilli A., Semino O., Davies W. y Macaulay V. (2010) The archaeogenetics of Europe. *Curr. Biol* 20: R174-R183.
- Soares P., Ermini L., Thomson N., Mormina M. y Rito T. (2009) Correcting for purifying selection: an improved human mitochondrial molecular clock. *Am. J. Hum. Genet.* 84: 740-759.
- Skoglund P., Malmström H., Raghavan M., Stora J., Hall P., Willerslev E., Gilbert M.T., Götherström A., Jakobsson M. (2012) Origins and genetic legacy of Neolithic farmers and hunter-gatherers in Europe. *Science* 336: 466-9.
- Skoglund P., Malmström H., Omrak A., Raghavan M., Valdiosera V., Günther T., Hall P., Tambets K., Parik J., Stören K.G., Apel J., Hall P., Willerslev E., Stora J., Götherström A., Jakobsson M. (2014) Genomic diversity and admixture differs for Stone-Age Scandinavian Foragers and farmers. *Scienceexpress* 10.1126/science.1253448.
- Straus L.G. y González Morales M.R. (2012) *El Mirón Cave, Cantabrian Spain The site and its Holocene Archaeological Record*. University of New Mexico Press. Albuquerque.
- Torroni A., Huoponen K., Francalacci P., Petrozzi M., Morelli L., Scozzari R., Obinu D. y Savontaus M.L. (1996) Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations. *Genetics* 144: 1835-1850.
- Van Oven M. y Kayser M. (2009) Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Hum. Mutat.* 30: E386-E394.
- Zorba E., Moraitis K. y Manolis S.K. (2011) Sexual dimorphism in permanent teeth of modern Greeks. *Forensic Sci Int* 210(1-3): 74-81.